

50 376
1999
165

n° attribué par la bibliothèque:

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
FLANDRES-ARTOIS

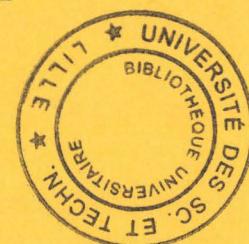
THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LILLE I

Sciences de la vie et de la santé

Option Immunologie



EMMANUEL HERMANN

**ASPECTS IMMUNOLOGIQUES DE L'INTERLEUKINE-16 ET
DU MONOXYDE D'AZOTE DANS L'INFECTION A VIH.**

Soutenue le 24 juin 1999
devant le jury composé de:

| | |
|---|--------------------|
| Madame le Professeur G. SPIK: | Président |
| Monsieur le Professeur A. CAPRON: | Directeur de thèse |
| Monsieur le Professeur M. GOLDMAN: | Rapporteur |
| Monsieur le Professeur D. EMILIE: | Rapporteur |
| Monsieur le Docteur G.M. BAHR: | Examinateur |
| Monsieur le Docteur T. IDZIOREK: | Examinateur |

the 2000 449

50376-
1999-
165

A mes parents,

A toute ma famille. Vous êtes formidables!

A Anita,

*Un jour de promenade, nous nous sommes arrêtés au bord d'un petit ruisseau,
Nous avons écouté son chant,
Nous avons gouté à la fraîcheur de son écume,
Nous avons caressé le fond de son lit,
Nous avons vu la clarté du soleil se réflétant dans ses remous,
Nous avons senti les fleurs multicolores de la prairie qui le protège,
et j'ai entendu mon cœur battre très fort.
C'est alors que j'ai compris qu'il ne fallait pas toujours rechercher l'invisible.*

AMGP

A Monsieur le Professeur A. CAPRON,

Vous m'avez accueilli avec bienveillance au sein de votre unité, afin de réaliser ce travail de recherche. Veuillez accepter dans ce travail le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur G. SPIK,

Vous avez accepté de présider le jury de la soutenance de cette thèse. Je vous en remercie très vivement

A Monsieur le Professeur M. GOLDMAN,

Pour l'honneur que vous me faites de juger l'ensemble de ce travail, et pour vos conseils et votre disponibilité, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur D. EMILIE,

Qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de ce mémoire, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur T. IDZIOREK,

Qui a participé pleinement à ce travail de thèse, pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eu et pour son amitié, qu'il reçoive toute ma gratitude.

A Monsieur le Docteur G.M. BAHR,

Vous avez dirigé ce travail de thèse et vous m'avez appris à appréhender un travail scientifique. Je vous en remercie.

Je tiens également à remercier les nombreux amis qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail de thèse, par leur soutien et leur amitié. Je pense à manu et christelle, à nathalie, à jean-françois, à catherine, à Juana et je dois en oublier. Merci

Je tiens tout particulièrement à remercier Francky et jean-Pierre Kusnierz, pour leur soutien moral. Jean-pierre m'a tout particulièrement appris l'humilité et le courage. Merci à tout le personnel du labo de production, Suzanne, Michèle, Isabelle et Jean-Pierre pour leur bonne humeur et pour m'avoir supporté pendant l'écriture du mémoire. Je ne veux pas oublier les parisiens, les grenoblois et les auvergnats. Surtout pas l'auvergne.....!

A ceux qui ont donné leur sang, merci.

A tous les malades du sida,.....

RESUME

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a pour récepteur principal la molécule CD4 et infecte les lymphocytes T CD4+, mais aussi les macrophages et les cellules dendritiques. L'interleukine-16 (IL-16), le ligand naturel de la molécule CD4, est une chimiokine pour les lymphocytes T CD4 et les monocytes. L'IL-16 est capable d'inhiber la multiplication virale dans les lymphocytes T infectés.

Après avoir clonée et produite la forme recombinante humaine, nous démontrons que seule la fraction tétramérique de l'IL-16 est responsable de l'inhibition de la multiplication du VIH, à tropisme M et T, dans des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) infectées. L'IL-16 est également capable d'inhiber la mort cellulaire de PBMC, issus de patients, induite par les anticorps anti-CD3, anti-CD95 et la dexaméthasone. La suppression de l'apoptose est en partie corrélée à la diminution de l'expression de CD95 sur les cellules CD4+ activées.

Jusqu'à présent, peu ou pas d'études ont été réalisées pour évaluer l'activité de l'IL-16 sur les macrophages et les cellules dendritiques, bien qu'elles expriment la molécule CD4. Nous démontrons que l'IL-16 module, dans les macrophages et les cellules dendritiques, l'expression de récepteurs de surface (CD25, CD80, CD86, CD83), l'expression des (co)récepteurs du VIH (CD4, CCR5, CXCR4), et la sécrétion de cytokines (IL-10, IL1-RA, TNF- α IL-6) et de chimiokines (MIP-1 α , RANTES). Dans un second temps, nous démontrons que l'IL-16 est capable d'inhiber la multiplication du VIH dans les macrophages et les cellules dendritiques. Ses résultats suggèrent que l'IL-16 est une molécule intéressante dans le cadre d'une immunothérapie anti-VIH.

La seconde partie de notre travail concerne le monoxyde d'azote (NO°), une molécule qui possède, entre autres, des activités antivirales. Notre objectif était d'établir une corrélation entre la libération de NO°, l'apoptose des cellules T et la multiplication virale dans les macrophages. Malgré une faible régulation de l'apoptose spontanée des PBMC, le NO° ne module pas la mort cellulaire des PBMC induite par les anticorps anti-CD3 ou la phytohémagglutinine. Par ailleurs, ni les PBMC issus de patients, ni les macrophages infectés par le VIH, ne libèrent du NO°, ce qui est confirmé par l'absence de régulation de l'ARN messager de la NO-synthase. Enfin, le NO° ne module pas la multiplication virale dans les macrophages confirmant un rôle mineur du NO° dans la pathogénèse du VIH.

SUMMARY

The CD4 molecule is the main receptor for human immunodeficiency virus (HIV) entry in CD4+ T cells, as well as in macrophages and dendritic cells. The chemokine interleukin-16 (IL-16), the physiological ligand of the CD4 molecule, is a chemoattractant factor for CD4+ T cells and monocytes. IL-16 was also found to inhibit HIV-1 replication in acutely infected T cells.

We have cloned and produced IL-16 in our laboratory and demonstrated that only the homotetrameric form is biologically active for inhibiting both M- and T-tropic HIV-1 replication in acutely infected peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Recombinant IL-16 is also able to inhibit activation-induced cell death in PBMCs from HIV-infected patients activated by either, anti-CD3, anti-CD95 or by dexamethasone. This effect was found to correlate with the down-regulation of CD95 expression on activated CD4+ T cells.

No or very limited knowledge is currently available on the effects of IL-16 on dendritic cells or on macrophages. We demonstrate that IL-16 can modulate, in macrophages and dendritic cells, with different extent, surface receptors expression (CD25, CD80, CD86, CD83), HIV (co)receptors expression (CD4, CCR5, CXCR4), and cytokine (IL-10, IL1-RA, TNF- α , IL-6) or chemokine (MIP-1 α , RANTES) secretion. Finally, IL-16 also inhibits viral replication in HIV-infected macrophages and dendritic cells. Thus, our results argue in favor of the use of IL-16 in anti-HIV therapy.

Nitric oxide (NO \circ) is an immune effective molecule with known antiviral properties. Our goal was to establish a link between NO \circ secretion, T lymphocytes apoptosis and viral replication in macrophages. Our data indicate that NO \circ slightly regulates the level of spontaneous apoptosis in PBMC but not that of activation-induced cell death induced either by, anti-CD3 or by phytohemagglutinin. No detectable nitric oxide was produced either by PBMC from patients, or by *in vitro* HIV-infected macrophages. The later result was confirmed by the absence of NO-synthase mRNA upregulation upon viral infection. Finally, NO \circ did not modulate HIV replication in macrophages. Taken together, our data indicate that NO \circ does not seem to play a major role in HIV pathogenesis.

LISTE DES ABBREVIATIONS

- ADN:** acide désoxyribonucléique
- ARNm:** Acide riboncléique messager.
- CD:** molécule de différentiation ("cluster of differentiation").
- CD40-I:** ligand du CD40.
- CMH:** Complexe majeur d'histocompatibilité.
- CPAg:** Cellule présentatrice de l'antigène.
- ELISA:** technique immunoenzymatique ("Enzyme-linked Immunoabsorbent assay").
- GM-CSF:** Facteur de croissance des lignées macrophagiques et granulocytaire ("Granulocyte-macrophage colony stimulating factor").
- gp:** glycoprotéine
- H₄B:** Tetrahydrobioptérine
- IFN:** Interféron.
- Ig:** Immunoglobuline
- IL-:** Interleukine
- IL-.R:** Récepteur à interleukine.
- LFA:** Molécule d'adhésion ("Leucocyte function-associated antigen").
- L-NMA:** Inhibiteur de la NO-synthase (N-methyl arginine).
- LPS:** Lipopolysaccharide.
- MIP-:** protéine inflammatoire des macrophages ("macrophage inflammatory protein")
- NF κ B:** facteur de transcription ("nuclear factor κ binding")
- NO:** Monoxyde d'azote.
- NOS-C:** NO synthase constitutive
- NOS-i:** NO synthase inductible.
- PBMC:** Cellules mononucléées périphériques du sang ("peripheral blood mononuclear cells")
- PCD:** mort cellulaire programmée ("programmed cell death").
- PCR:** Réactions d'amplification en chaîne ("Polymerase chain reaction").
- RANTES:** "regulated upon activation, normal T expressed and secreted"
- PtSer:** Phosphatidylserine
- RPMI:** Milieu de culture.
- RT:** Transcription inverse ou reverse transcriptase.,
- SCID:** Souris immunodéficiente ("Severe combined Immunodeficiency").
- SDF-1:** facteur des cellules stromales ("stromal-cell-derived factor") 1
- SIN-1:** Molécule donneuse de NO ("6-morpholino-syndnonimine").
- SNAP:** Molécule donneuse de NO ("S-nitroso-acetyl-penicillamine").
- TCR:** Récepteur T pour l'antigène ("T cell receptor").
- Th:** lymphocyte T auxiliaire ("T helper")
- TNF:** Facteur de nécrose tumorale ("Tumor necrosis factor").
- VIB:** Virus de l'immunodéficience bovine.
- VIF:** Virus de l'immunodéficience féline
- VIH:** Virus de l'immunodéficience humaine.
- VIS:** Virus de l'immunodéficience simienne.

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

En 1981, la description des premiers cas de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) dans la communauté homosexuelle de San Francisco a laissé pensé à l'émergence d'une nouvelle maladie. Deux à trois ans plus tard, l'agent étiologique (le virus de l'immunodéficience humaine ou VIH) a été isolé et caractérisé, ainsi que la cible moléculaire, la molécule CD4, permettant l'infection des cellules cibles. Depuis, de nombreux progrès ont été fait, et on commence à comprendre certains des mécanismes qui provoquent la pathogénèse. Pourtant, 18 ans après, le virus "piège" toujours sa cible, le système immunitaire. Sur le plan thérapeutique, l'ensemble des protocoles de vaccination testés jusqu'à présent, ont été, pour la plupart, des échecs. Le virus est comme une "savonnette" que l'on croit tenir, pour finalement nous échapper. Depuis quelques années, avec l'utilisation de l'AZT, et maintenant la combinaison d'anti-rétroviraux, l'espoir est revenu. Sous l'effet de ces traitements, la charge virale fortement diminuée, a même atteint des niveaux non détectables (<50 copies/ml) par les outils modernes d'analyse. L'étude des sujets traités par les anti-rétroviraux a permis de mettre en évidence des relations étroites qui existent entre la charge virale et les déficiences du système immunitaire.

Le virus infecte plusieurs types de populations cellulaires. Les lymphocytes T CD4+, la tour de contrôle de nos défenses, sont les plus susceptibles à l'infection. D'autres cellules, moins nombreuses, tels que les macrophages et les cellules dendritiques, sont également infectables et seraient des cibles privilégiées au niveau des sites d'infections. Ces cellules pourraient aussi représenter un réservoir viral. Le VIH est donc un virus qui non seulement infecte les cellules de

l'immunité acquise (T CD4+), mais aussi celle de l'immunité innée ou non spécifique (macrophages et cellules dendritiques).

Durant son évolution, le système immunitaire a acquis plusieurs stratégies de défense, et s'adapte ainsi à la nature d'une agression. Le monoxyde d'azote est l'une des molécules effectives de l'immunité non spécifique contre les parasites et les virus. Cependant, dans certaines conditions, son action peut se révéler nuisible pour les cellules. Malgré l'augmentation de la concentration d'un métabolite du NO° observée dans le sérum des patients, le rôle exact du NO° n'est pas définitivement établie dans la pathogénèse du VIH. Notre objectif a été de comprendre le lien qui pourrait unir le NO° à l'augmentation de l'apoptose des cellules T des patients, et son rôle dans la multiplication virale.

L'utilisation de molécules anti-rétrovirales n'éradique pas le virus. Aujourd'hui, sans une posologie bien respectée, le virus réapparaît, et le système est subversif car ce sont des virions résistants aux médicaments qui émergent.

Que faire pour éradiquer complètement le VIH? Soutenir nos systèmes de défense? Mais comment éviter les conséquences subversives d'une pression sélective du système immunitaire qui, si l'on tient compte de la théorie de Darwin, favoriserait l'apparition de populations virales génétiquement mieux adaptées à la réponse immunitaire et donc plus résistantes. Une hypothèse est l'association de molécules qui agissent soit par une action directe sur la multiplication virale (la trithérapie), soit par le renforcement du système immunitaire (l'immunothérapie), ou l'utilisation de molécules qui possèdent les deux activités, ce qui pourrait permettre d'atteindre les sanctuaires où réside le VIH sous forme latente.

Le VIH utilise, pour infecter la cellule cible, la molécule CD4 et des corécepteurs, principalement CCR5 et CXCR4. Les chimiokines, qui sont les ligands naturels de CCR5 et CXCR4 sont capables d'inhiber l'infection des cellules T en entrant en compétition avec le VIH pour CCR5 et CXCR4. Par ailleurs, l'IL-16 , qui est une chimiokine dont le récepteur naturel est la molécule CD4, est capable d'inhiber la multiplication virale dans les cellules T. L'IL-16 est une chimiokine qui pourrait donc participer au contrôle de l'infection.

Les macrophages et les cellules dendritiques qui expriment CD4 et les corécepteurs sont également des cellules cibles du VIH. Ces cellules pourraient avoir un rôle important en tant que réservoir et dans la persistance du virus tout au long de la maladie. Nous nous sommes donc intéressés à l'activité immune et antivirale de l'IL-16, qui n'a, jusqu'à présent, pas été établi sur ces cellules. A cette fin, nous avons cloné et produit l'IL-16 recombinante au laboratoire. Dans un premier temps, nous avons évalué la capacité de la molécule à moduler différents récepteurs de surface, dont les récepteurs du VIH (CD4, CCR5, CXCR4), ainsi que la synthèse de certaines cytokines. Ce travail a été logiquement poursuivi par l'étude de l'activité de l'IL-16 sur la multiplication du VIH dans les macrophages et les cellules dendritiques.

Après avoir également confirmé son activité antivirale sur des cellules T, notre travail a porté sur l'un des aspects de la pathogénèse du SIDA, l'apoptose, un phénomène actif de mort cellulaire. Dans cette étude, nous avons évalué les effets de l'interleukine-16 sur l'apoptose des cellules T infectées *in vitro* par différentes souches virales.

I) Les cellules présentatrices d'antigène

Le VIH infecte les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques qui expriment, à des degrés divers, la molécule CD4 et les corécepteurs du VIH. Ces cellules participent à la mise en place de la réponse immunitaire innée (macrophages et cellules dendritiques) et spécifiques (lymphocytes T et B). Les macrophages et les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices de l'antigène (CPAg). L'interaction de la cellule présentatrice d'antigène avec son antigène est une étape essentielle dans l'induction de la réponse immunitaire. En effet, elle permet aux lymphocytes de reconnaître l'antigène via la présentation d'épitopes, les structures reconnues spécifiquement, et de s'activer. Les CPAg représentent ainsi l'un des liens entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

A) Les monocytes/macrophages

Les monocytes/macrophages, originaires de la moelle osseuse, sont distribués à travers la plupart des tissus et jouent un rôle dans l'inflammation et la défense contre les micro-organismes infectieux (Nathan *et al.*, 1982). L'activité et les fonctions de ces cellules sont hautement dépendantes des signaux et des stimuli provenant de l'environnement.

1) *La migration*

Les monocytes restent présents dans le sang circulant pendant 12 à 72h et gagnent les tissus où ils se différencient en macrophages. Ces derniers sont localisés essentiellement dans les organes (foie,

peau, poumons, rate, ganglions, système nerveux) ou les tissus conjonctifs osseux. Les monocytes sont recrutés du sang vers les tissus grâce à l'action de peptides biologiquement actifs ou de chimiokines (C5a, RANTES, MIP-1 α , MCP-1) (Celada et Nathan, 1994; Bagliolini et Dahinden, 1994; Standiford *et al.*, 1995).

2) Régulation de la différenciation

La différenciation des monocytes en macrophages est un processus qui dure plusieurs jours (Zembala et Asherson, 1989). La survie des monocytes est un composant principal de la maturation de la réponse immunitaire. Lorsque l'inflammation est résolue, le nombre de monocytes et de macrophages décroît, suggérant l'existence d'un mécanisme physiologique pour le contrôle et l'élimination de ces cellules. Certaines cytokines, telles l'interleukine-1 β (IL-1 β), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), le GMCSF (Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor), l'interféron-gamma (IFN- γ) mais aussi les lipopolysaccharides (LPS) préviennent, *in vitro*, la mort cellulaire programmée des monocytes et maintiennent leur viabilité (Mangan et Wahl., 1991). En fait, l'activation des monocytes par des cytokines proinflammatoires augmente leur survie, alors que des cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL-4, conduisent les monocytes dans une voie de mort cellulaire programmée (Heidenreich *et al.*, 1997). La régulation de la survie des monocytes dépend de l'expression de surface de CD14. CD14 est un antigène de différenciation exprimé à la surface des monocytes matures et des macrophages, et sert de récepteur pour le lipopolysaccharide. Ainsi, une augmentation de l'expression de CD14 (par le LPS) prévient la mort des monocytes alors qu'une diminution de son expression (par l'IL-4) les rend plus susceptibles à l'apoptose (Heidenreich *et al.*, 1997).

3) Activités immunomodulatrices des macrophages

L'activation des macrophages en réponse à une stimulation inclut l'augmentation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et des molécules costimulatrices (CD80 et CD86) (Doherty, 1995). L'augmentation de la cytotoxicité à l'encontre des cellules tumorales ou des parasites (Singh *et al.*, 1993, Liew et Vickerman, 1997) sont également des caractéristiques de macrophages activés.

L'IFN- γ est l'une des cytokines activatrices des macrophages, que l'on associe avec une réponse cellulaire T de type Th1. Elle induit la production d'IL-12 par les macrophages et ainsi favorise le développement d'une réponse Th1 et la résistance contre des pathogènes intracellulaires (Trinchieri, 1997). L'environnement cellulaire est un facteur important dans l'induction des réponses cellulaires T. Par exemple, la présence de corticostéroïdes limite la synthèse d'IL-12 par les macrophages et pourrait ainsi influencer la réponse immunitaire vers un profil de type Th2 (DeKruyff *et al.*, 1998). D'autres cytokines, l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-2 sont capables de moduler l'activité des macrophages (Doherty, 1995). Ainsi, en fonction de leur statut d'activation, les macrophages sont capables de supprimer la prolifération cellulaire (Schebesch *et al.*, 1997) et d'induire la mort cellulaire par apoptose des cellules T (Munn *et al.*, 1996).

Les macrophages sont aussi des médiateurs de la cytotoxicité dépendante des anticorps ou ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity), leur permettant la lyse de cibles recouvertes d'immunoglobulines (Velde *et al.*, 1992).

En réponse à divers stimuli, les monocytes/macrophages interviennent dans la sécrétion de nombreuses substances. Ils

produisent les monokines IL-1, IL-6, TNF- α , IFNs, GM-CSF, IL-1RA, IL-12, IL-10 ou l'IL-15, mais également des molécules actives telles que de nombreux dérivés actifs de l'oxygène (Curfs *et al.*, 1997; Celada et Nathan, 1994). Nous verrons par la suite que l'un d'entre eux, le monoxyde d'azote, est une molécule importante dans les fonctions cytotoxiques et régulatrices des macrophages.

B) Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules dérivées de la moelle osseuse qui fonctionnent comme des cellules présentatrices d'antigène. Les cellules souches circulent à travers le flux sanguin dans les tissus non lymphoïdes, où elles se développent pour former des cellules dendritiques immatures. Les cellules dendritiques auraient pour origine un précurseur commun à la lignée myéloïde. Cependant, il a été décrit dans le thymus des cellules dendritiques générées à partir d'un précurseur lymphoïde (Cella *et al.*, 1997). Il est bien accepté maintenant que les cellules dendritiques sont hétérogènes dans leurs phénotypes, leurs lignées et leurs fonctions. Les cellules dendritiques sont définies comme les "sentinelles" du système immunitaire (Steinman, 1991) qui contrôlent l'immunité (Bancherau et Steinman, 1998).

1) *Les cellules de Langerhans*

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques de l'épiderme et des épithéliums stratifiés des muqueuses orales et génitales. Elles forment un réseau continu d'à peu près toute la surface du corps par l'intermédiaire de longs prolongements appelés dendrites (Steinman, 1991). Elles sont définies par leur morphologie dendritique,

par la présence d'un organelle cytoplasmique, le granule de Birbeck (Romani et Schuler, 1992) et par le marqueur CD1a (Hart, 1997). Elles n'expriment pas ou peu CD40 et CD86, et possèdent peu de molécules du CMH à leur surface. Ce sont des cellules immatures, spécialisées dans la capture et l'apprêtement de l'antigène.

2) Le processus de maturation

Durant leur progression des organes non lymphoïdes vers les organes lymphoïdes, les cellules de Langerhans procèdent à une maturation (Fig. 1). De cellules particulièrement efficaces dans la capture et le traitement des antigènes, elles deviennent des cellules spécialisées dans la stimulation des cellules T naïves.

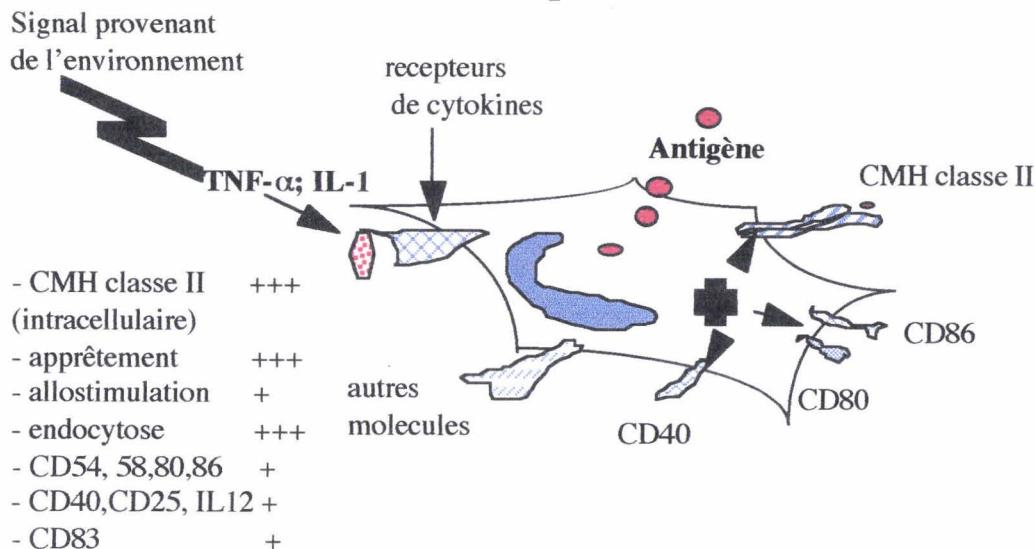
Dans l'épiderme, les cellules de Langerhans sont étroitement associées aux kératinocytes par l'intermédiaire d'une cadhérine, la E-cadhérine (Tang *et al.*, 1993). La présence d'un facteur inflammatoire diminue son expression et permet ainsi la migration des cellules de Langerhans. A cette occasion, l'intégrine $\alpha 6$ (Price *et al.*, 1997) et les facteurs chimioattractants, tel que C5a (Morelli *et al.*, 1996), jouent un rôle important. Récemment, il a été montré que la régulation de l'expression des récepteurs des chimiokines joue un rôle important dans la migration des cellules dendritiques. En particulier, la maturation induite par le CD40-ligand, le LPS, l'IL-1 ou le TNF- α diminue l'expression de CCR1 et CCR5 et augmente l'expression de CCR7 (Sozanni *et al.*, 1998). Ce dernier a pour ligand MIP-3 β qui permet la localisation des cellules dans les ganglions lymphatiques. En effet, les cellules migrent vers les organes lymphoïdes proximaux afin d'y rencontrer les lymphocytes T. Comparées à des macrophages, les cellules dendritiques

matures sont beaucoup plus efficaces pour présenter l'antigène et stimuler les lymphocytes T.

Diverses cytokines sont impliquées dans la régulation de cette maturation fonctionnelle. Le TNF- α et l'IL-1 β sont des inducteurs de maturation des cellules dendritiques. Ils provoquent en particulier sur des cellules immatures en culture:

- une diminution de leur capacité à capter les antigènes.
- une augmentation de l'expression à la surface des molécules de CMH de classe I et II, des molécules d'adhérence (CD44, CD54 et CD58) et de costimulation des lymphocytes T (CD40, CD80 et CD86).
- l'apparition du marqueur CD83 caractéristique des cellules dendritiques matures (Zhou et Tedder, 1995).
- une diminution de leur capacité d'apprêttement d'antigènes exogènes (Romani *et al.*, 1989) accompagnée d'une augmentation de leur capacité de stimuler des lymphocytes T naïfs allogéniques (Schuler et Steinman, 1985).
- les cellules dendritiques acquièrent la capacité de synthétiser de l'IL-12 qui favorise l'apparition d'une population T de type Th1 (Winzler *et al.*, 1997; Heufler *et al.*, 1996).

1. cellule dendritique immature



2. cellule dendritique mature

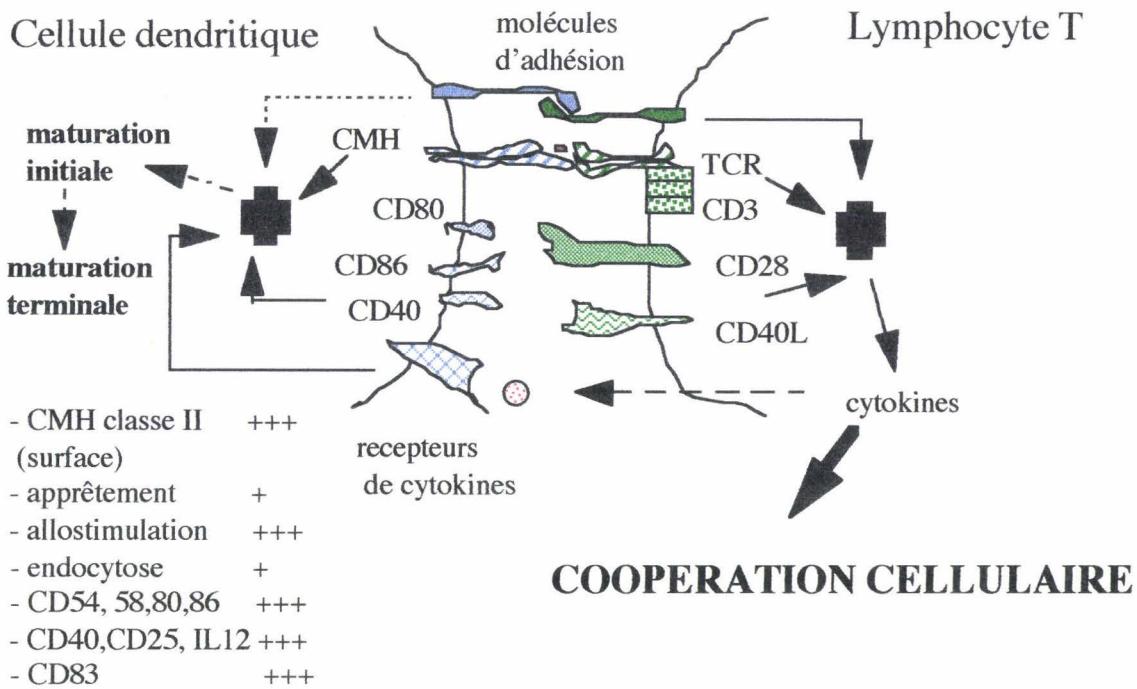


Figure 1: Interactions moléculaires entre cellule dendritique et cellule T: La cellule dendritique, après activation par des signaux environnementaux, migre vers les ganglions lymphatiques, en passant par des étapes de maturation. Elle acquiert ainsi la capacité de présenter l'antigène aux cellules T. Au niveau des ganglions lymphatiques, la cellule dendritique entre en liaison avec la cellule T spécifique pour l'antigène et la stimule. En retour, la cellule T renforce la capacité de présentation et de costimulation de la cellule dendritique.

Certaines cytokines sont capables de moduler le processus de maturation. L'IL-10 peut diminuer les capacités stimulatrices (Caux *et al.*, 1994) et le TNF- α régule la capacité de présentation d'antigène soluble (Sallusto et Lanzavecchia, 1994) des cellules dendritiques. L'action de l'IL-10 est cependant variable, puisque la cytokine est capable de moduler la maturation des cellules dendritiques activées par le LPS, contrairement à celles activées par la ligation de CD40 (Buelens *et al.*, 1997). D'autres molécules participent à la régulation de la maturation des cellules dendritiques. C'est le cas des glucocorticoïdes qui inhibent la maturation finale des cellules dendritiques au contact des lymphocytes T (Kitajima *et al.*, 1996) et de la protoglandine E2 qui est capable de contrôler la production d'IL-12 par les cellules dendritiques. (Kalinski *et al.*, 1998; Rieser *et al.*, 1997). Finalement, la maturation finale nécessaire à l'activité des cellules dendritiques, qui permet la synthèse d'IL-12, est médiée par leur contact avec les lymphocytes T (Bergstresser *et al.*, 1997), via le complexe CD40/CD40-ligand et en présence d'INF- γ (Caux *et al.*, 1994; Snijders *et al.*, 1998).

Ces résultats montrent la complexité du système et l'importance des facteurs présents dans l'environnement.

Plusieurs approches sont possibles pour obtenir des cellules dendritiques *in vitro* (Hart, 1997). L'une d'entre elles consiste à différencier des cellules dendritiques à partir de monocytes du sang circulant. En présence de GM-CSF et d'IL-4, nous pouvons obtenir des cellules dendritiques immatures. L'addition de TNF- α permet d'obtenir des cellules dendritiques matures qui nous servira de modèle dans notre étude.

3) Contrôle de la réponse cellulaire T

Comme nous l'avons vu, suite à leur maturation, l'expression des molécules costimulatrices CD80 et CD86 est augmentée à la surface des cellules dendritiques tout comme la sécrétion de l'IL-12 (Cella *et al.*, 1996) et la libération de chimiokines telles que l'IL-8, MIP-1 α et β (Caux *et al.*, 1994). En particulier, l'IL-12 produite par les cellules dendritiques permet le développement de lymphocytes de type Th1, producteurs d'interféron-gamma (Heufler *et al.*, 1996).

La stimulation des cellules dendritiques par l'IL-10 peut moduler le type de réponse, Th1 ou Th2, puisqu'il a été montré que dans ce cas, les cellules dendritiques favorisent l'apparition d'une population de type Th2, sécrétrices d'IL-4 (Liu *et al.*, 1998). Egalement, les cellules dendritiques immatures des muqueuses stimulent de façon préférentielle les lymphocytes de type Th2 (Stumbles *et al.*, 1998). Ainsi, l'environnement lors de la maturation des cellules dendritiques et leur état d'activation, peut conditionner le type de réponse, Th1 ou Th2, des cellules T.

La complexité des cellules dendritiques se retrouvent également dans leur hétérogénéité. En effet, chez le rat, une expression différentielle de la molécule CD4 permet de différencier deux sous-populations de cellules dendritiques, dont les activités stimulatrices envers les lymphocytes T sont différentes. (Liu *et al.*, 1998). Chez la souris, il a été décrit, dans les ganglions lymphatiques, trois sous-populations de cellules dendritiques, dont l'une exprime le marqueur CD8 α , suggérant une origine lymphoïde, qui se différencient selon leur localisation, leur capacité de renouvellement, et leur capacité à présenter l'antigène (Salomon *et al.*, 1998). Cette hétérogénéité a été retrouvée dans la rate des souris où il a été observé une population de

cellules dendritiques interdigitées dans la zone T (pulpe blanche) possédant le marqueur CD8, et une population dans la zone marginale (pulpe rouge) (Leenen *et al.*, 1998). *In vitro*, cette sous-population CD8 α est capable de tuer les cellules CD4+ par un mécanisme impliquant la molécule Fas. En effet, cette population exprime fortement le marqueur Fas-ligand et ainsi induit une réponse proliférative moins vigoureuse que celle induite par la population n'exprimant pas CD8 (Süss et Shortman, 1996). La prolifération est également restreinte dans les cas des cellules T CD8+, mais le mécanisme d'inhibition est différent puisqu'il implique une restriction de la production d'interleukine-2 par les cellules T (Kronin *et al.*, 1996). Enfin, chez l'homme, il a été distinguée une population d'origine myéloïde capable d'induire la différenciation des cellules T de type Th1, et une population d'origine lymphoïde, dépendante de l'IL-3, qui initierait la différenciation des cellules T vers un type Th2 (Rissoan *et al.*, 1999).

Il a été démontrée par Inaba *et al.* (1997) que les cellules dendritiques des zones T sont capables de présenter de façon importante des peptides du soi. Ces cellules seraient donc impliquées dans la régulation de l'autoimmunité. En effet, un rôle des cellules dendritiques dans la tolérance des cellules T a été observée *in vivo*, puisque l'expansion des cellules dendritiques des voies muqueuses, favorisée par une molécule de croissance Flt3 ligand, aboutit à l'induction d'une tolérance orale (Viney *et al.*, 1998).

L'induction de la tolérance pourrait résulter de phénomènes de mort cellulaire ou d'anergie (Kurts *et al.*, 1997; Foster et Lieberam, 1996). Il reste à déterminer le choix qualitatif pour l'induction de la tolérance versus l'activation. En particulier l'environnement lors de la maturation des cellules dendritiques pourrait être un facteur majeur puisqu'il a été observé que les cellules dendritiques, traitées par l'IL-10, peuvent induire une anergie des cellules T (Steinbrink *et al.*, 1997).

Pour Finkelman *et al.* (1996) la réponse est dans la présentation de l'antigène.

C) Les molécules costimulatrices

L'activation cellulaire T est initiée par la reconnaissance, par le récepteur T, de complexes peptides/CMH à la surface de cellules présentatrices d'antigène. Cependant, ce processus est en général insuffisant pour un développement complet de la réponse T. En effet, des signaux supplémentaires sont nécessaires afin d'obtenir une réponse optimum (Croft et Dubey, 1997). Ces signaux sont fournis par la ligation de molécules costimulatrices, présentes à la surface des lymphocytes et des CPAg. De nombreuses études ont suggéré que ce second signal était fourni par les molécules CD80/CD86 après liaison à la molécule CD28. Il est dorénavant bien accepté qu'une multitude de molécules participe à cette fonction accessoire qu'est la costimulation et qui permet une réponse efficace des cellules T.

L'une des molécules de surface la plus étudiée des lymphocytes T est le CD28 (June *et al.*, 1994). Le CD28 présente deux ligands possibles: CD80/B7-1 et CD86/B7-2 exprimés sur les CPAg. Ces deux molécules peuvent également se lier à une autre molécule de surface des lymphocytes T, CTLA-4 (Chambers et Allison, 1997). CTLA-4 est un ligand de forte affinité qui aurait un rôle de régulation négative de la réponse des cellules T (Krummel et Allison, 1996.).

CD86 est exprimé de façon constitutive sur les cellules présentatrices d'antigène, telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B activés (Hathcock *et al.*, 1994). CD80 n'est que faiblement exprimé à la surface des cellules dendritiques et

des macrophages, mais il est surexprimé suite à l'activation des cellules par des facteurs inflammatoires.

Les signaux de costimulation sont délivrés efficacement par les cellules dendritiques, et à un moindre degré par les monocytes et les lymphocytes B activés. Les cellules B et T au repos fournissent au contraire de faibles costimuli (Jenkins et Johnson, 1993). Ceci est expliqué par le fait que les cellules dendritiques expriment fortement les ligands B7, LFA-3 et ICAM-1.

Finalement l'induction de la réponse immunitaire peut se résumer comme suit:

- (1) une adhésion cellulaire indépendante de la reconnaissance de l'antigène.
- (2) la reconnaissance par le TCR de l'antigène présenté dans le contexte du CMH, et le renforcement de l'adhésion cellulaire dépendante du TCR.
- (3) la costimulation via les interactions spécifiques entre plusieurs molécules présentes à la surface des lymphocytes et leur ligand respectif à la surface des CPAg.

L'association de l'ensemble des signaux conditionne les mécanismes effecteurs des cellules T, l'apoptose ou la tolérance de la cellule T (Shen et König, 1998). Nous verrons par la suite l'importance de la molécule CD4 dans la régulation de l'activation cellulaire T, et les conséquences de sa ligation dans l'immunodéficience caractéristique de la maladie du sida.

II NO: UNE MOLECULE EFFECTIVE DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Le monoxyde d'azote (NO°) est un radical gazeux à demi-vie courte. Le NO° est l'un des messagers de communications cellulaires les plus étudiés aujourd'hui. Il est impliqué dans toutes les grandes fonctions physiologiques (cardio-vasculaire, immunologie, digestion, reproduction, neurobiologie) (Michel et Arnal, 1993; Bockaert, 1993; Moncada et Higgs, 1993). Dans le modèle murin, le NO° est produit en large quantité dans les réactions immunologiques non spécifiques de défense de l'hôte, mais chez l'homme, son rôle est encore mal défini. Il est produit par les macrophages activés et peut avoir des effets cytotoxiques, non seulement pour les micro-organismes agresseurs, mais aussi pour les cellules productrices et les cellules voisines. En effet, le NO° est capable d'interagir avec des radicaux dérivés de l'oxygène, pour former des molécules, comme les peroxynitrites, qui seront alors plus cytotoxiques. Par ailleurs, une production excessive peut entraîner des problèmes comme les chocs septiques ou des cas de cirrhoses (Nussler et Billiar, 1993; Vallance et Moncada, 1991). Ses actions cytotoxiques, protectrices et régulatrices sont résumées dans la figure 2.

A) La NO-synthase

Le monoxyde d'azote est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine, par une famille d'enzymes, les NO-synthases (NOS) (Mayer et Hemmens, 1997). Jusqu'à présent plusieurs formes de NO synthases ont été découvertes.

- 1) Les NOS-c dites constitutives, activées rapidement par le complexe Ca²⁺-calmoduline, que l'on trouve typiquement dans les neurones, mais aussi dans l'endothélium.
- 2) Les NOS-i dites inductibles dont l'expression transcriptionnelle est lente, relativement stable et sous la dépendance de cytokines ou de toxines. La présence de calcium n'est pas nécessaire pour leur fonctionnement. Elles ont été décrites dans les macrophages, les hépatocytes, les cellules de Kupffer, les neutrophiles, les cellules musculaires lisses des vaisseaux, ou encore les astrocytes. Une même cellule, comme la cellule endothéliale, peut exprimer les 2 formes, l'activité des NOS-i étant plus élevée que les NOS-c.

Les NOS catalysent la séquence de réactions d'oxydation permettant la production de NO à partir de la L-arginine:



Elles ont un besoin absolu de NADPH et de 6-tétrahydro-L-bioptérine (H₄B).

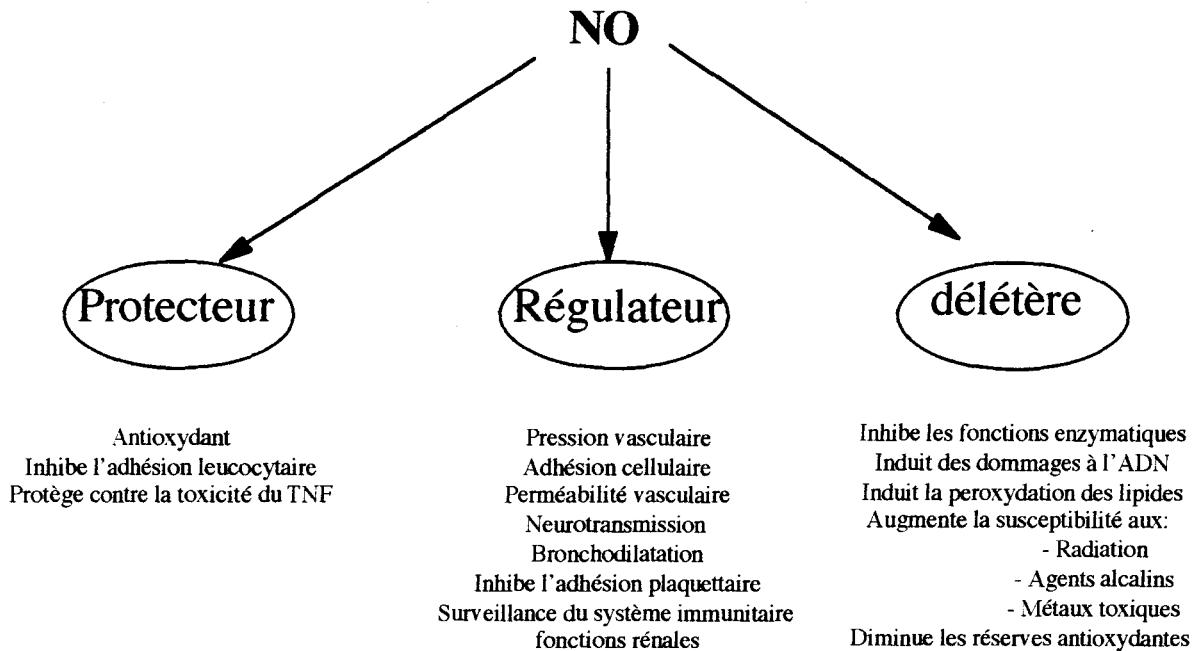


Figure 2: Effets biologiques du monoxyde d'azote (NO). D'après Wink et Mitchell (1998).

B) Régulation de la synthèse du monoxyde d'azote.

L'IFN- γ et le LPS sont les activateurs les plus couramment utilisés pour l'activation de la NO-synthase inducible (Liew, 1995). Cette production et l'expression de NOS-i sont inhibées de façon dose dépendante par les cellules préincubées avec l'IL-4 (Liew *et al.*, 1991). Cependant, un rôle de l'IL-4 dans l'augmentation de l'activité de la NOS-i dans des monocytes, a été suggéré par Defer *et al.* (1994). L'IL-10 et le TGF β diminuent également l'activité de la NO-synthase (Liew, 1995). La complexité de la régulation de la synthèse de NO° est illustrée par les actions contradictoires de l'IL-10. En effet, Corradin *et al.* (1993) ont démontré que l'IL-10 augmente la production de NO° par des macrophages stimulés par une combinaison d'IFN- γ et de TNF- α ou par la prostaglandine E2 . Au contraire, lorsque les cellules sont stimulées par le LPS et l'IFN- γ , l'IL-10 inhibe la production de NO°. Ce résultat est

contredit par Chesrow *et al.* (1994) qui montrent une augmentation de l'expression de l'ARN messager de NOS-i suite à l'activation par la combinaison de LPS et d'INF- γ , malgré la diminution observé en présence de LPS seul. Récemment, il a été montré que l'IL-10 augmente la production de NO° dans des macrophages stimulés par le LPS (Jacobs *et al.*, 1998). Les auteurs démontrent que l'IL-10 endogène joue un rôle important dans la production de NO° et permet d'augmenter l'activité microbicide contre *Trypanosoma Cruzi*. Ainsi, la modulation de la production de monoxyde d'azote est complexe et dépend des systèmes d'études.

C) NO° et immunité

1) Modulation de l'activation des cellules T par le monoxyde d'azote

Il existe beaucoup de controverses sur les différentes capacités du monoxyde d'azote à moduler l'activation cellulaire. Il est bien accepté que le NO° inhibe la prolifération des cellules T, bien que certains modèles démontrent sa capacité à faciliter l'expansion des cellules T *in vivo* (Liew, 1995). En fait, il est probable que le NO° inhibe la prolifération cellulaire à fortes concentrations, et qu'il soit, à des concentrations physiologiques, nécessaire à l'activation des cellules T (Liew, 1995).

Le NO° est capable de moduler la réponse immunitaire de type Th1 (Liew, 1995). Par exemple, le NO° produit par les cellules épithéliales et les macrophages des voies aériennes de sujets asthmatiques a un effet inhibiteur sur les cellules Th1, aboutissant à l'activation ou à l'expansion des cellules de type Th2, normalement supprimées par l'IFN- γ (Barnes et Liew, 1995). Récemment le NO° a été

impliqué dans l'inhibition de la synthèse d'IL-12 par les macrophages et ainsi dans la limitation de l'expansion des cellules T de type Th1 (Huang et al., 1998).

2) L'apoptose.

La modulation de l'apoptose par le monoxyde d'azote est encore conflictuelle. Le NO[°] est impliqué dans la sélection thymique en induisant la mort des thymocytes activés via le récepteur T pour l'antigène (Tai et al., 1997). Le NO[°] participe aussi à l'induction de la mort des cellules T induite par l'activation via le récepteur T à l'antigène (Williams et al., 1998). L'induction de l'apoptose par le NO[°] dans des cellules Jurkat a été corrélée à leur sensibilité au complexe Fas/Fas-ligand (Chlichlia et al., 1998). En effet, les cellules sensibles à la mort induite par des anticorps anti-Fas, sont plus susceptibles à la mort induite par l'action du monoxyde d'azote que des cellules n'exprimant pas Fas. De même, le NO[°] induit l'apoptose de PBMC, provenant d'un patient atteint de leucémie, et très sensibles à l'action de Fas (Chlichlia et al., 1998). Cependant les auteurs suggèrent que la mort cellulaire médiée par le NO[°] implique des voies Fas-dépendantes et Fas-indépendantes. Par contre, il a été montré que le NO[°] inhibe l'apoptose de cellules Jurkat en bloquant l'activité de la voie Fas/Fas-L (Dimmeler et al., 1998; Melino et al., 1997), mais augmente la mort cellulaire par nécrose (Melino et al., 1997). Dans un modèle murin, le NO[°] inhibe l'apoptose des cellules T CD4+ induite par le SEB, contrairement à celles des cellules CD8+, en modulant l'expansion clonale et la production de cytokines (Bras et al., 1997). L'inhibition de l'apoptose est observée dans les ganglions lymphatiques, mais pas dans la rate et le thymus. Ces observations suggèrent un rôle important des facteurs de l'environnement dans la modulation de l'apoptose par le NO[°],

en particulier l'état d'activation des cellules et les cellules présentatrices de l'antigène dont les populations sont différentes d'un tissu à l'autre. L'activité régulatrice du monoxyde d'azote sur l'apoptose des lymphocytes T de sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine, dont le système immunitaire est dans un état d'activation chronique, n'a pas encore été étudiée.

3) Activité bactéricide et tumoricide.

Les macrophages sont les cellules majeures du système immunitaire pour la production de NO°. En particulier, l'activité antimicrobienne représente l'un des rôles primordiaux du NO° (Nussler et Billiar, 1993). Cette activité est bien illustrée dans le cas de la leishmaniose (Hirji *et al.*, 1998), du paludisme (Seguin *et al.*, 1994) ou encore de la toxoplasmose (Scharton-Kersten *et al.*, 1997), dans des modèles murins où la dichotomie Th1-Th2 est évidente. Dans les macrophages humains, il existe encore beaucoup de controverses quant au rôle du NO contre les parasites intracellulaires (Albina, 1995). Mais la controverse de l'existence de NOS-i chez l'homme se limite à son expression chez des individus sains. Dans les poumons de patients atteints de tuberculose, les macrophages expriment NOS-i. De même, les macrophages alvéolaires peuvent induire NOS-i, *in vitro*, après infection par *Mycobacterium bovis* (Nozaki *et al.*, 1997). Dans ce cas, NOS-i contrôle la multiplication de l'agent pathogène. D'autres cas inflammatoires comme le paludisme, l'arthrite rhumatoïde ou encore les scléroses (Nathan, 1997) révèlent l'existence de NOS-i dans les monocytes et les macrophages. Par ailleurs le NO endogène est capable d'inhiber la croissance des tumeurs et des métastases. Cependant des données indiquent que NO° peut promouvoir la croissance des tumeurs (Zidek et Masek, 1998).

4) activité anti virale.

Les réponses précoces de l'hôte contre des infections virales sont aspécifiques et impliquent l'induction de cytokines, dont les interférons et le TNF- α . Des études récentes suggèrent que le NO° possède des effets antiviraux dans les cellules murines et humaines (Reiss et Komatsu, 1998). L'induction de NO° inhibe la multiplication du virus de l'herpès (HSV-1) (Mac lean *et al.*, 1998), malgré son rôle délétère dans la pneumonie herpétique (Adler *et al.*, 1997), mettant en évidence sa dualité d'action, nuisible et protectrice. Un autre exemple est celui du virus de la vaccine (Harris *et al.*, 1995) dont la multiplication est inhibée dans les cellules murines. Il a été démontré également que le NO° a une activité anti-retrovirale sur le "Friend Leukemia virus" murin (Akarid *et al.*, 1995). Ces observations doivent être prises avec précaution car lors de l'étude de l'action du NO° sur les coronavirus murins, les auteurs (Lane *et al.*, 1997) ont observé une dissociation dans son rôle, néfaste pour le virus lors d'expériences *in vitro*, et sans effets *in vivo*. Les résultats décrits ci-dessus concernent des modèles murins. Les recherches sur les effets du NO° sur la multiplication virale dans des cellules humaines sont limitées aux effets de NO° exogènes (produits chimiques donneurs ou inhibiteurs de NO°). D'une façon générale, les effets du NO° endogène sont difficiles à étudier de par le fait que les leucocytes humains en synthétisent en quantité bien moins importante que les cellules murines. Il est probable que le faible niveau de NO° produit par les leucocytes humains n'exerce pas d'effets directs sur l'activité microbicide, mais plutôt altère la transduction des signaux cellulaires. C'est le cas du virus de l'Epstein Barr (EBV) dont le NO° inhibe la multiplication dans les lymphocytes B (Mannick *et al.*, 1994) ce qui permet d'établir un équilibre aboutissant à la latence du virus.

L'infection virale peut induire les cellules à produire du NO°. En effet, l'infection de la lignée monocyttaire U937 par le virus de l'herpès stimule la production de NO° par les cellules (Lopez-Guerrero et Alonso, 1997). Mais aucune interférence avec la survie du virus n'a été observée. La stimulation de la production de NO° suite à l'infection de macrophages par le VIH a également été observée (Bukrinsky *et al.*, 1996), mais son action antivirale est encore conflictuelle (Bukrinsky *et al.*, 1996; Ouaaz *et al.* 1996).

III L'infection par le VIH

A) Généralités

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus et au sous-groupe des lentivirus. D'autres virus apparentés au VIH ont été isolés. Il s'agit du VIF (virus de l'immunodéficience féline), du VIB (virus de l'immunodéficience Bovine) et la famille des VIS (virus de l'immunodéficience simienne). Les lentivirus ont la propriété commune d'infecter de façon persistante leur hôte, causant une maladie à évolution lente, impliquant entre autres les systèmes nerveux et immunitaires. Les virions se présentent sous une forme sphérique de 90 à 120 nm de diamètre. La particule virale est constituée d'une membrane, provenant de la membrane plasmique de la cellule lors du bourgeonnement du virus. C'est dans cette membrane que sont ancrées la glycoprotéine d'enveloppe externe, la gp120, et la glycoprotéine transmembranaire gp41. L'ensemble des deux glycoprotéines est issu d'un précurseur, la gp160. Les rétrovirus sont définis par leur mode de multiplication qui passe par une étape de rétro-transcription de leur matériel génétique constitué de deux molécules d'ARN identiques. Cette étape est réalisée par une enzyme, la réverse transcriptase.

Le VIH cause peu de symptômes dans les phases précoces de la maladie, mais établit une lente infection persistante qui mène au bout de plusieurs années à une immunosuppression et la mort, au travers d'infections opportunistes et/ou de tumeurs.

Le VIH "parasite" le système immunitaire en infectant les cellules centrales de ce système: les lymphocytes T CD4+ et les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages et les cellules dendritiques qui expriment également CD4. L'infection par le VIH cause progressivement un déficit à la fois quantitatif et qualitatif des

lymphocytes T CD4+. L'une des contributions importantes des deux dernières années a été la démonstration d'une association étroite entre la multiplication virale et la progression clinique du sida. Il est maintenant admis que le VIH se multiplie de manière active tout au long de l'infection naturelle et se manifeste par une activation chronique du système immunitaire au travers, entre autres, de profils de cytokines altérés.

B) Fixation à la cellule cible.

Ce sont les glycoprotéines d'enveloppe qui contrôlent le processus de la fixation virale. La protéine d'enveloppe du VIH est initialement produite en tant que gp160, qui sera clivée pour donner la gp120 présente à la surface de l'enveloppe virale, et la gp41 constituant la partie transmembranaire (Chan et Kim, 1998), gp120 et gp41 étant associées de façon non covalente. La gp120 se lie à son récepteur de haute affinité, la molécule CD4+ (Dagleish *et al.*, 1984, Klatzmann *et al.*, 1984). La présence de CD4+ à la surface des cellules conditionne le tropisme du VIH vers les cellules T, les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules de la microglie (Wyatt et Sodroski, 1998). L'interaction de gp120 avec CD4 induit un changement conformationnel de la sous-unité gp120 qui permet la reconnaissance de régions particulières de cette protéine (notamment le domaine V3) par d'autres protéines de surface cellulaire. Il s'agit essentiellement des récepteurs des chimiokines CCR5 et CXCR4 (ou fusine) (Feng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996). La liaison de gp120 avec CD4 induit une coopération entre CD4 et les corécepteurs provoquant un changement conformationnel de gp41 qui va médier la fusion de la membrane virale avec celle de la cellule cible (Chan et Kim, 1998, Jones *et al.*, 1998).

La diversité des formes virales qui existent chez un individu infecté est liée à l'utilisation préférentielle des corécepteurs cellulaires. Les cellules qui expriment CCR5 sont ainsi infectables par les virus à tropisme macrophagiques ou M, mais aussi par les formes virales à double tropisme M et T capables d'utiliser les deux corécepteurs CCR5 et CXCR4. A l'inverse, les cellules CD4+ qui présentent à leur surface uniquement la molécule CXCR4 sont infectées par les virus à tropisme cellulaire T. Pour la plupart des isolats primaires du VIH qui sont transmis et prédominent pendant les premières années de l'infection, CCR5 est le corécepteur obligatoire. En effet les rares individus génétiquement déficient pour l'expression de CCR5 sont résistant à l'infection (Samson *et al.*, 1996). Au cours de l'évolution de la maladie, les isolats de VIH-1 reconnaissant CCR5 entreront en compétition avec ceux reconnaissant CXCR4. Enfin, malgré toutes ces observations, il demeure toujours possible que le VIH soit amené à utiliser d'autres récepteurs de chimiokines apparentés; en effet, le récepteur des β -chimiokines CCR3 (Choe *et al.*, 1996) semble pouvoir remplacer CCR5 pour certaines souches virales. D'autres souches peuvent utiliser CCR2b (Doranz *et al.*, 1996). Plus récemment d'autres corécepteurs, appelées STRL33 (Liao *et al.*, 1997), Bonzo (Deng *et al.*, 1997) ou TYMSTR (Loetscher *et al.*, 1997), ont été découverts.

C) Cellules cibles du VIH

1) *Les cellules T*

Les cellules T CD4+ sont les principales cibles du VIH. La charge virale observée chez les patients provient à 98-99% de la multiplication virale dans ces cellules (Perelson *et al.*, 1996). L'aspect

fondamental pour une multiplication effective du virus est l'état d'activation de la cellule. Le virus peut se lier et pénétrer dans les lymphocytes T à l'état de repos (stade G0 du cycle cellulaire), mais l'intégration du génome viral est impossible (Zack *et al.*, 1990; Buckrinsky *et al.*, 1991). Une infection productive est induite lorsque les cellules sont stimulées par un antigène, ou lors du renouvellement physiologique. En effet 0,5 à 1% des lymphocytes CD4+ et CD8+ prolifèrent chez un individu sain donné. Chez un sujet infecté par le VIH, le pourcentage de cellules en prolifération est largement augmenté (Pantaleo et Perrin, 1998). Parmi les facteurs susceptibles d'activer l'expression du virus, on connaît des cytokines tels que l'IL-2 et le TNF- α , mais également les antigènes, les anticorps anti-CD3 ou anti-TCR et les mitogènes. Cette interaction étroite entre la régulation virale et l'activation cellulaire qui augmente, de façon importante, le taux de multiplication virale (Haseltine, 1991), est l'une des bases du caractère pathogénique de l'infection par le VIH.

La démonstration récente de l'existence de lymphocytes T CD4+ quiescents et infectés par des virus sous forme latente, montre que ces cellules constituent une forme de réservoir (Chun *et al.*, 1997). Elles représentent donc un obstacle important pour l'éradication complète du virus par le système immunitaire.

2) *Les cellules dendritiques*

L'importance des cellules dendritiques dans la primo-infection, en tant que cellules cibles dans les muqueuses, a été mis en évidence dans un modèle simien (Spira *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été montré que les cellules dendritiques des muqueuses sont des filtres pour la propagation des virus à tropisme macrophagiques (Reece

et al., 1998). En effet, dans ce modèle utilisant des explants de peau, les auteurs ont constaté que les cellules dendritiques n'étaient infectées que par les virus utilisant CCR5 comme récepteurs. Un autre modèle propose que suite à l'infection, les cellules dendritiques migrent vers les ganglions lymphatiques, dans les régions paracorticales, dans lesquels elles interagissent avec les lymphocytes T CD4+ activés ou quiescents. Ces derniers s'infectent et disséminent l'infection (Weissman et Fauci, 1998; Spira et al., 1996). En effet, en 1996 Pope et al. ont démontré que malgré un faible niveau d'infection des cellules dendritiques cutanées, celles-ci sont capables d'induire une multiplication virale importante lorsqu'elles sont en contact avec des lymphocytes T mémoires. En particulier, la transmission du VIH, médiée par les cellules dendritiques, pourrait être dépendante des interactions des complexes CD40-CD40L et CD28-CD80 (Pinchuk et al., 1994). Par ailleurs, CTLA-4 bloque l'augmentation de l'infection (Pinchuk et al., 1994; Weissman et al., 1995) lors de l'interaction des deux types cellulaires, démontrant l'importance de l'activation. Cependant, il existe des différences selon l'état de maturation de la cellule, puisque seules des cellules dendritiques matures, sont capables de transmettre le virus sous la dépendance de CD80 (Weissman et al., 1995). Dans ce système interactif entre cellules T et cellules dendritiques, l'IL-2 augmente la multiplication du VIH, ce qui tend à prouver l'importance de la prolifération cellulaire dans l'observation de ce phénomène. Cependant, l'IL-12, qui active les cellules T, a des effets plus mitigés, puisqu'elle inhibe la multiplication virale à une faible concentration, et l'augmente à une forte concentration (Weissman et al., 1996). Dans ce même système, l'IL-10 diminue l'activation cellulaire et ainsi la multiplication virale. Une autre équipe précise que la présentation de l'antigène, par des cellules dendritiques infectées, aux cellules T au repos est nécessaire au processus de transmission virale (Tsunetsugu-

Yokota *et al.*, 1995). Ainsi, l'activation de la cellule T semble être un facteur important dans la capacité à moduler l'infection par le VIH.

Masurier *et al.* (1998) ont confirmé dans un modèle murin que les cellules dendritiques participent à la dissémination du virus, non seulement les virus à tropisme macrophagique, mais aussi les virus à tropisme cellulaire T, par leur migration dans les ganglions lymphatiques. Mais ce rôle majeur de propagation du virus ne nécessiterait pas une infection productive des cellules dendritiques (Masurier *et al.*, 1998) et ne dépendrait donc pas de la présence des corécepteurs sur les cellules dendritiques (Dybul *et al.*, 1998). Ce résultat a été confirmé *in vitro* par Granelli-Piperno *et al.* (1998). Les auteurs ont observé que l'infection des cellules dendritiques matures n'aboutit pas à une infection productive, contrairement à celle des cellules immatures. Mais en présence des cellules T blastiques, une forte augmentation de la multiplication virale est constatée. Récemment, il a été démontré que les cellules dendritiques sont également capables de transmettre le virus aux macrophages (Kacani *et al.*, 1998). Dans ce modèle, les cellules immatures transmettent plus efficacement le virus à tropisme M que les cellules dendritiques matures. Les auteurs soulignent l'importance des molécules d'adhésion, telles les intégrines, dans la facilitation de l'infection.

Il apparaît que des cellules dendritiques différenciées *in vitro*, expriment CXCR4 et CCR5 et sont ainsi infectables par les virus à tropisme macrophagiques et les virus à tropisme cellulaire T (Granelli-piperno *et al.*, 1996; Blauvelt *et al.*, 1997). En fait, Zaitseva *et al.* (1997) ont démontré que les cellules de Langerhans expriment CCR5 et non CXCR4, et sont seulement infectables, *in situ*, par un virus à tropisme macrophagique. Par contre, la maturation des cellules de Langerhans en cellules dendritiques matures, sous les conditions de la culture *in vitro*, leur permet d'acquérir une expression de surface de

CXCR4. Dans ce cas, l'acquisition de CXCR4 corrèle avec l'infectabilité par un virus à tropisme cellulaire T. Dans ce sens, il a été observé *in vitro* que les cellules dendritiques immatures différenciées à partir des cellules mononucléées du sang périphériques, sont infectables par un virus à tropisme M, alors que les cellules dendritiques matures sont infectables par les deux types de virus (Granelli-Piperno *et al.*, 1998).

3) Les monocytes/macrophages

Les macrophages sont des hôtes majeurs du VIH au niveau des tissus, tels les macrophages de la microglie ou les macrophages alvéolaires (Gendelman *et al.*, 1989). Les macrophages infectés chroniquement par le VIH, pourraient représenter un réservoir du virus qui persiste chez les patients dont la charge virale des lymphocytes T CD4+ a été réduite de façon importante par la combinaison d'antirétroviraux (Perelson *et al.*, 1997). Les macrophages pourraient aussi participer à la dissémination du virus à partir des sites d'infections, telles les voies rectales. Dans ce cas, les macrophages infectés dans les muqueuses amplifiaient l'infection en recrutant des cellules T non infectés, via la production de chimiokines (Hirsch *et al.*, 1998). En effet, il a été démontré que les macrophages produisent les chimiokines MIP-1 α et β , et RANTES lorsqu'ils sont infectés (Schmidtmayerova *et al.*, 1996). L'ensemble de ces événements dissémineraient l'infection et aboutiraient, à terme, à la maladie. Ce travail rejoint celui de Schrier *et al.* (1993) qui suggèrent que le contact avec les cellules T CD4+ aboutit à l'activation des macrophages et ainsi initie une multiplication virale. D'après les auteurs, l'initiation de la réponse à un antigène pourrait être responsable de la dissémination virale dans les tissus. La transmission du VIH est aussi favorisée lors de l'infection par un pathogène intracellulaire, comme

cela fût démontré lors de l'infection de macrophages par le *Mycobacterium tuberculosis* (Mancino et al., 1997). Dans ce cas, l'infection augmente la multiplication virale.

Récemment, une autre théorie a été émise par Wodarz et al. (1999). Les auteurs, en se basant sur un modèle mathématique, prédisent que l'infection des macrophages est essentielle pour l'établissement du virus lors des premières phases de l'infection. De plus, ce même travail aboutit à l'hypothèse que les macrophages, en tant que cellules réservoirs de virus à l'état latent, permettraient l'évolution du phénotype des VIH à tropisme macrophagique vers un tropisme cellulaire T plus virulent.

Comme pour les cellules dendritiques, l'état de maturation des monocytes/macrophages est un facteur important dans le processus d'infectabilité par les virus à tropisme M ou à tropisme T. En effet durant la maturation des monocytes en macrophages, l'expression de CCR5 augmente, et de ce fait, les macrophages sont plus susceptibles à l'infection par un virus à tropisme M, que les monocytes (Tuttle et al., 1998; Di Marzio et al., 1998). Inversement, l'expression de CXCR4 est plus importante sur les monocytes, par rapport aux macrophages (Di Marzio et al., 1998). L'expression de CCR5 corrèle bien avec la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 (Naif et al., 1998). Par contre, Schmidtmayerova et al (1998) et Simmons et al. (1998) ont observé que les macrophages sont infectables par un VIH à tropisme T. Néanmoins, les premiers auteurs observent une multiplication restreinte suite à la pénétration du virus dans la cellule. L'ensemble de ces résultats pourrait expliquer le tropisme préférentiel pour les virus à tropisme M dans les tissus.

D) Modulation de la multiplication virale.

En dehors des antiviraux classiques, d'autres stratégies de lutte ont été étudiées. L'une d'entre elles consiste à bloquer les corécepteurs du VIH par l'utilisation d'analogues des chimiokines (Baggiolini et Moser, 1997). En effet, les ligands naturels de CCR5 et CXCR4 sont capables d'inhiber la fixation du VIH aux cellules cibles.

Le ligand de CXCR4 (appelé également LESTR/Fusin) est la CXC chimiokine SDF-1. SDF-1 est capable d'inhiber la multiplication virale des virus à tropisme cellulaire T (Oberlin et al., 1996), en induisant l'internalisation de CXCR4 (Amara et al., 1997).

Les ligands de CCR5 sont les CC chimiokines RANTES, MIP-1 α et β (Moore et al., 1997), dont l'activité a été découverte dans le surnageant des cellules T CD8+ activées *in vitro*. Cette activité antivirale a été dénommée CAF pour "cell antiviral factor" (Mackewicz et al., 1995). Les chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β , et RANTES qui inhibent la multiplication des virus à tropisme macrophagiques dans les lymphocytes T, et l'IL-16 (Cocchi et al., 1995; Baier et al., 1995) sont effectivement sécrétées par ces lymphocytes T CD8+. Par ailleurs, les macrophages sont également capables de synthétiser MIP-1 α , MIP-1 β , et RANTES (Verani et al., 1997). Ces chimiokines agiraient par un phénomène de compétition avec le virus pour CCR5 (Oravec et al., 1996). Par contre, les virus à tropisme cellulaire T sont insensibles à l'action des β -chimiokines (Cocchi et al., 1995). Dans les macrophages, les β -chimiokines peuvent augmenter la multiplication virale (Schmidtmayerova et al., 1996), ou la diminuer (Verani et al., 1997; Capobianchi et al., 1998).

D'autres cytokines sont capables de moduler la multiplication virale dans les cellules présentatrices de l'antigène en fonction de leur

action immunomodulatrice, sur l'expression des récepteurs des chimiokines. Par exemple, l'augmentation de la multiplication virale dans les monocytes stimulés par l'IL-10 est concomitante à l'augmentation de l'expression de CCR5 (Sozzani *et al.*, 1998). L'inhibition de la multiplication virale dans des macrophages stimulés par l'IL-2 est concomitante à la diminution de CD4 et CCR5 (Kutza *et al.*, 1998). Ces travaux montrent l'importance de la modulation des corecepteurs et de CD4 dans le processus d'infectabilité des cellules.

Nous avons vu que l'action antivirale des chimiokines est incertaine, en particulier dans les macrophages. Ainsi, en vu d'un protocole immunothérapeutique, il est nécessaire d'examiner d'autres molécules qui exerceraient une activité antivirale, à la fois sur les lymphocytes T et sur les cellules présentatrices de l'antigène. C'est dans ce cadre que nous avons aborder l'étude de l'IL-16.

IV L'immunopathogénèse du VIH

A) La mort cellulaire programmée

1) Généralités

L'élimination physiologique des cellules durant l'embryogenèse et durant le maintien de l'homéostasie dans les tissus, est dénommée mort cellulaire programmée (PCD de l'anglais "programmed cell death") (Kerr *et al.*, 1972). La mort cellulaire programmée est principalement due à l'apoptose, un processus bien défini qui est précédé par une cascade de signaux intracellulaires et par la synthèse de nouvelles protéines. L'apoptose est donc un processus actif. La cellule qui commence à mourir se détache des cellules voisines, puis se désintègre de façon ordonnée: son noyau se condense, puis se fragmente, les chromosomes sont coupés en fragments régulier, et le cytoplasme se divise en ballonnets. La surface cellulaire prend un aspect bouillonnant, mais la membrane de la cellule ne se rompt pas, évitant toute libération de constituants intracellulaires toxiques dans l'environnement, ce qui différencie l'apoptose de la nécrose (Cohen, 1993). La cellule se divise en de multiples corpuscules cellulaires ou corps apoptotiques. La composition de la membrane cytoplasmique est altérée ce qui permet à la cellule ou aux corps apoptotiques d'être reconnues et phagocytées par les phagocytes voisins, tels que les macrophages et les cellules dendritiques.

L'apoptose peut contrôler la réponse à médiation cellulaire lors de conditions associées à une augmentation de l'activation cellulaire comme lors des infections virales. C'est ainsi que beaucoup de maladies virales, mais aussi les cancers et les maladies neurodégénératives, sont associées à une augmentation d'apoptose

(Thompson, 1995). De nombreuses molécules, exprimées à la surface des cellules ou intracellulaires, interviennent dans la régulation des processus d'apoptose. Dans notre travail, nous nous sommes intéressés au complexe Fas/Fas-ligand (Nagata, 1997).

2) L'interaction Fas/Fas-ligand

L'engagement de l'antigène avec son récepteur mène à la prolifération, aboutissant à des fonctions effectives et régulatrices, ou à la mort cellulaire par un processus d'apoptose. Russel *et al.* (1991) ont montré que les cellules activées pour une longue période deviennent sensibles à la mort induite par l'activation. Dans ce cas, la mort cellulaire peut dépendre de l'interaction de Fas et de son ligand, deux molécules de surface impliquées dans la régulation de la mort cellulaire programmée (Nagata, 1997). En effet, suite à l'activation des cellules T, celles-ci expriment le ligand de Fas, et sont ainsi sensibles à la mort induite par des anticorps anti-Fas (Alderson *et al.*, 1995). Dans un autre système, il a été montré que les monocytes, suite à la ligation de la molécule CD4, sont susceptibles d'exprimer Fas-ligand et ainsi d'induire la mort des lymphocytes T (Oyaizu *et al.*, 1997). De même, la sous-population de cellules dendritiques CD8+ qui exprime le ligand de Fas, est capable d'induire la mort cellulaire des lymphocytes T CD4+ via la voie Fas/Fas-L (Süss *et al.*, 1996). D'autres mécanismes sont responsables de la mort cellulaire consécutive à l'activation. Cela a été démontré *in vivo*, dans un modèle murin déficient dans l'expression de Fas, dans lequel il a été observé une apoptose massive suite à la prolifération des cellules T en réponse à des anticorps anti-CD3 (Tucek-Szabo *et al.*, 1996).

3) Apoptose ou mort cellulaire programmée dans l'infection par le VIH

L'hypothèse de l'induction d'une forme inappropriée de mort cellulaire programmée dans la pathogénèse du SIDA a été formulée par J.C. Ameisen et A. Capron en 1991. Elle est aujourd'hui vérifiée expérimentalement *in vitro* et *in vivo*. Les cellules de patients sont plus susceptibles à l'apoptose spontanée ou à la mort cellulaire induite par l'activation que les cellules d'un sujet non infecté (Groux *et al.*, 1992, Meyard *et al.*, 1992). Outre la mort des cellules CD4+, les cellules CD8+ présentent également une mort cellulaire accrue par rapport à celle observée chez des individus sains. Ces phénomènes de mort cellulaire semblent être en relation étroite avec la pathogénicité, comme il a été récemment démontré dans divers modèles simiens pour lesquels il est possible d'induire ou non un SIDA. Dans ce cas, seule l'apoptose des lymphocytes CD4+ serait corrélée à la pathogénicité (Estaquier *et al.*, 1994; Del Liano *et al.*, 1993, Davis *et al.*, 1998).

Les protéines d'enveloppe du VIH, ainsi que Tat et Nef semblent être impliquées dans l'induction de la mort cellulaire, (Foster *et al.*, 1995; McCloskey *et al.*, 1997; Fujii *et al.*, 1996). L'un des mécanismes pouvant expliquer l'apoptose accrue chez les patients inclut le complexe Fas/FasL détecté dans le sérum des patients, et dont la présence est élevé à la surface des cellules T (Estaquier *et al.*, 1995; Bahr *et al.*, 1997). Mais l'implication de la molécule de mort cellulaire, CD95 ou Fas, dans la pathogénicité est encore incertaine (Kaplan et Sieg, 1998). Pour certains, la liaison de Fas avec son ligand Fas-L est primordiale dans l'apoptose excessive observée lors de l'infection par le VIH. En effet, les protéines Tat et gp120 sensibilisent les cellules à l'apoptose en induisant l'expression de Fas (Westendorp *et al.*, 1995). L'expression de Fas-L à la surface des macrophages infectés est susceptible de provoquer le suicide cellulaire des cellules avoisinantes qui expriment

Fas (Badley *et al.*, 1997), ce qui conforte les travaux de Finkel *et al.* (1995) qui proposent que l'apoptose est induite, dans les ganglions lymphatiques, de façon prédominante dans les cellules avoisinantes et non au niveau des cellules infectées. Pour d'autres, le VIH peut directement éliminer les cellules par un mécanismes Fas-indépendant (Gandhi *et al.*, 1998). D'autre part, les tentatives d'inhiber l'apoptose des cellules, provenant de sujets infectés, par des produits bloquant la voie du signal de Fas a abouti soit à une absence d'inhibition de la mort de lymphocytes T CD4 induite par les anticorps anti-CD3 (Katsikis *et al.*, 1996), soit à la démonstration que les cellules CD4+ sont sensibles à la mort cellulaire via Fas (Estquier *et al.*, 1996)

Finalement, il a été suggéré que l'activation chronique du système immunitaire pouvait être le mécanisme responsable de la mort cellulaire programmée chez les patients (Gougeon *et al.*, 1996), et que la perte des lymphocytes T CD4+ au cours de la phase précoce de l'infection serait plutôt due à un défaut de renouvellement des cellules T (Fleury *et al.*, 1998).

4) Modulation de l'apoptose par la ligation de CD4

La plupart des protéines du VIH sont capables de moduler l'activité des cellules T et des monocytes, mais nous nous intéresserons plus particulièrement à la glycoprotéine d'enveloppe, la gp120 qui lie CD4. Différents phénotypes ont été observées suite à la liaison de gp120 avec la molécule CD4.

Le prétraitement des cellules T par des anticorps anti-CD4 ou la gp120 conduit les cellules dans un processus de mort cellulaire programmée lorsqu'elles sont activées via le complexe TCR/CD3 (Newell *et al* 1990; Banda *et al.* 1992). Mais Oyaizu *et al.* (1993) et Algeciras *et*

al. (1998) suggèrent que la ligation de CD4 est suffisante pour induire l'apoptose des PBMC. L'induction de l'apoptose dans des PBMC via la ligation de CD4 a été infirmée par Foster *et al.* (1995). Cependant, ces derniers ont montré que contrairement aux cellules au repos, dont la ligation de CD4 n'aboutit pas à l'apoptose, des cellules activées sont sensibles à la ligation de CD4 par un complexe gp120/anti-gp120. Un autre travail montre que la ligation de CD4 par la gp120 inhibe la mort induite par des anticorps anti-CD3 ou par un superantigène (Oberg *et al.*, 1997). Les auteurs mettent en évidence que parmi les clones T étudiés, les cellules ont des sensibilités différentes à la ligation de CD4. De plus, ils observent l'inhibition de l'apoptose uniquement à des doses faibles de stimulateurs. *In vivo*, Finco *et al.* (1997) ont démontré, dans des souris doublement transgéniques pour la molécule CD4 humaine et la gp120, une immunodéficience de la réponse des cellules T, due à une plus grande sensibilité à l'apoptose. Les auteurs soulignent l'importance de la présence d'anticorps anti-gp120 dans ce processus. L'ensemble de ces résultats contradictoires démontrent la complexité de la modulation de l'activation cellulaire T via la ligation de la molécule CD4, et démontrent l'importance du système étudié et de l'état d'activation des cellules T.

Il a été démontré que gp120 augmente la sensibilité des cellules T à l'apoptose via l'augmentation de Fas (Westendorp *et al.*, 1995) ou la diminution de Bcl-2 (Hashimoto *et al.*, 1997). Des cellules T au repos, soumis à la ligation de CD4 par le complexe gp120/anti-gp120, expriment fas-ligand et sont ainsi susceptibles à la mort induite par fas, mais aussi à la mort induite par le TNF (Algeciras *et al.*, 1998). L'augmentation de l'expression de Fas, consécutive à la ligation de CD4, pourrait être due à la synthèse du TNF- α et de l'interféron- γ (Oyaizu *et al.* 1994).

B) Le monoxyde d'azote dans l'infection par le VIH.

Le rôle du monoxyde d'azote dans les effets neuropathologiques consécutifs à l'infection par le VIH est bien établi (Adamson et al., 1996; Buckrinsky et al., 1995). Mais son rôle dans le dysfonctionnement du système immunitaire n'est pas démontré. Pourtant, la gp120 et l'infection par le VIH, *per se*, augmentent la production de monoxyde d'azote par les macrophages (Pietraforte et al., 1994; Buckrinsky et al., 1995). Mais Buckrinsky et al. (1996) n'ont pas détecté de rôle antiviral du NO° et au contraire une légère augmentation de la multiplication virale en présence d'un inhibiteur de la synthèse du monoxyde d'azote. Par contre, Ouaaz et al. (1996) suggèrent une action du NO° dans l'augmentation de la multiplication virale. Cependant, ces derniers ont travaillé sur une lignée monocytaire chroniquement infectée. De plus, malgré l'inhibition de la multiplication virale par un inhibiteur de la NO-synthase, les auteurs attribuent un rôle plus important aux peroxynitrites, par rapport au NO°, dans la modulation de l'infection.

Un rôle du NO° dans le sida a été suggéré par l'observation que l'augmentation de la production de monoxyde d'azote, observée chez les patients, est corrélée avec la charge virale et l'état d'activation des macrophages (Groeneveld et al., 1996). Mais la présence de NO° dans le sérum des patients reste conflictuelle, et semble dépendre du stade de la maladie. En effet, De Braco et al. (1997) ont trouvé une production de NO° élevé chez les patients infectés n'étant pas au stade sida. Au contraire, une production accrue de NO° a été observé uniquement dans le sérum de patients au stade sida (Torre et al., 1995; Baldewerg et al., 1996) et dans les patients dont le nombre de lymphocytes T CD4+ est inférieure à 500/ μ l (Zangerle et al., 1995). Mais Zangerle n'attribue pas la production de NO° à un effet direct du VIH. Au contraire, Evans et al.

(1994) n'ont pas détecté de modulation de la quantité de NO°, par rapport à des sujets sains et Torre *et al.* (1996) suggèrent une action du NO° dans la limitation de l'infection.

La présence de NO°, lorsqu'elle est observée dans le sérum, est difficile à interpréter. En effet, nous ne pouvons pas déterminer si ces observations résultent d'un effet direct du VIH, via la gp120, sur la production du NO°, ou de l'activation du système immunitaire consécutive à l'immunité non spécifique. De plus, les résultats de Buckrinsky et de Ouaaz sur le rôle du NO° dans la modulation de la multiplication virale n'apportent pas de réponse définitive. Le rôle du NO° sur la modulation de l'infection, mais aussi sur l'apoptose excessive, observé dans la maladie du sida, n'est donc pas établi.

V) L'IL-16: le ligand naturel de CD4

A) La molécule CD4

La molécule CD4 est une glycoprotéine de surface qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Le gène codant pour cette protéine 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.

La molécule CD4 est un monomère qui possède quatre domaines équivalent à la structure des immunoglobulines, une partie transmembranaire et une queue cytoplasmique (Maddon *et al.*, 1985). La molécule CD4 est exprimée sur une population de lymphocytes T et de thymocytes, mais aussi les monocytes, les macrophages ou encore les cellules dendritiques. La molécule CD4 se lie au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Konig *et al.*, 1992) afin d'améliorer la réponse des cellules T, et ce en tant que molécule d'adhésion (Doyle et Strominger, 1987) ou en tant que molécule qui renforce le complexe ternaire entre le récepteur T, la molécule de CMH et l'antigène (Janeway, 1992). L'interaction de la molécule CD4 avec la molécule de CMH de classe II est importante pour la sélection thymique, durant le développement des cellules T. Elle est également importante pour le processus d'activation des lymphocytes T adultes, où elle se trouve être physiquement liée au récepteur T (Janeway, 1992; Saizawa *et al.*, 1987).

B) L'IL-16

1) Origine cellulaire

L'interleukine-16 a été décrite pour la première fois en 1982 par Center et Cruikshank. Le nom originel était LCF pour "Leucocyte chemoattractant factor", car il induisait la migration des lymphocytes. L'interleukine-16 a d'abord été identifiée comme un facteur produit par les cellules T CD8+ activées, soit par des mitogènes, soit par des amines vasoactives comme l'histamine et la sérotonine (Laberge *et al.*, 1995; Laberge *et al.*, 1996). L'IL-16 est détectée essentiellement dans les tissus lymphoïdes, précisément les cellules mononucléées du sang périphérique, la rate, les ganglions lymphatiques, et le thymus (Chupp *et al.*, 1998). Les cellules CD8+ expriment constitutivement l'ARN messager et le précurseur de l'IL-16, et l'IL-16 est stockée sous une forme active dans les lymphocytes au repos. Les lymphocytes T CD4+ expriment également l'ARNm et le précurseur de l'IL-16, mais la chimiokine n'est pas stockée sous forme active dans la cellule. Cependant, elle est sécrétée après stimulation (Wu *et al.*, 1999). Les éosinophiles (Lim *et al.*, 1996) et les mastocytes produisent aussi l'IL-16 (Rumsaeng *et al.*, 1997). Enfin, dans certains modèles d'asthmes, il a été suggéré que les cellules épithéliales, activées par l'histamine (Arima *et al.*, 1995), pouvaient produire de l'IL-16 au niveau des sites inflammatoires (Labege *et al.*, 1997).

2) Structure

Le gène de l'IL-16 code pour une protéine active de 130 acides aminés, d'environ 14 kD, sécrétée à partir d'un précurseur de 631 acides aminés (70-80 kD) clivé par la protéase Caspase-3 (Zhang *et al.*, 1998).

Cependant, une forme plus petite (121 acides aminés) a été décrite et l'absence de peptide signal confère à l'IL-16 un processus de sécrétion inconnu (Baier *et al.*, 1997). Il existe une forte homologie entre l'IL-16 humaine, simienne (Baier *et al.*, 1995) et murine (Keane *et al.*, 1998). Mais la séquence en acide aminé de l'IL-16 ne présente aucune homologie avec les autres cytokines ou les autres membres de la famille des chimiokines. Par contre, la structure tridimensionnelle de l'IL-16 montre l'existence d'un domaine PDZ, similaire aux modules de certaines protéines intracellulaires qui permettent le regroupement des canaux ioniques ou des récepteurs afin d'optimiser le signal intracellulaire. L'activité de l'IL-16 réside dans sa partie hydrophile proche de la terminaison carboxyle (Keane *et al.*, 1998). A faible concentration ($0,1\mu M$) *in vitro*, l'IL-16 forme de façon prédominante des monomères, avec une aggrégation non spécifique lorsque les concentrations sont augmentées (Mühlahn *et al.*; 1998). Il a été suggéré que l'activité de l'IL-16 nécessite une homotétramérisation (Center *et al.*, 1996), mais récemment Mühlahn *et al.* (1998) ont observé que les formes monomériques de l'IL-16 sont capables d'avoir une activité chimioattractante. Les relations entre la structure de l'IL-16 et son activité biologique ne sont donc pas encore bien comprises.

3) Activation cellulaire

a) Signaux intracellulaires

La molécule CD4 représente le récepteur naturel de l'IL-16. Il a été déterminé que l'effet attractif de la cytokine est proportionnel au nombre de molécules CD4 exprimées à la surface des cellules (Cruikshank *et al.*, 1987) et que l'expression de CD4 est associée avec l'activité biologique (Cruikshank *et al.*, 1994). Ainsi, l'IL-16 exerce une

activité chimioattractante sur les lymphocytes (Center et Cruikshank, 1982), les monocytes (Cruikshank *et al.*, 1994) et les éosinophiles (Rand *et al.*, 1991).

L'interaction entre l'IL-16 et CD4 permet l'activation de seconds messagers. En effet, dans les lymphocytes et les monocytes il a été observé une augmentation de calcium intracellulaire, d'inositol (1,4,5)-triphosphate (IP₃), accompagné de la phosphorylation de CD4 et de p56^{Lck} (Cruikshank *et al.*, 1991, Ryan *et al.*, 1995). La transmission du signal migratoire ne requiert pas l'activité enzymatique de lck, mais réside plutôt dans les domaines SH2/SH3 qui permettent le recrutement et l'association avec d'autres voies intracellulaires. Finalement, la stimulation de l'IL-16 active la voie de la protéine kinase C (Parada *et al.*, 1996).

Récemment, il a été démontré (Krautwald *et al.*, 1998) que la liaison de l'IL-16 à la molécule CD4 présente à la surface des macrophages permet l'activation, bien que ces cellules ne possèdent pas la protéine p56^{Lck}, du facteur de transcription c-Jun, membre de la famille des protéines kinases du stress (SAPK), et de la MAPK p38. Ceci permet à l'IL-16 de rejoindre, par ses caractéristiques, d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-1 β . Les implications de l'activation de cette voie ne sont pas encore connues, cette étude étant la seule qui traite de l'action de l'IL-16 sur les macrophages.

b) IL-16 et chimiotactisme

Contrairement à la plupart des chimiokines, l'IL-16 agit à la fois sur les cellules au repos et les cellules activées (Kornfeld *et al.*, 1985). Cette activité a été confirmée *in vivo* dans des modèles inflammatoires impliquant des infiltrats de lymphocytes T CD4+

(Cruikshank *et al.*, 1995; Labege *et al.*, 1997). Par exemple, l'IL-16 a été identifiée dans les liquides de lavages bronchoalvèolaires de sujets asthmatiques. On retrouve, dans ce cas, une corrélation entre la présence de l'IL-16 et le nombre de lymphocytes CD4+. De même, dans le modèle de l'arthrite rhumatoïde, l'IL-16 produite par les fibroblastes synoviaux serait responsable de l'attraction des lymphocytes T CD4+ sur le site inflammatoire (Franz *et al.*, 1998). L'IL-16 serait aussi impliquée dans l'augmentation des IgE, un mécanisme important dans l'allergie (Hessel *et al.*, 1998).

c) IL-16 et activation cellulaire

La stimulation des lymphocytes T CD4+ par l'IL-16 favorise le passage dans le cycle cellulaire de la phase G0 à la phase G1, et l'expression du récepteur de l'IL-2 (Cruikshank *et al.*, 1994). Cependant, les cellules ne synthétisent pas l'IL-2, et ainsi ne parviennent pas à progresser plus en avant dans le cycle. D'autre part, l'IL-16 inhibe la réaction lymphocytaire mixte (Theodore *et al.*, 1996) et de façon similaire l'activation induite par des anticorps anti-CD3 (Cruikshank *et al.*, 1996), et ce lorsque l'IL-16 est incubée avec les cellules avant la stimulation. Dans ce cas, l'IL-16 inhibe l'expression du récepteur de l'IL-2 induite par l'activation via le complexe du récepteur T à l'antigène et la production d'IL-2 (Ogasawara *et al.*, 1999). Par contre, la stimulation alternée et à long terme de lymphocytes quiescents, par l'IL-16 et l'IL-2, résulte en l'augmentation du nombre de cellules CD4+ (Parada *et al.*, 1998). L'intérêt de cette étude est important dans le cadre d'une thérapeutique dans le sida, mais n'apporte pas d'explications physiologiques de ce type de combinaison.

Enfin, la stimulation des monocytes et des éosinophiles par l'IL-16 induit la mobilité cellulaire, accompagnée de l'augmentation de

l'adhésion à la matrice extracellulaire pour les éosinophiles (Wan *et al.*, 1995) et de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes (Cruikshank *et al.*, 1987).

Il a été déterminé que l'activité inhibitrice de l'IL-16 sur l'activation cellulaire est étroitement corrélée avec sa capacité à induire la migration cellulaire. Ainsi il apparaît que la molécule CD4 joue deux rôles différents:

- dans un premier temps elle accroît l'adhésion cellulaire par son interaction avec le complexe majeur d'histocompatibilité, dépendante de l'antigène, et ainsi l'activation de la cellule T.
- dans un deuxième temps, et indépendamment de l'antigène, via l'IL-16, CD4 participe à la régulation de la réponse inflammatoire.

Cruikshank et Center suggèrent que l'IL-16 contribue, de façon indépendante de l'antigène, au recrutement cellulaire sur les sites inflammatoires. Les cellules recrutées seraient alors réfractaires à l'activation par l'antigène. Le nombre de cellules effectives serait ainsi plus élevé, car moins susceptibles à la mort induite par l'activation. Dans ce sens, il a été montré que l'IL-16 prévient l'apoptose induite par l'activation par les anticorps anti-CD3, en réduisant l'expression de Fas (Cruikshank *et al.*, 1996).

C) IL-16 et VIH

De manière intéressante, l'IL-16 inhibe la multiplication du virus de l'immunodéficience humaine dans les lymphocytes du sang périphérique de sujets sains infectés *in vitro* (Baier *et al.*, 1995). Cette équipe et nous même avons travaillé avec une IL-16 recombinante, dont la forme majoritairement produite (>90%) dans la bactérie est la forme monomérique, avec une auto-aggrégation qui aboutit à la formation d'un

homotétramère non covalent (Muhlhahn *et al.*, 1998). En ce qui concerne l'activité anti-rétrovirale de l'IL-16, les résultats d'une autre équipe indiquent, sans préciser sa forme, que la chimiokine est incapable d'inhiber la multiplication virale dans des PBMC de patients infectés (Gao *et al.*, 1997). Depuis, notre équipe a obtenu des résultats contraires sur les PBMC de patients (Amiel *et al.*, 1999), avec une IL-16 également produite dans le système bactérien, qui ne contient que 2 à 10% de formes tétramériques.

Par contre, les formes recombinantes de l'IL-16 obtenues par des cellules humaines sont mille fois plus efficaces (1-10ng/ml). En particulier, lorsque le gène codant pour l'IL-16 humaine est transfecté de façon stable dans des cellules Jurkatt, la multiplication du virus est inhibée par un mécanisme prépondérant d'inhibition de la synthèse de l'ARN viral (Zhou *et al.*, 1997). De plus, par sa liaison avec CD4, l'IL-16 est capable de transduire un signal capable de réprimer l'activité du promoteur du VIH (Maciaszek *et al.*, 1997) dans des cellules lymphoïdes activées par le PMA et la protéine virale tat. Les auteurs suggèrent que l'IL-16 induit l'expression d'un répresseur transcriptionnel.

Le rôle anti-viral de l'IL-16 a également été suggéré par l'étude de clones T, provenant de sujets infectés stable et ne progressant pas vers la maladie (LNTP de l'anglais "Long term non progressors"), capables de produire de façon importante l'IL-16, mais aussi d'autres chimiokines telles que MIP-1 α et β , et RANTES (Scala *et al.*, 1997). Cependant, il n'a pas été constaté une activité antivirale plus importante chez ces sujets, impliquant l'existence d'autres facteurs. Par ailleurs, le taux circulant des chimiokines citées ci-dessus, mais surtout celui de l'IL-16 augmente chez des sujets traités par une molécule antirétrovirale, l'indinavir (Bisset *et al.*, 1997). Dans ce travail, l'augmentation du niveau des chimiokines est associée à la

diminution de la charge virale plasmatique. Dans notre laboratoire, Amiel *et al.* (1999) ont détecté une présence significativement plus importante d'IL-16 dans le sérum des patients asymptomatiques, par rapport à des sujets sains ou des sujets ayant progressé vers le stade sida. Ce résultat suggère un rôle de l'IL-16 dans la limitation de la charge virale au cours de la phase asymptomatique. Au contraire, Müller *et al.* (1997) ne retrouve pas d'augmentation significative d'IL-16 dans le sérum de patients par rapport à des sujets sains. Cette contradiction peut-être expliquée par l'absence de distinction des différents sous-groupes de malades dans le second travail.

C'est dans ce contexte que nous avons abordé l'étude de l'activité immunologique et antivirale de l'IL-16, jusqu'à présent inconnue, dans les macrophages et les cellules dendritiques. De plus, des contradictions apparaissent puisqu'il a été montré que l'IL-16 est capable d'inhiber l'apoptose des cellules T (Cruikshank *et al.*, 1996), ce qui n'a pas été confirmé par Oberg *et al.* (1997). Nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'IL-16 dans la modulation de l'apoptose des cellules T issus de sujets sains et de patients.

OBJECTIFS

Il semble aujourd’hui admis que les lymphocytes T CD4+ quiescents sont les cellules réservoirs majeures du VIH (Chun *et al.*, 1998; Perelson *et al.*, 1998). Néanmoins, les macrophages et les cellules dendritiques sont également considérées comme des cellules importantes dans la pathogénèse. Elles représentent des réservoirs du virus (Gendelman *et al.*, 1989), des cibles majeures dans les muqueuses et des vecteurs de la propagation de l’infection (Spira *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1998). L’ensemble des cellules réservoirs constituent un problème pour une thérapie efficace. Par exemple, les macrophages sont moins sensibles à l’action des inhibiteurs de protéase (Perno *et al.*, 1998). L’une des conséquences est la remontée rapide de la charge virale si ces molécules ne sont plus présentes. En effet, il apparaît que les combinaisons de molécules anti-rétrovirales non seulement entraînent de nombreux effets secondaires, mais aussi soient insuffisantes pour éradiquer complètement le VIH. D’autres molécules sont à l’étude, mais l’utilisation de molécules immunomodulatrices apparaît désormais importante pour combattre le VIH. Ces protocoles immunothérapeutiques pourraient permettre de combattre l’infection et de reconstituer le système immunitaire. Parmi ces molécules, l’IL-2 a déjà été utilisée dans certains essais cliniques, et l’on étudie maintenant la possibilité d’utiliser des analogues des chimiokines afin de bloquer la pénétration du virus dans la cellule. Avant d’envisager une utilisation chez l’homme, toute molécule à visée thérapeutique nécessite une évaluation *in vitro* et dans des modèles expérimentaux *in vivo*. Notre travail a consisté à évaluer l’activité de l’IL-16 *in vitro*.

La gp120 du VIH est capable de moduler les fonctions effectives (Chaturvedi et Newman, 1997) et sécrétrices (cytokines)

(Merrill *et al.*, 1989; Taoufik *et al.*, 1997) des macrophages. De plus, un travail récent a montré que l'IL-16 est capable d'activer dans les macrophages les voies de signalisation impliquées dans le stress (Krautwald *et al.*, 1998). L'activité des macrophages est donc modulable par la ligation de la molécule CD4. Mais l'activité immunologique de l'IL-16 sur les cellules présentatrices de l'antigène reste inconnue. Notre premier travail consiste donc à évaluer l'activité de l'IL-16 sur ces cellules. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de l'IL-16 sur la modulation de récepteurs de surface caractéristiques des macrophages (CD14) et des cellules dendritiques (CD1a et CD83), des molécules costimulatrices (CD80 et CD86), du récepteur de l'IL-2 (CD25) et de la molécule Fas. Nous avons aussi évalué le profil de cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-6) et anti-inflammatoires (IL-1RA, IL-10) produit suite à la stimulation par l'IL-16. Il a été suggéré que la modulation des récepteurs du VIH dans les macrophages influence la pénétration du virus. Ce premier travail a donc été accompagné par l'étude de l'effet de l'IL-16 sur l'expression de CD4 et des corécepteurs du VIH, CXCR4 et CCR5. La production des chimiokines MIP-1 α et RANTES a aussi été évaluée.

Dans notre introduction, nous avons vu que plusieurs travaux suggèrent un rôle de l'IL-16 dans le contrôle de l'infection. Mais l'activité antivirale de l'IL-16 dans les macrophages et les cellules dendritiques reste inconnue. Suite à nos résultats, nous avons étudié, dans la deuxième partie de notre travail, l'effet de l'IL-16 sur la multiplication du VIH dans les macrophages et les cellules dendritiques.

La ligation de CD4 par des anticorps anti-CD4 ou la gp120 peut moduler la multiplication virale dans les lymphocytes T (Tremblay *et al.*, 1994; Than *et al.*, 1997) mais aussi l'apoptose des cellules T (Newell *et al.*, 1990; Banda *et al.*, 1992). Au moment où nous avons commencé

notre étude sur l'IL-16, les travaux précédent étaient conflictuels, que ce soit sur l'activité anti-virale (Baier *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1997) ou l'activité anti-apoptotique de l'IL-16 (Cruikshank *et al.*, 1996; Oberg *et al.*, 1997). De plus, l'IL-16 produite dans un système bactérien est hétérogène et se présente sous formes tétramériques, dimériques ou monomériques. L'activité chimiotactique de l'IL-16 est contenue dans les formes tétramériques pour Center (1996), mais se retrouve aussi dans les formes monomériques pour Muhlahn (1998). La troisième partie de nos résultats évalue l'activité anti-virale de l'IL-16 sur les deux formes de tropisme virale, M et T, et l'élargit à l'étude de l'activité respective des différentes structures de la chimiokine.

Notre travail a été accompagné par l'étude de la modulation de l'apoptose des cellules T issues de patients, travail qui n'avait pas été effectué. A cette fin, plusieurs type d'activateurs ont été utilisés, spécifiques du récepteur T (anticorps anti-CD3), un mitogène (Phytohémagglutinine ou PHA), un glucocorticoïde de synthèse, inducteur d'apoptose, et enfin des anticorps anti-Fas, également inducteur d'apoptose. L'activité de l'IL-16 sur l'expression de Fas a également été étudiée.

Parallèlement, nous avons également étudié le rôle du monoxyde d'azote dans la pathogénèse du VIH. Selon les conditions expérimentales, cette molécule a des effets bénéfiques ou néfastes. Cette dichotomie de fonction est retrouvée lors des études sur des macrophages infectés par le VIH (Buckrinsky *et al.*, 1995; Ouaaz *et al.*, 1996), dans lesquels la modulation par le NO° de la multiplication virale n'est pas définitivement établie. De nombreux travaux suggèrent que la synthèse de NO° est augmentée suite à l'infection, sans démontrer l'origine cellulaire de la production de monoxyde d'azote. Le rôle du NO°

dans l'immunodéficience qui caractérise les sujets infectés par le VIH n'est donc pas connu. Notre travail a consisté à déterminer la capacité du NO° à moduler la multiplication du VIH dans les macrophages, à l'aide de molécules donneuses de NO° et d'inhibiteurs de la NO-synthase. La capacité du NO° à moduler l'apoptose est également conflictuelle et semble dépendre non seulement des conditions expérimentales, mais aussi de l'état d'activation des cellules cibles. Lors de l'infection par le VIH, les cellules du système immunitaire sont dans un état d'activation chronique et sont sensibles à l'apoptose. L'effet du monoxyde d'azote sur l'apoptose des cellules T issus de patients est inconnu. Nous avons désiré connaître l'éventualité d'un rôle du monoxyde d'azote dans la pathogénèse du VIH, via sa capacité à moduler l'apoptose des cellules T.

RESULTATS 1

Recombinant Interleukin-16 selectively modulate surface receptor expression and cytokine release in macrophages and dendritic cells.

Emmanuel Hermann, Edith Darcissac, Thierry Idziorek, André Capron,
George M. Bahr

Immunology (sous presse)

OBJECTIFS

Les macrophages et les cellules dendritiques ont un rôle majeur dans la pathogénèse du sida. En effet, leur présence dans les muqueuses donne au virus la possibilité de "pénétrer" le système immunitaire. Les macrophages et les cellules dendritiques sont certainement les premières cellules infectées. De plus, elles participent à la dissémination des virions dans les autres organes lymphoïdes. Finalement, de par leur faible capacité à se diviser, elles procurent un réservoir non négligeable de provirus à l'état latent. De façon surprenante, peu ou pas d'études ont été réalisées pour évaluer l'activité de l'IL-16 sur les macrophages et les cellules dendritiques, bien qu'elles expriment la molécule CD4, le récepteur physiologique de l'IL-16. L'étude qui suit présente les effets immunologiques de l'IL-16 sur les deux types de cellules présentatrices d'antigène. A cette fin, nous avons étudié les effets de l'IL-16 sur l'expression de molécules de surface, l'expression des ARN messagers de CCR5 et CXCR4, et la production de cytokines.

RESULTATS

Nos résultats montrent des différences dans la réponse des macrophages et des cellules dendritiques suite à l'action de l'IL-16:

- 1) L'expression de surface de la molécule costimulatrice CD80 est augmentée par l'IL-16 dans les macrophages. Par contre, l'expression de CD86 est légèrement diminuée. Aucun effet significatif ne sont observées sur l'expression des deux molécules costimulatrices dans les cellules dendritiques.

- 2) L'expression de la molécule CD4 est diminuée par l'IL-16 dans les macrophages. La régulation se situe à un niveau transcriptionnel puisque la diminution de CD4 se retrouve au niveau de son ARN messager.
- 3) L'IL-16 diminue l'expression de l'ARN messager de CCR5 dans les deux types cellulaires, mais de façon transitoire dans les cellules dendritiques. En effet, contrairement aux macrophages, l'inhibition n'est pas observée après 24 heures d'incubation avec l'IL-16. Nous observons aussi que l'interleukine-16 diminue de façon transitoire l'ARN messager de CXCR4 dans les deux populations cellulaires. Nous remarquons, avec intérêt, des effets additifs, mais non significatifs, sur l'expression des corécepteurs dans les macrophages lorsque l'IL-16 et l'IL-2 sont combinées.
- 4) Le profil de cytokines est différent, avec en particulier une importante sécrétion de MIP-1 α par les macrophages.

L'IL-16 possède donc une activité immune sur les macrophages et les cellules dendritiques, qui se concrétise par la modulation de certains récepteurs de surface (CD25, CD80, CD4 pour les macrophages; CD25, CD83 pour les cellules dendritiques), par la modulation différentielle des récepteurs de chimiokines, et par la sécrétion de Mip-1 α pour les macrophages. L'article discute des éventuelles implications de l'IL-16 dans les mécanismes d'inflammation. La diminution de CCR5 et CXCR4, nous encourage à étudier l'activité de l'IL-16 sur la multiplication virale dans les macrophages et les cellules dendritiques.

SUMMARY

Interleukin-16 (IL-16), a natural ligand for the CD4 receptor, has been found to modulate T lymphocyte function and to inhibit human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication. Antigen-presenting cells (APCs) including macrophages and dendritic cells are known to express functional surface CD4 molecules, to be susceptible to HIV-1 infection and to play a critical role in different immune processes. Therefore, we have evaluated the ability of recombinant IL-16 (rIL-16) to regulate receptor expression and cytokine release in monocyte-derived macrophages (MDMs) and monocyte-derived dendritic cells (MDDCs). rIL-16 was found to upregulate CD25 and CD80 but to downregulate CD4 and CD86 surface expression in MDM cultures. However, no change could be observed on the level of CD4, CD80 and CD86 expression in IL-16 -stimulated MDDCs although, a significant upregulation of CD25 and CD83 was consistently detected. Furthermore, the level of gene expression of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 was significantly reduced in rIL-16-treated MDMs and co-stimulation with IL-2 did not modify the activity of the recombinant cytokine. The effects on chemokine receptor gene expression were less evident in MDDCs and only a transient downregulation of weak intensity could be detected following stimulation with rIL-16. Analysis of supernatants from rIL-16-stimulated cultures revealed a different profile of released cytokines/chemokines among the two cell populations studied. These findings establish an important role for IL-16 in modulating the activity of APCs and may have relevance to the protection of reservoir cells against HIV-1 infection.

INTRODUCTION

IL-16 is a pleiotropic cytokine secreted mainly by CD8 T cells and has chemoattractant activity on CD4-positive lymphocytes, monocytes and eosinophils (1). Following binding to the CD4 receptor on lymphocytes, IL-16 induces an increase in intracellular Ca^{2+} and inositol triphosphate levels as well as the phosphorylation of the CD4 molecule (2). IL-16 has been reported to enhance IL-2 receptor expression but to inhibit the lymphoproliferative responses induced by allogeneic mixed lymphocyte reactions or by anti-CD3 antibodies (3, 4, 5). In long-term lymphocyte cultures, this chemoattractant cytokine was found to induce the release of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and to synergise with IL-2 in the expansion of CD4 T cells (6). In addition, rIL-16 corresponding to the C-terminal 130 amino acids of the natural molecule, has been recently reported to inhibit HIV-1 replication in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from infected subjects (7).

Among the APCs, macrophages and dendritic cells are known to express the CD4 receptor and to be susceptible to infection with HIV-1. These cells also express the major HIV coreceptors CCR5 and CXCR4 and are believed to act as reservoirs for virus dissemination (8, 9, 10, 11). Although the modulation of T cell activity by IL-16 has been well studied, no or very limited knowledge is currently available on the effects of IL-16 on dendritic cells or on macrophages, respectively. Recently, rIL-16 was reported to activate the stress-activated protein kinase signalling in human macrophages (12). In an attempt to understand the role of IL-16 in regulating the activity of APCs, we have analysed the changes induced on the expression of a battery of receptors that mediate accessory cell function (CD80, CD86), that are cell type specific (CD14, CD1a and CD83) or that are required for HIV-1 entry (CD4, CCR5 and CXCR4). Moreover, the ability of rIL-16 to induce the release of representative inflammatory and HIV-enhancing cytokines, of anti-inflammatory cytokines and of HIV-suppressive β -chemokines, has been examined. Our results demonstrate different effects of the recombinant cytokine on the two cell populations studied with a marked and selective downregulation of CD4 and CCR5 expression in macrophages. The presented findings are discussed in the context

of a potential role of IL-16 in regulating the immune and inflammatory functions of APCs and the control of HIV replication in reservoir cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents used.

Murine anti-human monoclonal antibodies (CD4-PE, CD95-PE, CD1a-PE, CD3-PE, CD83-PE, CD25-PE, CD14-FITC, CD80-FITC, CD86-PE and their matched isotypes) used for cytofluorimetric detection were purchased from Immunotech (Marseille, France), except for CD86-PE which was obtained from Pharmingen (San Diego, CA). Human recombinant tumor necrosis factor- α (rTNF- α), rIL-4 and rIL-2 were purchased from R&D systems Europe. Human rGM-CSF was provided by Sandoz Pharma (Basel, Switzerland). Recombinant rat IL-5, produced in E.Coli, was kindly provided by Dr. J. Khalife (Institut Pasteur de Lille, France) and was used as a control of an irrelevant recombinant protein.

Preparation of rIL-16

rIL-16 was produced and purified as previously described (13). The histidine-tagged 130 amino acid protein produced in E. Coli was rendered endotoxin-free (<0.125 endotoxin unit/10 μ g protein) by passages over polymyxin-B columns (Pierce, Montluçon, France). Using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and Comassie blue staining, rIL-16 was found to migrate as a single band of 20 kilodalton and to be >95% pure. Only 2-10% of rIL-16 corresponded to the active homotetrameric form, whereas the rest of the protein was found as inactive monomers or homodimers (13). The concentration of rIL-16 presented throughout the study was 10 μ g/ml of total protein (corresponding to 0.5 μ g/ml of homotetrameric form). This concentration was the highest to induce measurable effects and to be free of endotoxin contaminants. Lower concentrations of 3 and 1 μ g/ml were evaluated in 4 separate experiments and were found to produce weaker and dose-dependent effects.

Culture condition:

PBMCs were isolated from heparinized blood samples by Ficoll-HyPaque density gradient centrifugation (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Monocytes were obtained by adherence as previously described (14). They were allowed to differentiate into macrophages after 5-7 days culture in RPMI containing 10% human AB serum. MDDCs were obtained by culturing

monocytes for 7 days in medium supplemented with 1000U/ml of rGM-CSF, 10ng/ml of rIL-4 and 200U/ml of rTNF- α . After differentiation in 6 well plates (Falcon, Le Pont de Claix, France), 3×10^6 MDMs or MDDCs were cultured with or without IL-16 (10 μ g/ml), IL-2 (100U/ml) or a combination of the two cytokines. In MDDC cultures, stimulation with IL-16 was performed in the presence of exogenous cytokines that were used to drive the differentiation of monocytes into mature dendritic cells. At different time points following stimulation, cells were washed in cold phosphate buffered saline (PBS), were removed by gentle scrapping and were counted using trypan blue dye. Neither the number of total cells recovered nor the percentage of viable cells (>70%) were different between non stimulated and IL-16- stimulated cultures from all donors tested.

Levels of secreted cytokines

The levels of TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and RANTES (regulating upon activation normal T expressed and secreted) in culture supernatants, were determined by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D systems, Abingdon, U.K.) and following the manufacturer's instructions. From 3 preliminary experiments, peak cytokine release was observed after 24 but not after 6 or 48 hours stimulation period. Therefore, in all subsequent experiments the levels of secreted cytokines were evaluated following 24 hour stimulation with rIL-16.

Flow cytometric analysis:

Cells (2×10^5 cells) were incubated with 1 μ g of mouse antibodies for 30 minutes at 4°C, in PBS containing 0.5% bovine serum albumin. Cells were then washed twice with PBS, resuspended and fixed with 1% paraformaldehyde. Percentage of positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) were analysed by an Epics Coulter cytofluorimeter (Coultronics France SA, Margency, France). Dead cells were excluded from the analysis by propidium iodide staining and live cells were gated on the basis of their forward scatter and side scatter characteristics.

Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis:

Total RNA was extracted from MDM or MDDC cultures using RNazol (Bioprobes Systems, Montreuil, France) and following the manufacturer's protocol. To remove traces of DNA contamination, the RNA samples ($5 \mu\text{g}$) were treated with 2.5 U of RQ1 Rnase-free Dnase (Promega Corporation, Madison, USA) in the presence of 2x rTth reverse transcriptase buffer (Perkin-Elmer Corporation, Foster City, USA), 2 mM MgCl₂ and 20 U of RNAsin (Promega). The RT-PCR reaction was carried out in a reaction mixture of 50 μL per tube containing serial 1:5 dilutions of RNA samples (100, 20 or 4 ng), 1x rTth reverse transcriptase buffer, 2.5 mM MnCl₂, 300 μM of each dNTP (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), 0.4 μM primer pairs (Genset, Paris, France) and 5 U of rTth DNA polymerase (Perkin-Elmer). The sense and antisense primer pairs used to specifically amplify mRNA were: For CCR5: 5'GCT CTC TCC CAG GAA TCA TCT TTA C-3', and 5'-TTG GTC CAA CCT GTT AGA GCT ACT G-3' (15); for CXCR4: 5'-TGA CTC CAT GAA GGA ACC CTG-3' and 5'-CTT GGC CTC TGA CTG TTG GTG-3' (16); for CD4: 5'-AAG ACC CTC TCC GTG TCT-3', and 5'-GTC AGC TTT TCA ACT GTA AAG GCG-3'; for β -actin: 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA GG-3' and 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3'. The RT reaction started at 55°C for 2 minutes and for additional 30 minutes at 60°C. the different PCR amplification conditions were: CCR5, 30 cycles (94°C for 45s, 56°C for 45s, 72°C for 45s); CXCR4, 45 cycles (94°C for 30s, 54°C for 30s, 72°C for 30s); CD4, 25 cycles (94°C for 15s, 56°C for 15s, 72°C for 15s); β -actin, 20 cycles (94°C for 15s, 55°C for 15s, 72°C for 15s). The PCR reactions were terminated by an incubation at 72°C for 7 minutes. PCR products were separated on 1.8% agarose gel visualized and photographed under UV light after ethidium bromide staining. Quantification of the PCR products was obtained by densitometric analysis (Image Master 1D prime, Pharmacia Biotech). The mRNA levels of the receptors were normalized to the corresponding β -actin levels, by calculating the ratio of the receptor RNA band volume over that of β -actin, in the linear phase of the amplification. Results are expressed as percentage of maximum mRNA expression relative to the condition giving the highest gene expression, arbitrarily considered as 100%.

Statistical analysis:

Statistical comparisons were made using the student's t-test for paired-data. Probability values below 0.05 were considered significant.

RESULTS

Phenotypic characterisation of MDMs and MDDCs.

The level of T cell contamination in MDM and MDDC cultures was found to be below 2% as revealed by the absence of CD3 positive cells (Fig. 1). MDMs exhibited a high level expression of the monocyte/macrophage marker CD14 (mean % positive cells \pm SEM: 83.6 ± 3.6 ; MFI \pm SEM: 97.8 ± 19.8) and over 70% of cells were CD4 or CD86 positive, in contrast to the low expression level of CD1a, CD25, CD80 and CD95 (Fig. 1). On the other hand, MDDCs lacked the expression of CD14 and resembled mature dendritic cells as judged by the expression of the differentiation marker CD83. The CD86, CD4, CD80, CD1a and CD95 positive cells in MDDC cultures ranged between 35-90%, whereas CD25 expression was relatively low (mean % positive cells \pm SEM: $10.7 \pm 2.7\%$). The detected differences in the expression of surface markers clearly indicate that, under our culture conditions, monocytes could be easily differentiated into macrophages or into mature dendritic cells. The latter population could also be verified on the basis of morphological criteria, as we observed typical adherent aggregates of dendritic cells with fine membrane projections.

Effect of IL-16 on surface receptors expression.

Stimulation of MDMs or MDDCs for 5-72 hours with rIL-16, resulted in selective modulation of receptor expression which peaked at the 24 hour time point (Table 1). No significant change in the level of expression of CD14, CD1a and CD95 could be observed in either cell population (data not shown). However, IL-16-stimulated MDMs presented 2-3 fold increase in the mean percentage of cells expressing either CD25 or CD80. This was accompanied with a significant decrease in CD4 (Figure 2) and, to a lesser extent, in CD86 expression (Table 1). In contrast, stimulation of MDDCs with IL-16 resulted only in a significant upregulation of CD25 and CD83 surface expression without any measurable effect on CD4 (Table 1 and Figure 2). The downregulation or the lack of modulation of CD4 expression by IL-16 in MDMs or in MDDCs, respectively, was also evident at the 48 and 72 hours time points (data not shown). In addition, the specificity of the IL-16 effect was verified in 2 separate experiments by using 10 μ g/ml of rat IL-5 to stimulate MDMs and MDDCs. This

control recombinant protein did not induce any detectable effect on surface receptor expression or on the parameter of cytokine release described below.

Effect of IL-16 on CD4 gene expression

The stable downregulation of CD4 in IL-16-treated MDMs prompted us to examine whether this effect could be observed at the mRNA level. Total RNA was extracted from unstimulated or stimulated MDMs, at 2 or 24 hours post stimulation, and CD4 gene expression was quantitated by RT-PCR. Results shown in Figure 3, using cells prepared from 5 different donors, demonstrate significant downregulation of CD4 mRNA expression with mean percentage inhibition of 49 or 55% following, respectively, 2 or 24 hours treatment with 10 µg/ml of rIL-16. No such effect could be observed in MDDC cultures from 3 separate donors (data not shown).

Effects of cytokines on CCR5 and CXCR4 gene expression

We have evaluated the effects of IL-16 or/and IL-2 on chemokine receptor gene expression in MDMs and MDDCs. A 2 hours stimulation of MDMs with IL-2, IL-16 or with a combination of the two cytokines, significantly inhibited CCR5 mRNA accumulation by 42, 56, or 67% respectively (Fig. 4). Similar results were observed when the stimulation period was extended to 24 hours, though the inhibitory effect of IL-16 alone, which was noted on cells from 4 out of 5 donors tested, did not attain statistical significance (Fig. 4). The regulation of CCR5 gene expression in MDDCs was minimal and a significant inhibition (22%) was only detected following 2 hours stimulation with rIL-16 (data not shown).

Stimulation for 2 hours of MDMs (Fig. 5) or MDDCs (Fig. 6) with IL-2 had no modulatory effect on the baseline level of CXCR4 gene expression. In contrast, stimulation of either cell population with rIL-16, in the absence or presence of IL-2, resulted in a significant inhibition of CXCR4 mRNA accumulation and this was more dramatic in MDMs than in MDDCs (Fig. 5 and 6). These effects were transient since no significant modulation of CXCR4 expression could be detected after 24 hour stimulation with the two cytokines, used separately or in combination (data not shown).

Effect of IL-16 on cytokines production

MDMs and MDDCs were incubated for 24 hours with rIL-16 and supernatants were then collected for titration of different cytokines and chemokines. Among the interleukins tested, IL-12 was always below the detection limit (< 5pg/ml) in either non stimulated or IL-16 – stimulated supernatants of MDM and MDDC cultures from 7 separate donors. However, results shown in figure 7A demonstrate a significant increase in MIP-1 α release in IL-16-stimulated MDMs. This was accompanied by a significant upregulation, though of smaller magnitude, in RANTES, TNF- α , IL-6 and IL-10 secretion. Moreover, MDMs displayed a high spontaneous release of IL-1RA (Mean \pm SEM: 57315 \pm 6735 pg/ml), which was significantly upregulated following stimulation with rIL-16 (Mean \pm SEM: 72747 \pm 8824 pg/ml). On the other hand, stimulation of MDDCs with rIL-16 did not induce a significant increase in the secreted levels of RANTES, IL-10, TNF- α (Fig. 7B) or IL-1RA (data not shown). However, the levels of IL-6 and MIP-1 α were found to be significantly elevated in IL-16-stimulated MDDCs as compared with unstimulated cultures (Fig. 7B). Finally, it is worthwhile to point out that the high spontaneous TNF- α levels detected in MDDC cultures were mainly attributed to the exogenous recombinant cytokine added to induce cellular differentiation.

DISCUSSION

Macrophages and dendritic cells are integral components of the immune system capable of regulating immune responses via antigen presentation, cytokine secretion and the delivery of costimulatory signals for T cell activation (17, 18). The present study demonstrates that rIL-16 can interact with either macrophages or with dendritic cells, and can induce the modulation of certain parameters relevant to the functional activities of the two cell types. The need for relatively high concentration (10 μ g/ml) of rIL-16 to achieve measurable effects in vitro is attributed to the low content (2-10%) of the active homotetrameric form in the bacterially-derived recombinant cytokine (13).

Certain cytokines such as interferon-gamma (IFN- γ) and IL-10 have been reported to regulate the expression of costimulatory molecules on APCs (19, 20, 21). Our findings demonstrate, for the first time, the capacity of the chemoattractant cytokine IL-16 to modulate CD80 and CD86 expression in MDMs but not in MDDCs. Indeed, differential regulation between both types of cells has already been reported for CD80, which was found to be upregulated in macrophages but to be downregulated in langerhans cells following stimulation with IL-10 and IFN- γ (19, 21). Furthermore, the signals transduced following CD4 binding on MDMs by rIL-16 appear to enhance CD80 but to suppress CD86 expression. Other cytokines such as IL-10, IL-4 or TNF- α have also been shown to exert differential effects on CD80 and CD86 expression in monocytes (21). It has been suggested that these two costimulatory molecules influence T helper cell differentiation into Th1 or Th2 cell subsets (22). In this regard, CD86 has been implicated in the development of IL-4 producing cells (23) while CD80 appears more potent in inducing IFN- γ secretion by T cells (24). Thus, it will be of interest to determine whether IL-16 could affect, either directly or indirectly via macrophages, the differentiation of Th cell populations.

The ability of rIL-16 to enhance CD25 expression has been previously observed on T cells (3). Our results extend this finding to show a similar effect on both MDMs and MDDCs. Although the role of CD25 is not yet clearly established in dendritic cells, upregulation of this

receptor as well as of CD83 has been associated with dendritic cells maturation (25). Thus, based on our findings demonstrating the ability of rIL-16 to upregulate CD25 and CD83 expression in MDDCs, it is tempting to suggest that this cytokine might be an enhancing factor for dendritic cell maturation. Moreover, it will be of interest to examine, in future studies, whether rIL-16 could induce the expression of the β and γ chains of the IL-2 receptor which have been reported to be lacking in dendritic cells (26). In this regard, an upregulation by IL-16 of the IL-2 receptor β chain has already been observed in T lymphocytes (6).

The downregulation of CD4 expression by rIL-16 in MDMs but neither in MDDCs nor in T lymphocytes, could imply different signal transduction pathways mediated by the same receptor in different cell populations. Differential modulation of the expression of one defined receptor by the same stimulus in different cell types, has been previously reported. For instance, CD4 cross-linking by anti-CD4 monoclonal antibodies or by HIV envelope glycoprotein gp120 was found to upregulate CD95 ligand expression in monocyte, but not in T lymphocyte (27). Furthermore, this selective effect of rIL-16 in MDMs could not simply be explained on the basis of higher receptor expression on macrophages, since T cells are known to express much higher level of CD4 than MDMs. Although the mechanism of downregulation of CD4 in T cells, by other ligands, was found to involve the dissociation of CD4 with the protein kinase p56^{lck} (28), this mechanism can not explain the observed IL-16-effect in MDMs which are known to lack p56^{lck} kinase activity (28). In addition, the finding that CD4 downregulation was stable and was detectable at the mRNA level, argues against internalization of the receptor as a major mechanism of the IL-16-induced effect.

Macrophages and dendritic cells have been shown to express the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 which were identified as coreceptor for macrophage-tropic and T-cell tropic HIV-1 strains, respectively (8, 9). Regulation of the expression of chemokine receptors has been observed with different cytokines or with HIV antigens (29, 30). The ability of IL-16 to induce rapid and sustained downregulation of CCR5 mRNA expression in MDMs is similar to the effect observed with agents known to increase the cellular level of cyclic adenosine monophosphate (31). Whether the IL-16-induced downregulation of CCR5 gene expression in

MDMs, and to a lesser extent in MDDCs, is mediated via the adenosine monophosphate pathway, would need to be addressed in future studies.

Inhibition of CCR5 mRNA accumulation was also observed in MDMs stimulated with either IL-2 or with the combination of IL-2 and IL-16. These findings agree with a recent report demonstrating the capacity of IL-2 to downregulate CCR5 surface expression in macrophages (33). Although, in this latter study, continuous culture of monocytes for 10 days with IL-2 resulted in CD4 downregulation, our results indicate that stimulation of already differentiated macrophages with the same cytokine had no significant effect on CD4 expression. On the other hand, an effect of IL-2 on CXCR4 mRNA accumulation was lacking in MDMs and in MDDCs. In contrast, IL-16-signalling via CD4, in both cell populations, resulted in a rapid but reversible downregulation of CXCR4 gene expression and which was not significantly modified by the co-presence of IL-2. However, it would be unlikely that this transient effect on the level of gene expression could induce a considerable downregulation of CXCR4 surface expression. Nevertheless, our results suggest that signalling through the IL-2 receptor selectively modulates CCR5 expression whereas signalling via CD4 can modulate, to a variable extent, both CCR5 and CXCR4 gene expression. On the other hand, the implications for some of the selective effects of IL-16 in MDMs but not in MDDCs need to be considered. For example, through its capacity to induce sustained CD4 and CCR5 downregulation in MDMs, rIL-16 may have a role to play in protecting macrophages, but not dendritic cells, against HIV-1 infection. Similarly, the selective modulation of the expression of costimulatory molecules in MDMs suggest a potential regulatory effect of the cytokine on T cell responses that are dependent on antigen presentation by macrophages. However, it is essential to determine in future studies, the relevance of these findings to the immune and antiviral responses *in vivo*.

The release of cytokines by IL-16-stimulated MDMs was relatively of low magnitude as compared with the previously reported levels induced in macrophages by another CD4 ligand gp120 (33). Moreover, rIL-16 did not appear to trigger significant release of cytokines in MDDCs, except for MIP-1 α and IL-6. These results confirm earlier reports on the low capacity of mature dendritic cells to secrete cytokines (34). In addition, the profile of IL-16-induced cytokines in APC cultures, including the absence of IL-12 release, is unlikely to be a

major factor contributing to the previously suggested inflammatory property of IL-16 (1) or to a potential capacity to drive Th1 responses. Nevertheless, with the limited number of tested cytokines in our study, it is not possible to delineate the spectrum of cytokines induced by IL-16 or to rule out a potential role for other cytokines in mediating some of its biological activities.

It is of interest to point out that CD4 cross-linking with its natural ligand IL-16, appears to result in a different spectrum of activities when compared with other CD4 ligands (gp120 and CD4 monoclonal antibodies). This has already been observed in normal T cells where stimulation with anti-CD4 antibodies or with gp120, in contrast to stimulation with rIL-16, resulted in an increase in phosphatidyl serine synthesis (35). In addition, the level of HIV replication and of activation-induced cell death in infected T lymphocytes was found to decrease following stimulation with IL-16 (5, 7, 13) but to increase upon CD4 ligation with gp120 (36, 37). Taken together, these results substantiate the findings that the CD4 molecule can transmit either activating or inhibiting intracellular signals depending on the CD4 ligand used (35). Finally, the protective effect of IL-16 against HIV-1 replication in PBMCs (7, 13) together with our findings on the capacity of this cytokine to downregulate HIV-1 receptor and co-receptors in MDMs, suggest an important role for IL-16 in protecting reservoir cells against HIV-1 infection. However, the efficacy of IL-16 to inhibit virus replication in APCs still needs to be established and is currently being investigated in our laboratory.

Acknowledgements

This work was supported by research grants (no. 97088 and 98016) from the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA in France. We are grateful to O. Billault-Mulot, J. Khalife and M. Loyens for their help in the preparation of rIL-16 and to M.J. Truong for her assistance in the design of the RT-PCR studies.

REFERENCES

1. CENTER D.M., KORNFELD H. & CRUIKSHANK W.W. (1996) Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* **17**, 476-481.
2. CRUIKSHANK W.W., GREENSTEIN J.L., THEODORE A.C. & CENTER D.M. (1991) Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signalling in lymphocytes. *J. Immunol.* **146**, 2928-2934.
3. CRUIKSHANK W.W., BERMAN J.S., THEODORE A.C., BERNARDO J. & CENTER D.M. (1987) Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* **138**, 3817- 3823.
4. THEODORE A.C., CENTER D.M., NICOLL J., FINE G., KORNFELD H. & CRUIKSHANK W.W. (1996) CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.* **157**, 1958-1964.
5. CRUIKSHANK W.W., LIM K., THEODORE A.C., COOK J., FINE G., WELLER P.F. & CENTER D.M. (1996) IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J. Immunol.* **157**, 5240-5248.
6. PARADA N.A., CENTER D.M., KORNFELD H., RODRIGUEZ W.L., COOK J., VALLEN M. & CRUIKSHANK W.W. (1998) Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. *J. Immunol.* **160**, 2115-2120.
7. AMIEL C., DARCISSAC E., TRUONG M.-J., DEWULF J., LOYENS M., MOUTON Y., CAPRON A. & BAHR G.M. (1998) Interleukin-16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects and serum IL-16 drop with disease progression. *J. Infect. Dis.* **179**, 83-91.
8. ZAITSEVA, M., BLAUVELT, A., LEE, S., LAPHAM, C.K., KLAUS-KOVTUN, V., MOSTOWSKI, H., MANISCHEWITZ, J. & GOLDING, H. (1997) Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature. Med.* **12**, 1369-1375.
9. GRANELLI-PIPERNO, A., MOSER, B., POPE, M., CHEN, D., WEI, Y., ISDELL, F., O'DOHERTY, U., PAXTON, W., KOUP, R., MOJSOV, S., BHARDWAJ, N., CLARK-LEWIS, I., BAGGIOLINI, M. & STEINMAN, R.M. (1996) Efficient interaction

- of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J. Exp. Med.* **184**, 2433-2438.
10. GENDELMAN H.E., ORENSTEIN J.M., BACA L.M., WEISER B., BURGER H., KALTER D.C. & MELTZER M.S. (1989) The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS* **3**, 475.
11. GRAZIOSI C., SOUDEYNS H., RIZZARDI G.P., BAERT P.A., CHAPUIS A. & PANTALEO G. (1998) Immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **14**, S-135-S-142.
12. KRAUTWALD S. (1998) IL-16 activates the SAPK signaling pathway in CD4+ macrophages. *J. Immunol.* **160**, 5874-5879.
13. IDZIOREK T., BILLAUT-MULOT O., HERMANN E., AUMERCIER M., MOUTON Y., CAPRON A. & BAHR G.M. (1998) Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death (AICD). *Clin. Exp. Immunol.* **112**, 84-91.
14. HERMANN E., IDZIOREK T., KUSNIERZ J.-P., MOUTON Y., CAPRON A. & BAHR G.M. (1997) Role of nitric oxide in the regulation of lymphocyte apoptosis and HIV-1 replication. *Int. J. Immunopharmacol.* **19**, 387-397.
15. YI Y., RANA S., TURNER J.D., GADDIS N. & COLLMAN R.G. (1998) CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72**, 772-777.
16. FEAR W.R., KESSON A.M., NAIF H., LYNCH G.W. & CUNNINGHAM A.L. (1998) Differential tropism and chemokine receptor expression of human immunodeficiency virus type 1 in neonatal monocytes, monocyte-derived macrophages, and placental macrophages. *J. Virol.* **72**, 1334-1344.
17. DOHERTY T.M. (1995) T-cell regulation of macrophage function. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 400-404.
18. HART D.N.J. (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245-3287.

19. OZAWA H., AIBA S., NAKAGAWA & TAGAMI H. (1996) Interferon-gamma and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression. *Eur. J. Immunol.* **26**, 648-652.
20. BUELENS C., WILLEMS F., DELVAUX A., PIERARD G., DELVILLE J.-P., VELU T. & GOLDMAN M. (1995) Interleukin-10 differentially regulated B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2668-2672.
21. CREERY W.D., DIAZ-MITOMA F., FILION L. & KUMAR A. (1996) Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1273-1277.
22. KUCHROO V.K., PRABHU DAS M., BROWN J.A., RANGER A.M., ZAMVIL S.S., SOBEL R.A., WEINER H.L., NABAVI N. & GLIMCHER L.H. (1995) B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate preferentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707-718.
23. RANGER A.M., PRABHU DAS M., KUCHROO V.K. & GLIMCHER L.H. (1996) B7-2 (CD86) is essential for the development of IL-4-producing T cells. *International Immunol.* **8**, 1549-1560.
24. FLEISCHER J., SOETH E., REILLING N., GRAGE-GRIEBENOW E., FLAD H.D. & ERNST M. (1996) Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology* **89**, 592-598.
25. DELGADO E., FINKEL V., BAGGIOLINI M., MACKAY C.R., STEINMAN R.M. & GRANELLI-PIPERNO A. (1997/1998) Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several β -chemokines. *Immunobiol.* **198**, 490-500.
26. KRONIN V., VREMEC D. & SHORTMAN K. (1998) Does the IL-2 receptor α chain induced on dendritic cells have a biological function. *Int. Immunol.* **10**, 237-240.
27. OYAIZU N., ADACHI Y., HASHIMOTO F., MCCLOSKEY T.W., HOSAKA N., KAYAGAKI N., YAGITA H. & PAHWA S. (1997) Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cells apoptosis. *J. Immunol.* **158**, 2456-2463.

28. GELEZIUNAS, R., MORIN, N. & WAINBERG, M.A. (1996) Mechanisms of down-modulation of CD4 receptors on the surface of HIV-1 infected cells. *C.R. Acad. Sci. Paris* **319**, 653-662.
29. WANG, J., RODERIQUEZ, G., ORAVECZ, T. & NORCROSS, M.A. (1998) Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J. Virol.* **72**, 7642-7647.
30. UEDA H., HOWARD O.M.Z., GRIMM M.C., SU S.B., GONG W., EVANS G., RUSCETTI F.W., OPPENHEIM J.J. & WANG J.M. (1998) HIV-1 envelope gp41 is a potent inhibitor of hemoattractant receptor expression and function in monocytes. *J. Clin. Invest.* **102**, 804-812.
31. THIVIERGE, M., LE GOUILL, C., TREMBLAY, M.J., STANKOVA, J. & ROLAPLESZCZYNSKI, M. (1998) Prostaglandin E₂ induces resistance to human immunodeficiency virus-1 infection in monocyte-derived macrophages: downregulation of CCR5 expression by cyclic adenosine monophosphate. *Blood* **92**, 40-45.
32. KUTZA J., HAYES M.P.&CLOUSE K.A. (1998) Interleukin-2 inhibits HIV-1 replication in human macrophages by modulating expression of CD4 and CC-chemokine receptor-5. *AIDS* **12**, F59-F64.
33. MERRILL J.E., KOYANAGI Y. & CHEN I.S.Y. (1989) Interleukin-1 and tumor necrosis factor α can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *J. Virol.* **63**, 4404-4408.
34. GHANEKAR, S., ZHENG, L., LOGAR, A., NAVRATIL, J., BOROWSKI, L., GUPTA, P. & RINALDO, C. (1996) Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J. Immunol.* **157**, 4028-4036
35. DUMAURIER M.-J., PELASSY C., BREITTMAYER J.-P. & AUSSEL C. (1998) Regulation of the serine-base exchange enzyme system by CD4: effects of monoclonal antibodies, jacalin, interleukin 16 and the HIV membrane protein gp120. *Biochem. J.* **329**, 49-54.

36. THAN S., OYAZUN., TETALI S., ROMANO J., KAPLAN M. & PAHWA S. (1997) Upregulation of human immunodeficiency virus (HIV) replication by CD4 cross-linking in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected adults. *J. Virol.* **71**, 6230-6232.
37. OYAZU N., MCCLOSKEY T.W., THAN S., HU R., KALYANARAMAN V.S. & PAHWA S. (1994) Cross-linking of CD4 molecules upregulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing interferon- γ and tumor necrosis factor- α secretion. *Blood* **84**, 2622-2631.

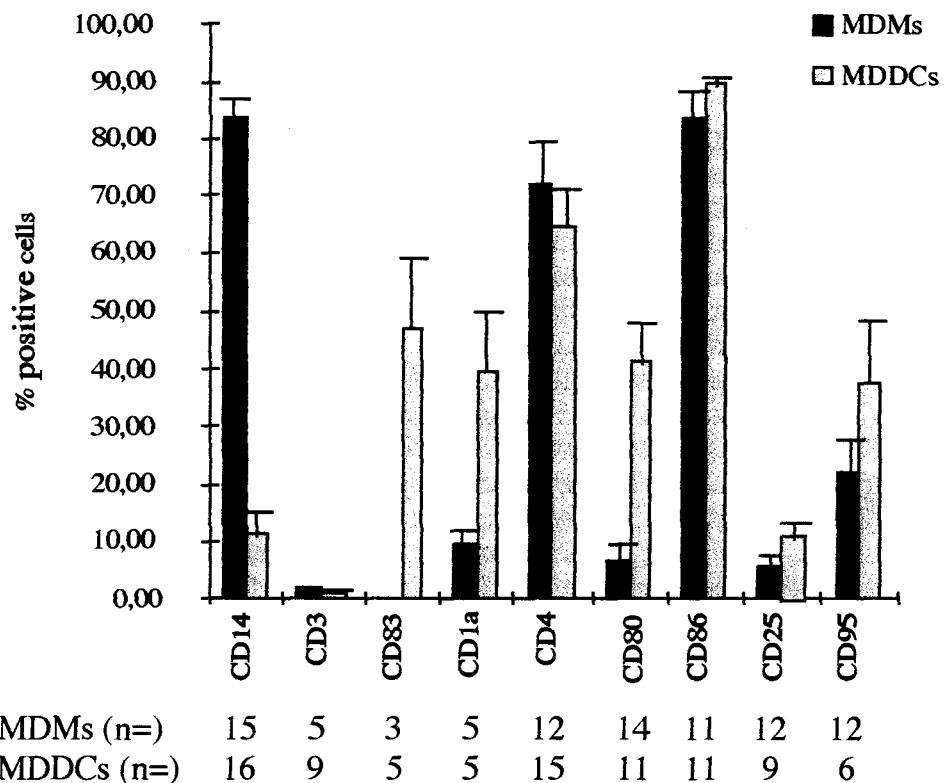


Fig. 1. Expression of surface receptor markers on monocyte-derived macrophages (MDMs) and dendritic cells (MDDCs). Following a 7 days differentiation period of monocytes in vitro, MDMs and MDDCs were stained with monoclonal antibodies to different CD antigens or with isotype controls and were subjected to flow cytometric analysis. Barograms represent the mean percentage positive cells with SE bars. n reflects the number of different donors tested.

Table I. Changes in surface receptor expression on MDMs and MDDCs following 24hrs stimulation with IL-16.

| cell surface receptor studied | % positive cells | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------------|--------------------------|----|-------------|------------------------|---|
| | MDMs | | | MDDCs | | |
| | RPMI | IL-16 | n | RPMI | IL-16 | n |
| CD4 | 78.3±6.8* | 60.5±8.6 [‡] | 11 | 66.4±7.4 | 63.8±8.3 | 8 |
| | (30.8±7.7) [†] | (18.6±5.8 [‡]) | | (16.8±4.1) | (16.6±4.3) | |
| CD25 | 5.0±2.2 | 13.4±4.4 [‡] | 12 | 10.7±2.7 | 16.1±4.4 [‡] | 9 |
| | (0.9±0.3) | (2.0±0.7 [†]) | | (1.9±0.5) | (3.3±1.2) | |
| CD80 | 9.2±3.9 | 19.4±7.5 [‡] | 11 | 49.1±8.6 | 53.2±8.4 | 7 |
| | (1.0±0.3) | (2.3±0.6 [‡]) | | (10.8±3.3) | (12.0±3.4) | |
| CD86 | 89.2±3.5 | 84.4±3.2 [‡] | 10 | 90.7±2.2 | 91.5±1.3 | 7 |
| | (55.9±12.5) | (48.4±11.6) | | (86.6±21.9) | (99.9±14.8) | |
| CD83 | <0.5 | <0.5 | 3 | 36.0±8.5 | 44.4±9.0 [‡] | 4 |
| | | | | (6.3±1.5) | (8.6±2.2) [‡] | |

* Values shown are means % positive cells ± standard errors.

† Mean fluorescence intensity ± standard errors.

‡ indicate significant difference ($p<0.05$, student's t-test) between stimulated and unstimulated cells.

¶ n reflects the number of separate experiments.

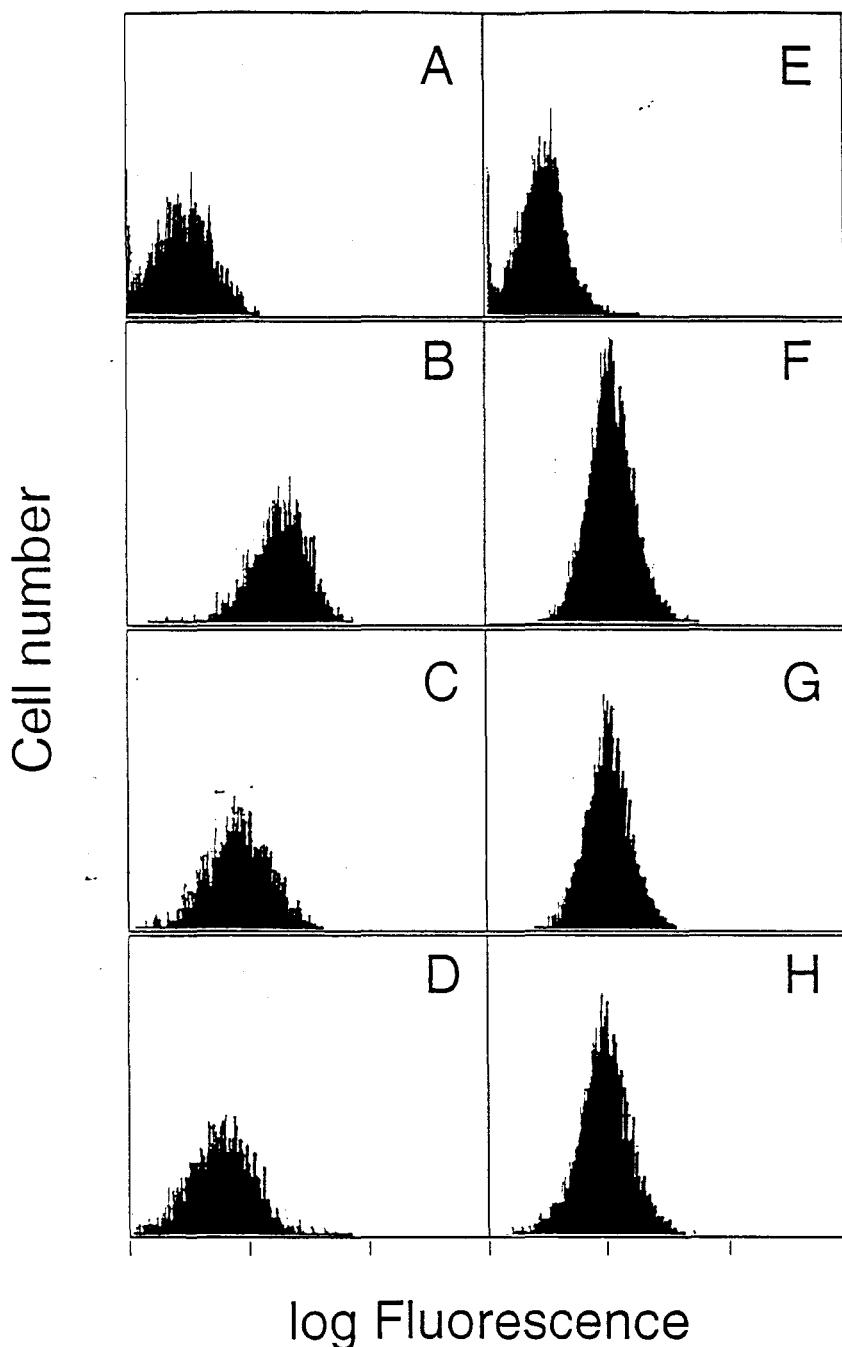


Fig. 2: Effect of rIL-16 on CD4 expression in monocyte-derived macrophages (panels A-D) and dendritic cells (panels E-H). Following 24hrs incubation in the absence (A, B, E and F) or the presence of 1 μ g/ml (C and G) and 10 μ g/ml (D and H) of rIL-16, cells were stained either with murine anti-CD4-PE (B-D and F-H) or with isotype-matched control (A and E). Histograms shown are data on cells from one representative donor.

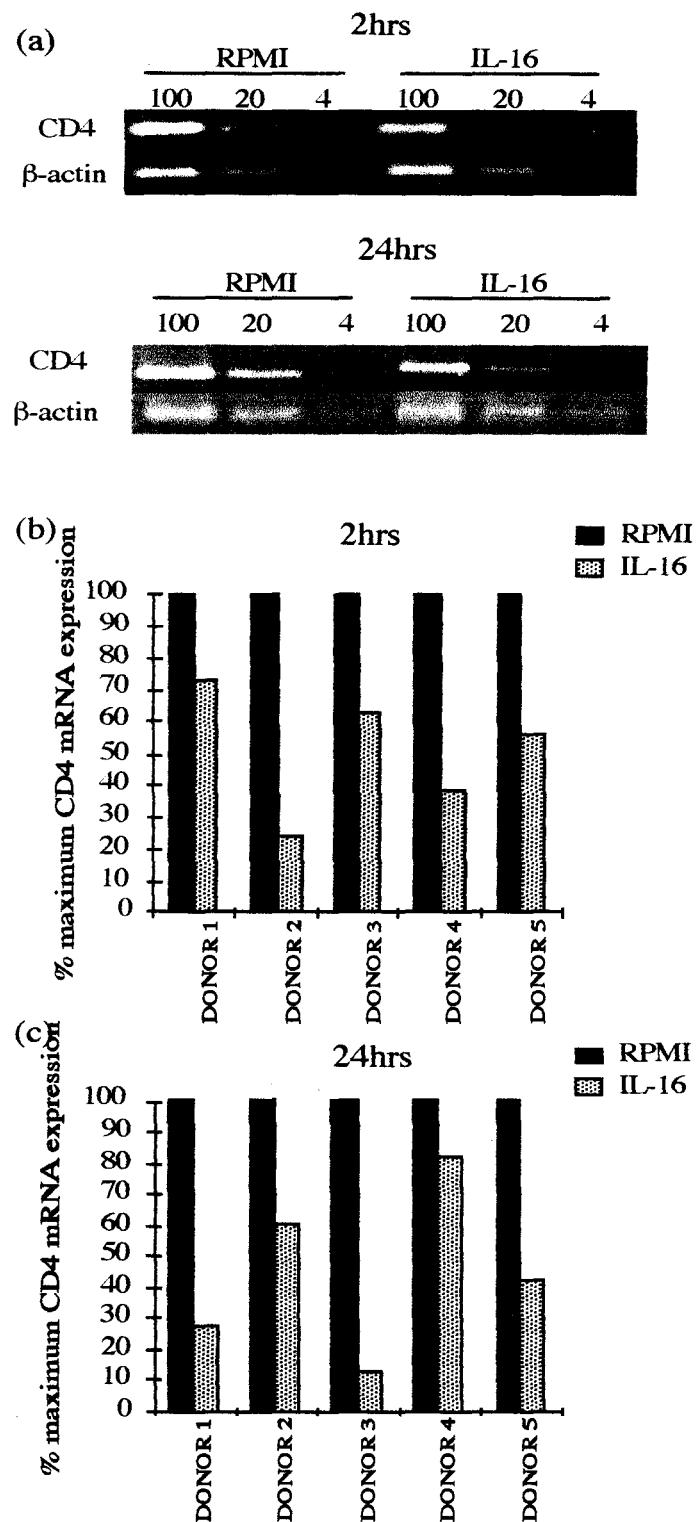


Fig. 3. Regulation by IL-16 of CD4 mRNA expression in monocyte-derived macrophages (MDMs). Following 2 and 24 hrs culture of MDMs in the absence or presence of IL-16, total RNA was extracted and subjected to RT-PCR using specific primers for CD4 and β -actin. (a) Representative results of RT-PCR analysis on RNA samples (100, 20 and 4 ng) from MDMs of one donor. (b) Relative CD4 mRNA expression in MDMs from 5 different donors following 2 hrs and (c) 24 hrs stimulation with IL-16.

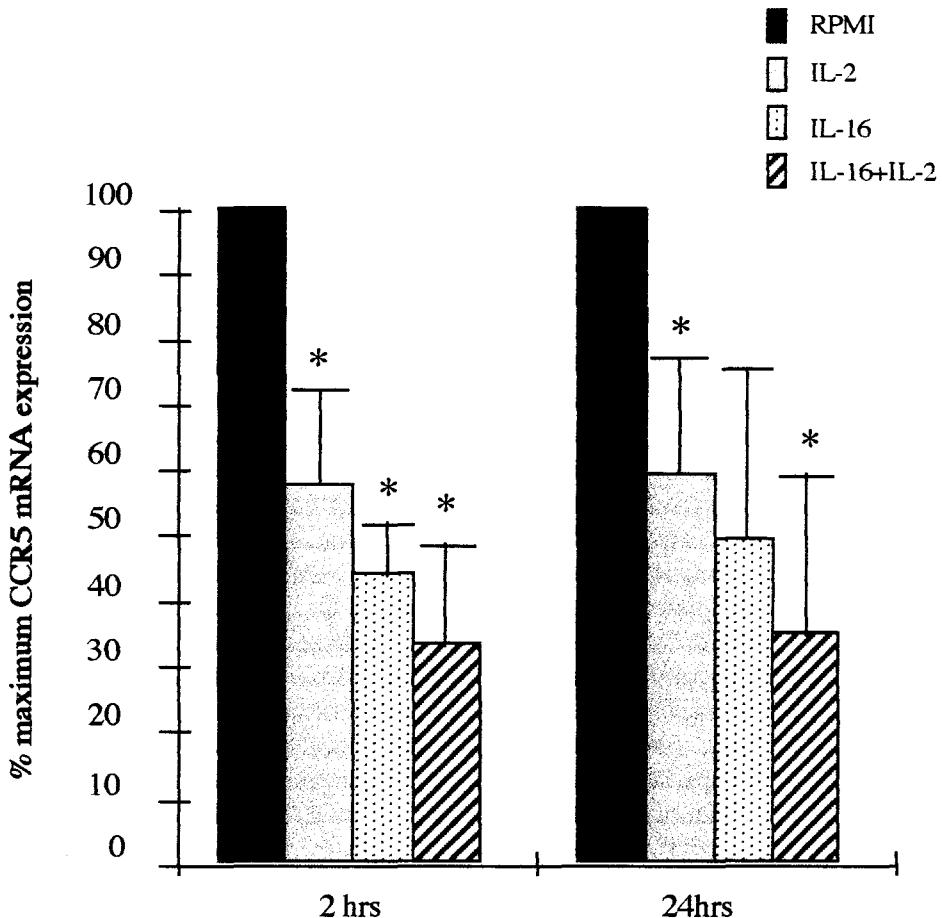


Fig. 4. Regulation of CCR5 mRNA expression in monocyte-derived macrophages (MDMs) following 2 and 24 hrs stimulation with IL-2, IL-16 or a combination of the 2 cytokines. Total RNA, extracted from non treated (RPMI) and cytokine-treated MDMs, was subjected to RT-PCR analysis using specific primers for CCR5 and for b-actin. Barograms represent the means with SE bars of % maximum CCR5 mRNA expression from 5 different donors. * $p<0.05$ versus non treated controls.

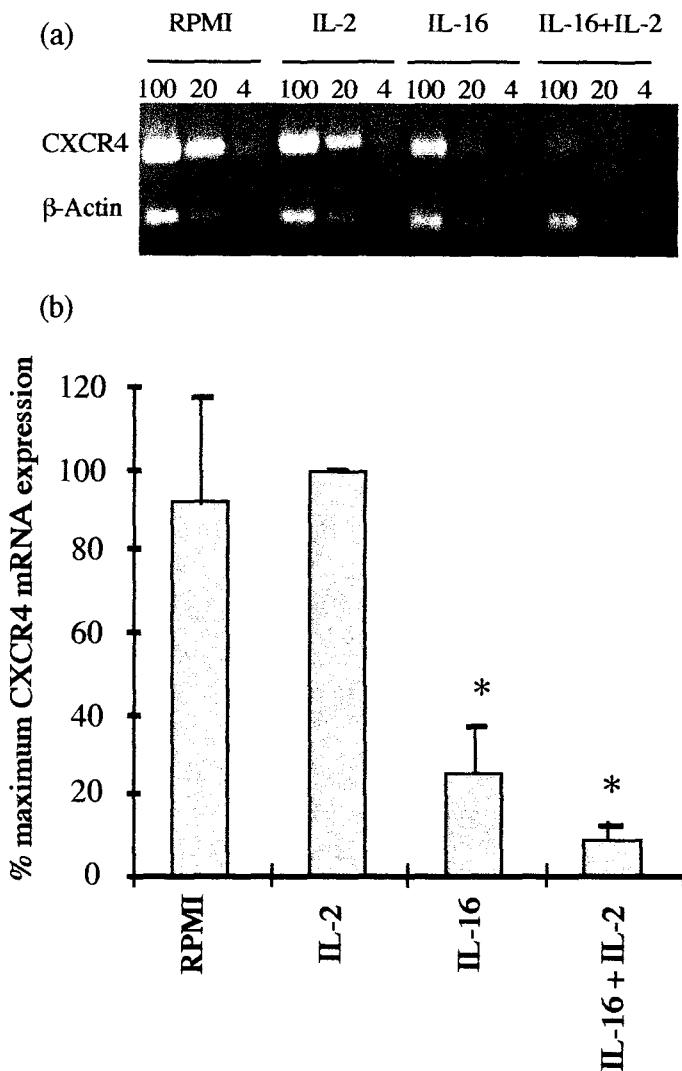


Fig. 5. Regulation of CXCR4 mRNA expression in monocyte-derived macrophages (MDMs) following 2 hrs stimulation with IL-2, IL-16 or a combination of the 2 cytokines. (a) Representative results of RT-PCR analysis on RNA samples (100, 20 and 4 ng) from MDMs of a single donor using specific primers for CXCR4 and for b-actin. (b) Relative CXCR4 mRNA expression in non treated and cytokine-treated MDMs represented as means with SE bars of % maximum gene expression from 5 different donors.

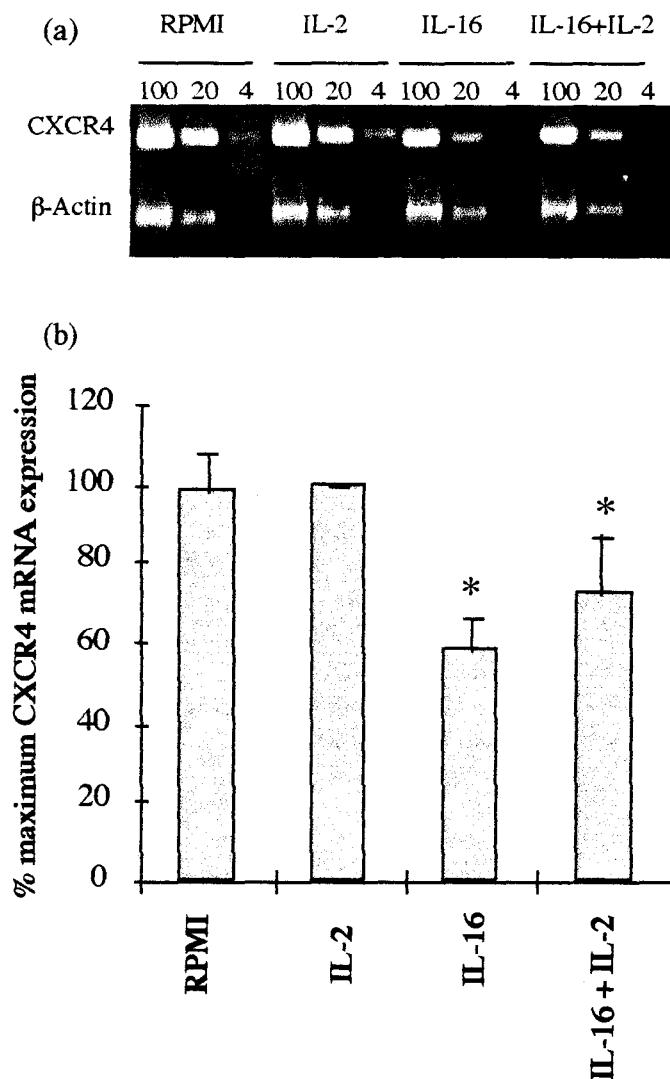


Fig. 6. Regulation of CXCR4 mRNA expression in monocyte-derived dendritic cells (MDDCs) following 2 hrs stimulation with IL-2, IL-16 or a combination of the 2 cytokines.(a) Representative results of RT-PCR analysis on RNA samples (100, 20 and 4 ng) from MDDCs of a single donor using specific primers for CXCR4 and for β -actin. (b) Relative CXCR4 mRNA expression in non treated and cytokine-treated MDDCs represented as means with SE bars of % maximum mRNA expression from 5 different donors.

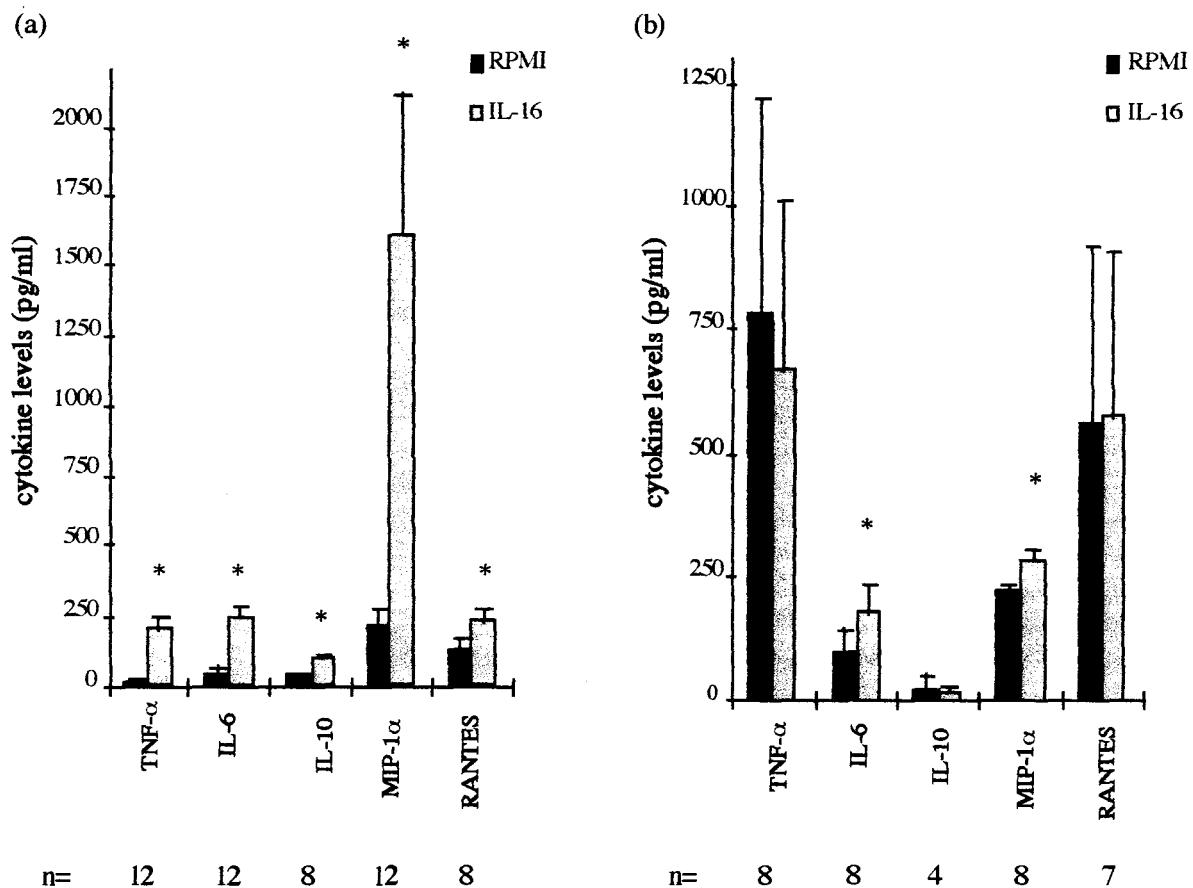


Fig. 7. Profile of cytokines induced in cultures of monocyte-derived macrophages (a) and dendritic cells (b) following 24 hrs stimulation with IL-16. Barograms represent the means with SE bars of the levels of cytokines in supernatants of unstimulated (RPMI) and IL-16-stimulated cultures from 4-12 different donors (n=). *p<0.05 versus controls.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1) Nous avons vu que l'IL-16 n'augmente pas la sécrétion de TNF- α dans les cellules dendritiques. Nous avons réalisé des expériences de stimulation en présence ou en absence de GM-CSF, IL-4 et TNF- α . Les résultats furent identiques, montrant l'absence de modulation de la production de la cytokine. Nous avons donc recherché quel était l'effet de l'IL-16 au niveau de l'ARN messager de TNF- α , et avons observé une augmentation de l'expression de l'ARN messager de TNF- α , en moyenne entre 2 et 6 heures d'incubation avec l'IL-16 (Fig. 3). La même observation est constatée en présence ou non des cytokines utilisées pour la différenciation des monocytes en cellules dendritiques. Il apparaît donc que l'IL-16 régule la transcription du gène de TNF- α . Les cellules dendritiques matures seraient alors incapables de sécréter la cytokine. Cela confirme la plupart des résultats obtenus sur les cellules dendritiques matures qui, malgré une importante expression d'ARN messager après stimulation, ne sécrètent pas ou peu de cytokines (Ghanekar *et al.*, 1996).

2) Nous avons montré, par une technique de RT-PCR semi-quantitative, que l'interleukine-16 diminue l'expression de CCR5 et CXCR4 dans les macrophages et les cellules dendritiques. Ce résultat a été confirmé par la technique de Northern Blot. La figure 4 montre la diminution transitoire de l'expression de l'ARNm de CXCR4 dans les macrophages. Le retour à un niveau basal d'expression, se situe entre 4 et 6 heures. Quant à l'expression de l'ARNm de CCR5, elle est toujours diminuée, même après 24 heures de stimulation (non montré). La figure 5 montre l'expression transitoire de l'ARNm de CCR5 et CXCR4 après deux heures de stimulation dans les cellules dendritiques stimulées par l'IL-16.

L'ensemble de ces résultats, obtenus par Northern blot, a été observé dans trois expériences indépendantes.

Matériels et méthodes:

La technique de Northern blot est décrite dans le dernier article. Les sondes utilisées sont les suivantes:

TNF- α : 5'-GGTGTGGGTGAGGAGCACATGGGTGG-3'

CCR5: 5'-GGACGACAGCCAGGTACCTATCGATTGTCAGG-3'

CXCR4: 5'-GCAAGGTTGAGCAGGTACACATCAGTCATGG-3'

β -Actin: 5'-GGCTGGGGTGTGAAGGTCTAACACATGATCTGG-3'

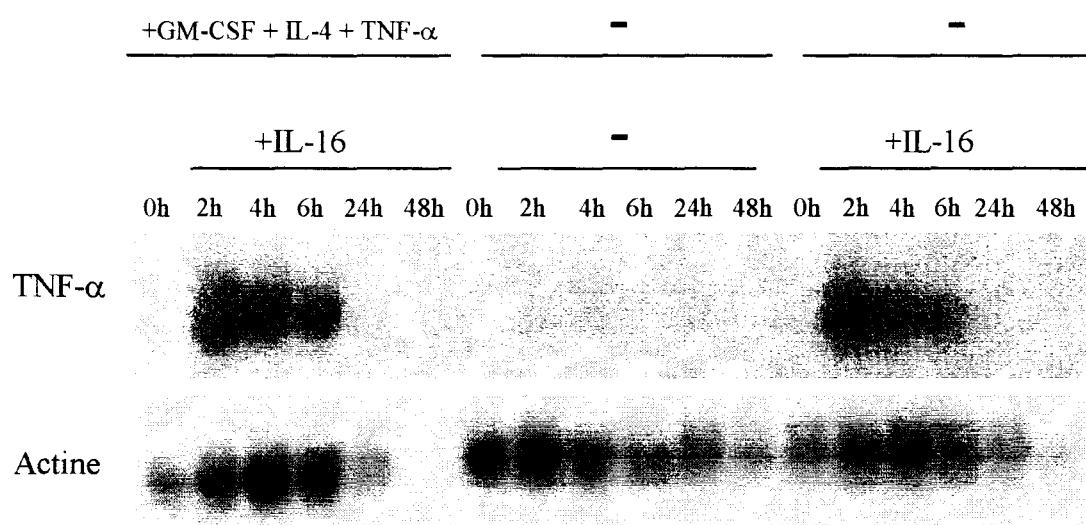


Figure 3: Analyse de l'expression de l'ARN messager de TNF- α dans des macrophages stimulées par l'IL-16, en présence ou en absence de GM-CSF, IL-4 et TNF- α

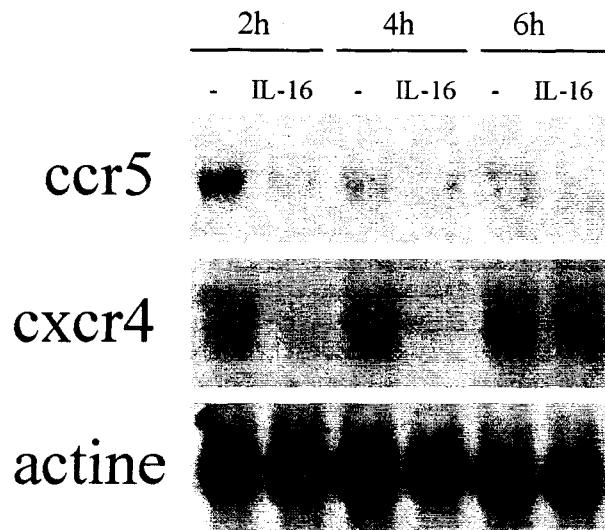


Figure 4: Analyse par northerm blot de l'expression des ARN messagers de CCR5 et CXCR4 dans des macrophages stimulées par l'Il-16 (10µg/ml)

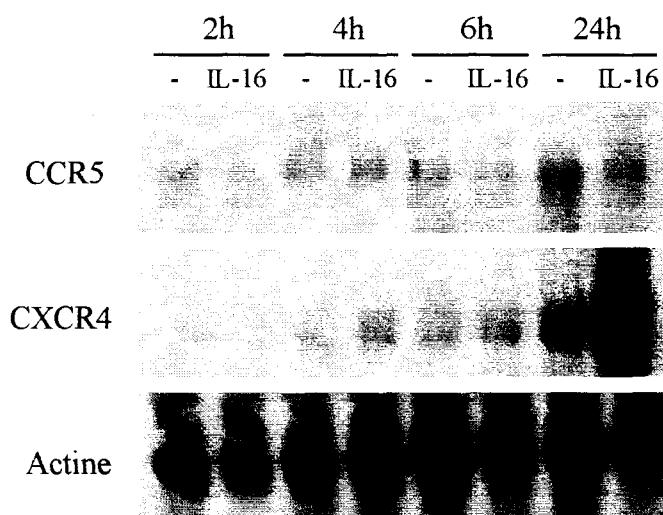


Figure 5: Analyse par northerm blot de l'expression des ARN messagers de CCR5 et CXCR4 dans des cellules dendritiques stimulées par l'Il-16 (10µg/ml)

RESULTATS 2

L'INTERLEUKINE-16 INHIBE LA MULTIPLICATION DU VIH-1
DANS LES MACROPHAGES ET LES CELLULES
DENDRITIQUES

(Ces résultats font partie d'un manuscrit -J. Virol., sous presse-)

OBJECTIFS

Nos résultats précédent démontrent une activité de l'IL-16 sur les macrophages et les cellules dendritiques. En particulier, l'expression de l'ARN messager des corecepteurs du VIH, CCR5 et CXCR4, est inhibée dans les deux populations cellulaires, ainsi que la molécule CD4 dans les macrophages. En nous appuyant sur ces données, en sachant que l'IL-16 inhibe la multiplication virale dans les lymphocytes T infectées (Baier *et al.*, 1995), nous avons voulu évaluer l'effet de l'IL-16 sur la multiplication virale dans des macrophages et des cellules dendritiques infectés *in vitro* par un virus à tropisme macrophagique.

MATERIELS ET METHODES

Les macrophages et les cellules dendritiques sont obtenus à partir de monocytes différenciés *in vitro* (Cf. article précédent).

Pour l'infection, 2.10^6 cellules, dans un volume final de 0,3ml, sont incubées à 37° C pendant deux heures avec une souche de VIH-Bal, dont l'activité de la réverse transcriptase est équivalente à 10000 cpm. Les cellules sont ensuite lavées à deux reprises par du RPMI et incubées en présence ou non d'IL-16 à 1 ou 3 µg/ml ou de Mip-1 α à 200ng/ml. Il nous est apparu que l'activité maximal de la RT se situent aux alentours de 12 jours pour les macrophages et 15 jours pour les cellules dendritiques. Pour la mesure de l'activité de la RT, 50µl de surnageant cellulaire est prélevé dans le milieu de culture et ajouté à des poly(A), des oligos (dT), du chlorure de magnésium ($MgCl_2$) et du dTTP marqué au tritium. L'ensemble est placé dans des plaques 96 trous à fond plats pendant deux heures à 37° C. La réaction est stoppée avec 20µl d'une solution de $Na_4P_2O_7$ à 120mM dans 60% de TCA, pendant 15 minutes à

4°C. Après filtrage sur papier Whatmann DE81, lavage et séchage, l'activité de la RT est mesurée dans un compteur à scintillation.

RESULTATS ET DISCUSSION

Nos résultats montrent que l'IL-16 inhibe, significativement et de façon dose dépendante, la multiplication du VIH-Bal dans les macrophages ($90\pm5\%$ à une concentration de $3\mu\text{g}/\text{ml}$) et les cellules dendritiques ($92\pm3\%$ à une concentration de $1\mu\text{g}/\text{ml}$) (Tableaux 1 et 2, respectivement). Comme pour le lot d'IL-16 utilisé dans les travaux précédents, seulement 2 à 10% des molécules sont homotétramériques. La concentration d'IL-16 active utilisée dans nos conditions de stimulation est donc de l'ordre de 100 à 300ng/ml, qui correspond aux concentrations utilisées dans les travaux précédents sur l'inhibition de la multiplication virale dans les cellules T (Baier *et al.*, 1995).

Afin de déterminer le rôle éventuel des cytokines et des chimiokines dans l'inhibition de la multiplication virale, les macrophages et les cellules dendritiques infectés ont été stimulés en présence ou non de l'IL-16 pendant 24, 48 et 72 heures. Les cytokines sécrétées ont été dosées par la technique ELISA (tableaux 3 et 4). Nous observons que le profil de cytokines est différent entre les deux types cellulaires, avec un effet optimal après 24 heures de stimulation. L'IL-16 induit, significativement, la sécrétion des β -chimiokines MIP- α et MIP- β dans les macrophages (index de stimulation: 16,6 et 8,1, respectivement) et les cellules dendritiques (index de stimulation: 6,3 et 3,5, respectivement). La production de Rantes et d'IL-6 est augmentée dans les macrophages (index de stimulation: 2,6 et 10,0, respectivement) et dans les cellules dendritiques (index de stimulation: 1,9 et 11,7, respectivement) stimulés par l'IL-16, cependant l'effet de l'IL-16 dans ces dernières n'est pas significatif. La sécrétion de TNF- α

et d'IL-10 est également augmentée de façon significative dans les macrophages (index de stimulation: 7,8 et 3,0, respectivement), contrairement aux cellules dendritiques (index de stimulation 2,1 et 1,4, respectivement). Cependant, les productions de cytokines restent faibles et de l'ordre du picogramme. Les effets inhibiteurs de l'IL-16 ne semblent donc pas associés avec une forte induction de cytokines et de chimiokines. En effet, la quantité de chimiokines mesurée dans les surnageants est plus faible que celle utilisée dans les expériences décrivant une activité anti-virale des ligands de CCR5 (Verani *et al.*, 1997). De plus, MIP-1 α à 200ng/ml est incapable d'inhiber la multiplication virale dans nos conditions de stimulation. L'activité antivirale de la chimiokine dans les lymphocytes T réside dans sa capacité à entrer en compétition, avec le virus, pour le récepteur CCR5 (Moore *et al.*, 1997), et donc réside dans l'inhibition de l'entrée du VIH dans la cellule. Ainsi, nos résultats montrent que la compétition pour le corécepteur CCR5 n'est pas suffisante pour la limitation de l'infection dans les cellules présentatrices de l'antigène. Ceci peut suggérer que dans ces types cellulaires, les virus à tropismes M aient une affinité plus forte que MIP-1 α pour CCR5, ou qu'ils soient capables d'utiliser de façon préférentielle d'autres corécepteurs.

L'action de l'IL-16 ne peut être expliquée uniquement par un phénomène de compétition pour la molécule CD4, d'autant plus que des résultats complémentaires, non présentés dans cette thèse, nous indiquent que l'inhibition se situe à un niveau transcriptionnel. Ceux-ci confirment les études antérieures sur l'inhibition de la multiplication virale dans les lymphocytes T (Maciaszek *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1997). Mais compte tenu de nos résultats, précédemment décrits, sur la modulation des récepteurs du VIH, il nous reste à déterminer la possibilité d'une inhibition de la pénétration du VIH dans les cellules cibles, prétraitées par l'interleukine-16. Finalement, nos résultats

confirment l'activité de l'IL-16 sur les cellules présentatrices de l'antigène, et démontrent que la chimiokine inhibe la multiplication du VIH dans les macrophages et les cellules dendritiques.

| donneurs | Mesure de la transcription inverse(cpm/50µl) dans les cultures traitées par: | | | |
|-------------|--|-------------------|-------------------|----------------------|
| | RPMI | IL-16 (1µg/ml) | IL-16 (3µg/ml) | MIP-1α (0.2µg/ml) |
| 1 | 47834 | 13499 (72)* | 4245 (91) | 51170 (-20) |
| 2 | 78075 | 28165 (64) | 22751 (71) | 51879 (33) |
| 3 | 37848 | 3702(90) | 0 (100) | 38837 (-3) |
| 4 | 46898 | 3602 (92) | 504 (99) | 26635 (43) |
| 5 | 85636 | 21859 (74) | 7829 (91) | N.D. |
| moyenne | 59258±9464 | 14164±4882 | 7065 ±4168 | 43630±6850 |
| +/- erreur | | (78±5) | (90±5) | (13±15) |
| standard | | | | |
| valeur de p | | 0.0012 | 0.0017 | 0.3638 |

Tableau 1: Effet de l'IL-16 sur la multiplication du VIH-Bal dans les macrophages (RT mesurée 12 jours après l'infection)

*% inhibition

| donneurs | Mesure de la transcription inverse (cpm/50µl) dans les cultures traitées par: | | |
|-------------|---|-------------------|----------------------|
| | RPMI | IL-16 (1µg/ml) | MIP-1α (0.2µg/ml) |
| 1 | 16483 | 3738 (83)* | N.D. |
| 2 | 10822 | 0 (100) | N.D. |
| 3 | 16440 | 354 (98) | 14530 (13) |
| 4 | 34510 | 3747 (89) | 18250 (47) |
| 5 | 20871 | 3386 (84) | 24381 (-17) |
| 6 | 22301 | 976 (96) | 26051 (-17) |
| moyenne | 20237±3294 | 2033± 72 | 20803±2680 |
| +/- erreur | | (92±3) | (6±15) |
| standard | | | |
| valeur de p | | 0.0016 | |

Tableau 2: Effet de l'IL-16 sur la multiplication du VIH-Bal dans les cellules dendritiques (RT mesurée 15 jours après l'infection)

*% inhibition



| Cellules dendritiques | | RPMI | | | IL-16 (3µg/ml) | | |
|-----------------------|----------|---------|---------|-----|-----------------------|-----------|---------|
| Cytokines testées | | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h |
| TNF-α | 305±186* | 358±214 | 634±83 | | 634±344 | 418±201 | 593±74 |
| IL-6 | 47±24 | 30±15 | 36±7 | | 548±349 | 392±206 | 82±19 |
| IL-10 | 77±60 | 78±64 | 25±25 | | 107±88 | 115±103 | 16±16 |
| MIP-1 α | 181±75 | 84±25 | 101±42 | | 1139±796 $^{\Delta}$ | 862±692 | 99±39 |
| MIP-1 β | 608±249 | 260±90 | 271±89 | | 2107±1347 $^{\Delta}$ | 1540±1116 | 335±155 |
| RANTES | 636±85 | 382±85 | 463±107 | | 1217±460 | 761±294 | 495±118 |

Tableau 3: Concentration des cytokines détectées dans le surnageant de culture des cellules dendritiques. Les cellules ont été infectées par HIV-Bal et stimulées par l'interleukine-16 pendant 24, 48, 72 heures.

* Moyenne (pg/ml±erreur standart) de cinq expériences indépendantes.
 Δ différence significative entre les valeurs des cellules non activées et celles obtenues dans le surnageant des cellules activées (test de rang de Wilcoxon).

| Macrophages | | RPMI | | | IL-16 (3µg/ml) | | |
|-------------------|---------|--------|--------|-----|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Cytokines testées | | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h |
| TNF-α | 56±16* | 33±12 | 23±11 | | 434±143 $^{\Delta}$ | 283±71 $^{\Delta}$ | 242±87 $^{\Delta}$ |
| IL-6 | 76±23 | 57±18 | 51±17 | | 757±257 $^{\Delta}$ | 683±238 $^{\Delta}$ | 754±280 $^{\Delta}$ |
| IL-10 | 42±22 | 61±30 | 47±29 | | 124±45 $^{\Delta}$ | 72±22 | 64±34 |
| MIP-1 α | 176±52 | 54±11 | 41±13 | | 2930±627 $^{\Delta}$ | 614±280 $^{\Delta}$ | 280±142 $^{\Delta}$ |
| MIP-1 β | 426±159 | 128±17 | 88±13 | | 3442±1039 $^{\Delta}$ | 808±342 $^{\Delta}$ | 441±283 $^{\Delta}$ |
| RANTES | 372±82 | 258±60 | 217±70 | | 975±154 $^{\Delta}$ | 518±76 $^{\Delta}$ | 399±59 $^{\Delta}$ |

Tableau 4: Concentration des cytokines détectées dans le surnageant de culture des macrophages. Les cellules ont été infectées par HIV-Bal et stimulées par l'interleukine-16 pendant 24, 48, 72 heures.

* Moyenne (pg/ml±erreur standart) de cinq expériences indépendantes.
 Δ différence significative entre les valeurs des cellules non activées et celles obtenues dans le surnageant des cellules activées (test de rang de Wilcoxon).

RESULTATS 3

RECOMBINANT HUMAN IL-16 INHIBITS HIV-1
REPLICATION AND PROTECTS AGAINST ACTIVATION-
INDUCED CELL DEATH (AICD).

T. IDZIOREK, J. KHALIFE, O. BILLAUT-MULOT, E. HERMANN, M. AUMERCIER, Y.
MOUTON, A. CAPRON and G.M. BAHR

Clinical and Experimental Journal of Immunology

OBJECTIFS

La combinaison d'antirétroviraux nous a montrée l'importance de la charge virale dans la pathogénèse du virus de l'immunodéficience humaine. Les traitements antiretroviraux restaurent partiellement l'homéostasie du système immunitaire en inhibant la multiplication virale. Mais les traitements antiviraux n'éradiquent pas l'ensemble des virus présents dans les cellules réservoirs et des virus résistants apparaissent. C'est à ce niveau qu'apparaît l'intérêt d'une immunothérapie qui consiste à soutenir les défenses immunitaires en alliant une action directe sur la multiplication virale. C'est dans ce but que nous nous sommes intéressés à l'interleukine-16 qui est capable d'inhiber la multiplication d'une souche de VIH, à tropisme cellulaire T, dans les cellules T. Nous avons ainsi produit la molécule dans notre laboratoire. Pour son étude, nous avons considéré deux points importants de la pathogénèse du VIH: la multiplication virale et l'apoptose. Ainsi, ce travail décrit, l'activité de l'IL-16 sur la multiplication de virus, à tropisme M et T, dans les lymphocytes T. En particulier, nous avons évalué l'activité des différentes formes de l'IL-16, monomériques ou tétramériques, sur l'infection virale. Nous avons également étudié l'action de l'IL-16 sur l'apoptose spontanée et la mort induite par l'activation de cellules T provenant de sujets infectés.

RESULTATS

Il s'avère que seulement 2 à 10% de notre IL-16, produite chez E. Coli, est sous une forme homotétramérique. Nous confirmons que cette forme est responsable de l'inhibition de la multiplication virale par l'IL-16, observée dans des PBMC infectés de façon aiguë par une

souche T-tropique (HIV-IIIB), et pour la première fois M-tropique (HIV-Bal) et primaire (CHR4) à tropisme M.

L'addition de l'IL-16 à des cellules de patients stimulées par des anticorps anti-CD3, la dexaméthasone, ou des anticorps inducteurs d'apoptose anti-CD95, diminue la mort cellulaire induite par l'activation. L'action de l'IL-16 est expliquée, du moins en partie, par la diminution de l'expression de la molécule CD95 ou Fas.

Notre article discute des effets de l'IL-16 qui sont différents de ceux observés en présence d'anticorps anti-CD4 ou de gp120, qui induisent l'apoptose, et qu'ils dépendent de l'état d'activation de la cellule. L'IL-16 est donc un candidat potentiel pour une immunothérapie, et ce parce qu'il inhibe, à la fois, la multiplication virale et l'apoptose de cellules de patients.

Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death (AICD)

T. IDZIOREK, J. KHALIFE, O. BILLAUT-MULOT, E. HERMANN, M. AUMERCIER*, Y. MOUTON[†],
 A. CAPRON & G. M. BAHR *Institut Pasteur de Lille, INSERM U167 and *Institut de Biologie de Lille, CNRS-UMR 319, Lille,
 and †Centre Hospitalier de Tourcoing, Tourcoing, France*

(Accepted for publication 9 December 1997)

SUMMARY

The chemoattractant cytokine IL-16 has been reported to suppress lymphocyte activation and to inhibit HIV-1 replication in acutely infected T cells. We have cloned and expressed human IL-16 in *Escherichia coli* and investigated whether the recombinant protein could regulate the level of lymphocyte apoptosis from HIV-1-infected subjects. After purification and refolding, only 2–10% of the recombinant cytokine was present in a biologically active homotetrameric form. This could explain the need for high concentrations of the bacterially derived IL-16 to induce significant inhibition of HIV-1 replication. Addition of IL-16 to unstimulated peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures from HIV-1-infected subjects did not modify the observed level of spontaneous lymphocyte apoptosis. In contrast, IL-16 added to PBMC cultures stimulated with anti-CD3, anti-CD95 or dexamethasone reduced significantly the percentage of lymphocytes undergoing AICD. This effect was found to correlate with the ability of the cytokine to decrease CD95 expression on activated CD4⁺ T cells. Comparative studies on PBMC from healthy individuals indicated that the regulation of apoptosis levels by IL-16 is a complex phenomenon and could depend on the nature of the activator used and/or the immune status of lymphocytes tested. The outcome of CD4 cross-linking on T cells by various ligands is discussed in the context of the observed beneficial activities of IL-16 and its potential role in the treatment of HIV disease.

Keywords HIV-1 replication apoptosis IL-16

INTRODUCTION

In HIV infection, functional defects and deletion of antigen-reactive T cells are more frequent than can be explained by direct viral infection. Cells from infected subjects were found to undergo *in vitro* a spontaneous process of programmed cell death (PCD). This process also appeared to increase in magnitude upon cell activation with different stimuli [1,2]. Viral antigens including gp120 and tat have been reported to accelerate, even in non-infected lymphocytes, the AICD and are therefore believed to contribute to CD4⁺ T cell depletion in HIV disease [3,4]. The relationship between T cell depletion and PCD in HIV infection has been further substantiated by the *in vivo* findings of high apoptosis levels, occurring predominantly in bystander cells, in lymph nodes of infected subjects [5]. The increased intensity of the apoptotic phenomenon in lymph nodes was also linked to a general state of immune activation and was shown to be independent of disease progression or of the level of viral load [6]. However, in

peripheral lymphocytes of HIV-infected subjects, the increased susceptibility to apoptosis was correlated with disease progression [7,8] or with high viral load [9] and could be prevented through cosignals delivered simultaneously by IL-1 and IL-2 [10]. In addition, the inhibition of AICD could similarly be achieved by costimulation of cell cultures with type-I cytokines, interferon-gamma (IFN- γ), IL-2 or IL-4 [11,12]. Nevertheless, a correlation between the ability of a cytokine to inhibit HIV replication and to block the increased sensitivity of lymphocytes to PCD is not yet evident. This would necessitate a thorough evaluation of the capacity of HIV-suppressive cytokines to inhibit in parallel the enhanced level of lymphocyte apoptosis.

Among the mechanisms known to play an important role in the apoptosis of CD4⁺ lymphocytes following infection with HIV are the increased expression of the death receptor CD95 (Fas) and the increased production of CD95-ligand by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [13]. Cross-linking the CD4 antigen, using anti-CD4 antibodies or HIV-1 envelope glycoprotein, was similarly shown to enhance T cell apoptosis by up-regulating CD95 and CD95-ligand expression on lymphocytes and monocytes, respectively

Correspondence: G. M. Bahr, Institut Pasteur de Lille, INSERM Unité 167, 1 rue du Professeur A. Calmette, 59019 Lille cedex, France.

[14]. On the other hand, the natural ligand for CD4 has been identified as the chemoattractant cytokine IL-16 [15]. This molecule has been reported to be active only when present in homotetrameric form, to inhibit lymphocyte activation [16] and to suppress HIV-1 replication [17,18]. Therefore, in this study we addressed the question whether CD4 cross-linking by its natural ligand could regulate the level of spontaneous and activation-induced cell death in cultures from HIV-1-infected subjects or healthy controls. In addition, we cloned, expressed and evaluated the inhibitory activity of recombinant IL-16 on the replication of macrophage-tropic (M-tropic) and T-tropic HIV-1 isolates in human PBMC. We present data to demonstrate that the HIV-suppressing activity of IL-16 is mediated by the tetrameric form. However, the latter constitutes only up to 10% of the total protein produced in the bacterial expression system. Furthermore, we provide evidence for a protective activity of the recombinant cytokine against AICD and we show that this effect is mediated, at least in part, by down-regulation of CD95 expression on CD4⁺ lymphocytes from HIV-infected subjects.

SUBJECTS AND METHODS

Study subjects

A total of 34 HIV-1 infected subjects and 18 seronegative healthy controls was studied. Among the HIV group, 15 were asymptomatics (grade A according to the classification of the Centers for Disease Control) and 19 were symptomatics (grade B). At the time blood samples were drawn, only one asymptomatic and five symptomatics were not receiving anti-retroviral therapy. The rest of the subjects were on treatment with either two reverse transcriptase inhibitors or a three-drug regimen containing one protease inhibitor. The CD4 counts (mean \pm s.e.m.: 662 ± 74 cells/mm³; range 300–1458 cells/mm³) and viral loads (median 1992 copies/ml; range 150–293 695 copies/ml) in the asymptomatics were comparable to those detected in symptomatic patients (570 ± 43 cells/mm³; range 394–1061 cells/mm³ and median 5306; range 200–199 970 copies/ml). None of the subjects presented with opportunistic infections during the study period. Because no significant differences ($P > 0.05$; Mann-Whitney *U*-rank test) could be noted between grade A and grade B infected subjects with regard to clinical parameters or to the effects of IL-16 described below, data on all subjects from both categories were pooled to represent a single group.

Reagents used

Murine anti-human MoAbs used either in culture or for cytofluorometric detection were CD4-FITC, CD95-PE (UB2), IgG1-FITC, IgG1-PE, CD3 (UCHT1) and purified azide-free IgM anti-human CD95 (CH11) (Immunotech, Marseille, France). Other reagents were dexamethasone (DEX), phytohaemagglutinin (PHA; Sigma, La Verpillière, France), YOPRO-1 dye (Molecular Probes Inc, Eugene, OR), polyA and oligo dT (Pharmacia, Saclay, France), and ³H-thymidine triphosphate (Amersham, Les Ulis, France). Gel filtration standards were from BioRad (Ivry-sur-Seine, France). IL-2 was purchased from Boehringer Mannheim (Meylan, France) and macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) from R&D Systems (Abingdon, UK).

Cloning and expression of human IL-16

Total RNA from PHA-activated PBMC was isolated using RNA Plus and following the manufacturer's recommendations

(Bioprobe Systems, Montreuil, France). Reverse transcription was performed in 25 μ l final volume containing 0.5 μ g total RNA which was incubated for 5 min at 65°C before the addition of 0.25 mM mix dNTPs, 1 \times reverse transcriptase (RT) buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 8 mM DTT, 4 U RNase inhibitor) and 200 U Mu-MLV RT. The reaction was allowed 1 h at 37°C and 3 min at 92°C. To produce recombinant human IL-16, we amplified 2 μ l of the product of reverse transcription in the presence of IL-16-specific primers flanked with BamH1 at the 5' end and HindIII site at the 3' end. The primers derived from the published sequence of IL-16 [19] were: sense: GAGAGGATCCATGCCGACCTCAACTCCTCC, antisense: GAGAAAGCTTCTAGGAGTCTCCAGCAGCTGT.

The amplified product of the right size was purified, digested with BamH1 and HindIII, subcloned in pQE 30 expression vector (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and entirely sequenced. The obtained sequence was identical to the published one [19]. The production of IL-16 was done in *Escherichia coli* following the manufacturer's recommendations and was rendered endotoxin-free (<0.125 endotoxin unit (EU)/20 μ g protein) by several passages over polymyxin-B column (Pierce, Montluçon, France).

Further purification of IL-16 by medium pressure liquid chromatography was performed using a gel-filtration column (Bio-Silic SEC125.5, 300 \times 7.8 mm; BioRad) connected to the Biologic Workstation (BioRad). The column was equilibrated with 50 mM phosphate buffer, 200 mM NaCl, pH 6.8 at a flow rate of 1 ml/min. Fractions (0.5 ml) were collected and were tested for inhibition of HIV replication as described below. Molecular weights of eluted forms of recombinant hIL-16 were deduced from a curve calculated by plotting the decimal logarithm of standard molecular weight protein markers versus their elution time expressed in seconds.

Culture conditions

PBMC were isolated from heparinized blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation, and cultured in RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Boehringer), 2 mM glutamine (Gibco) and 1% gentamycin (Schering Plough, Levallois-Perret, France). Cells were cultured for 24 h in 96-well plates (Costar, Brumath, France) at 2.5×10^5 /ml or at 5×10^5 /ml in 48-well plates (Costar). Lymphocyte apoptosis was induced by stimulation with DEX (10^{-7} M), PHA (1 μ g/ml) or anti-CD3 MoAb (0.5 μ g/ml). The effect of CD95 cross-linking was also explored by incubating cells with the CD95 MoAb CH11 (3 μ g/ml). When added to the cultures, MIP-1 α and IL-16 were used at 0.2 and 1 μ g/ml, respectively, unless otherwise stated.

Measurement of apoptosis

Apoptosis was measured by either optical or cytofluorometric analysis of cell death, as previously described [12,20]. Briefly, cells were counted in a haemocytometer in the presence of 0.5% trypan blue. Cells counted as apoptotic included those with characteristic nuclear chromatin condensation and fragmentation as well as dead cells that had lost trypan blue exclusion capacity. Cytofluorometric analysis of cell death was assessed using the impermeant DNA intercalant YOPRO-1 dye, which was added at 10 μ M final concentration to 5×10^4 cells and was allowed to stand for 5 min at room temperature in the dark. Cell analysis was performed on a Vantage cell sorter (Becton Dickinson) using an argon-ion laser tuned to 488 nm. Green cell fluorescence, gated on

forward and side light scatter, was collected using a 525 ± 10 nm band-pass filter and displayed using a logarithmic amplification. Inhibition of cell death by costimulation with cytokines was calculated as follows:

$$\frac{(\text{apoptosis in stimulated cells}) - (\text{apoptosis in stimulated cells} + \text{cytokine})}{(\text{apoptosis in stimulated cells}) - (\text{apoptosis in unstimulated cells})} \times 100$$

The reproducibility and specificity of detection of apoptotic cells were verified randomly on samples from five different subjects by (i) assessing the apoptosis levels on the same samples in triplicate and obtaining <5% variation among triplicate measurements, and (ii) cell sorting the populations representing apoptotic cells, following flow cytometry, and demonstrating that these cells did not show any uptake of trypan blue.

Phenotypic analysis of living cells

In some experiments, the expression of CD95 antigen on the surface of living CD4⁺ T cells was examined. PBMC stimulated for 24 h with DEX, PHA or anti-CD3, in the presence or absence of IL-16 (1 µg/ml) were first incubated with FITC- and PE-conjugated MoAbs (10 µg for 10^5 cells in a 100-µl final volume) for 30 min at 4°C in the dark. Cells were subsequently washed twice with cold PBS containing 10% bovine serum albumin (BSA). Live lymphocytes were gated using their higher forward and side light scatter intensities and were analysed for simultaneous double staining by emission of green and orange fluorescences for CD4 and CD95 expression, respectively. Percentages of CD95-expressing CD4⁺ T cells were determined after correcting for non-specific double staining.

HIV-1 infection in vitro

PHA blasts generated in 3 days' culture of PBMC from healthy donors were incubated for 2 h at 37°C with a dose of HIV-1 corresponding to 5000 ct/min of RT activity per 10^6 cells. Following two washings, cells were cultured at 5×10^5 /ml in medium containing 10 U/ml IL-2 and were fed twice a week by replacing 0.5 ml of the supernatant with fresh medium. Cytokines evaluated for inhibitory effects on HIV replication were added immediately upon seeding and were present continuously in culture. Infection was performed with one of three isolates: the T-tropic strain HIV-1 IIIB, the M-tropic strain HIV-1Bal and a primary non-syncytium-inducing, M-tropic strain CHR4, which was isolated from an HIV-1⁺ individual and was phenotyped in our laboratory. Viral replication was evaluated by the level of RT activity in culture supernatants, as previously described [21].

Statistical analysis

Statistical comparisons were made using the non-parametric Wilcoxon matched-pairs test or Mann-Whitney *U*-rank test. Probability values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Effect of IL-16 on HIV-1 replication in human PBMC

PHA-activated cells from different donors were infected either with T-tropic or M-tropic HIV-1 isolates and were maintained in culture in the absence or presence of various concentrations of IL-16. The level of RT in the supernatants was assessed between days 7 and 14 and results from three representative experiments are shown in Table 1. It was noted that a 50–60% inhibition of viral

replication could be achieved with a concentration ≥ 5 µg/ml of the recombinant cytokine. This effect was evident on all viral strains tested, including the primary isolate CHR4. The replication of this latter was also found to be inhibited (63%) by the continuous presence of MIP-1α in the culture at a concentration of 0.2 µg/ml (Table 1). The maximum level of inhibition observed under our experimental conditions was 90% using the highest endotoxin-free concentration of our recombinant IL-16 (20 µg/ml). We did not attempt to use higher concentrations to achieve 100% inhibition due to the potential and probable effect of minute contaminants, which could lead either to false-negative or to false-positive results.

The relatively high concentration of IL-16 needed to induce significant inhibition of viral replication prompted us to evaluate the percentage of the biologically active tetrameric form of IL-16 in our recombinant preparation. Thus, 25 µg of the cytokine were passed over gel filtration column and 0.5-µl fractions of different molecular sizes were collected as described in Subjects and Methods. The fractions were filtered through 0.22-µm Millipore filters and were tested at 1:20 dilution (v/v), for the inhibitory activity on HIV-1 Bal replication. Results shown in Fig. 1 demonstrate that the virus-inhibiting activity of IL-16 was retained in the fraction containing the tetrameric form (50–60 kD), but which only represented 2–10% of the total protein (in six different batch preparations). Extrapolations from these results suggest that the observed IL-16-mediated inhibition on HIV-1 replication occurs at a concentration range of 100–500 ng/ml of the active homotetramer.

Effect of IL-16 on spontaneous and activation-induced cell death

We then evaluated the ability of IL-16 to regulate the level of spontaneous lymphocyte apoptosis and AICD detectable *in vitro*

Table 1. IL-16-mediated inhibition of HIV-1 replication in acutely infected human peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures

| Experiment no. | Strain of HIV-1 used | Cytokine added (µg/ml) | RT levels (ct/min) | Percent inhibition |
|----------------|----------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | IIIB | — | 37 125 | — |
| | | IL-16 (0.05) | 35 000 | 6 |
| | | IL-16 (0.5) | 26 000 | 30 |
| | | IL-16 (5.0) | 15 500 | 58 |
| 2 | Bal | — | 51 884 | — |
| | | IL-16 (1.0) | 32 018 | 38 |
| | | IL-16 (10.0) | 23 270 | 55 |
| 3 | CHR4 | — | 82 895 | — |
| | | IL-16 (1.2) | 60 517 | 27 |
| | | IL-16 (5.0) | 40 794 | 51 |
| | | IL-16 (20.0) | 15 636 | 81 |
| | | MIP-1α (0.2) | 36 715 | 63 |

Phytohaemagglutinin (PHA)-activated cells were infected with a virus dose equivalent to 5000 ct/min reverse transcriptase (RT) activity; cytokines were added immediately after infection and were present continuously in culture. RT levels reflect means of triplicates and were measured on day 12 post-infection in experiment 1 and on day 7 in experiments 2 and 3.

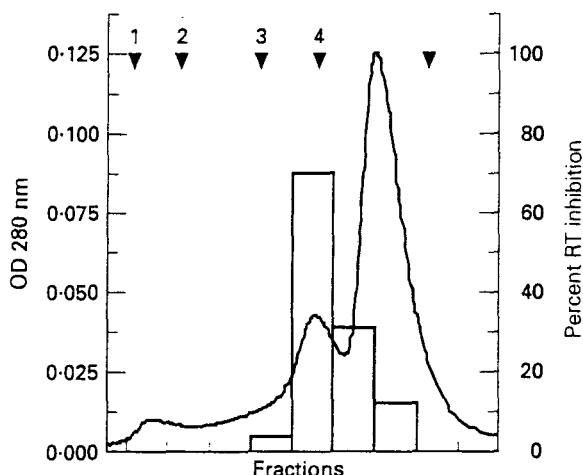


Fig. 1. Separation of various oligomeric forms of IL-16 in the recombinant protein and evaluation of their HIV-suppressing activities. Purified IL-16 (25 µg) was loaded onto gel filtration column at a flow rate of 1 ml/min. Fractions (0.5 ml) were collected, diluted to 1:20 and tested for the inhibition of HIV-1 Bal replication in acutely infected phytohaemagglutinin (PHA) blasts. The solid line represents the optical density (OD) values at 280 nm and open bars reflect the percentage inhibition of reverse transcriptase (RT) levels measured on day 14 post-infection. Arrows indicate the position at which standard molecular weight proteins were eluted from the column: 1 is thyroglobulin (670 kD), 2 is IgG (150 kD), 3 is human serum albumin (67 kD), 4 is ovalbumin (44 kD) and 5 is horse myoglobin (17 kD).

from cells of HIV-infected subjects or healthy controls. Results shown in Table 2 represent the level of lymphocyte apoptosis detectable under different culture conditions, from the two tested groups. The percentage of spontaneous apoptosis in cells from HIV-1-infected subjects was significantly higher than, and over twice as much as that observed in cells from healthy controls. Similarly, the net percentage of AICD by anti-CD3 or by DEX was significantly elevated in cells from HIV-1-infected individuals, whereas that induced by IgM anti-CD95 or by PHA was similar and not significantly different among the two groups (Table 2). In preliminary experiments on cells from three subjects, addition of 0.01, 0.1 or 1 µg/ml of IL-16 to 24 h cultures demonstrated a dose-dependent inhibition of AICD which was maximal at the highest

concentration tested. Thus, 1 µg/ml of IL-16 was then used in all further experiments to evaluate the effects on apoptosis level. As shown in Table 3, cells from healthy individuals incubated for 24 h in the presence of IL-16 showed a significant increase (32%) in the detectable level of spontaneous apoptosis. In contrast, IL-16 did not exert any detectable change in the level of spontaneous apoptosis when added to cells from HIV-1-infected subjects. Addition of the β-chemokine MIP-1α to cell cultures from the HIV group slightly increased the percentage of lymphocytes undergoing spontaneous apoptosis, although this effect did not attain statistical significance ($P > 0.05$, Wilcoxon matched-pairs test). On the other hand, IL-16 appeared to exert a different profile of activity on the level of AICD (Table 3). Thus, in cell cultures from healthy controls, the co-addition of IL-16 with DEX or with PHA reduced significantly by 29% and 15%, respectively, the level of AICD. No significant effect could be attributed to IL-16 in the protection against anti-CD3- or anti-CD95-induced apoptosis. Under the same culture conditions, costimulation of cells from HIV-1-infected subjects with IL-16 reduced significantly the apoptosis level induced by anti-CD3 (22%), by anti-CD95 (53%) or by DEX (27%), without modifying the level induced by PHA (2%). However, costimulation with MIP-1α at 0.25 µg/ml did not appear to exert any protective activity against DEX- or PHA-induced cell death in cultures from HIV-1-infected individuals (Table 3).

Representative data, using flow cytometric analysis, of the protective activity of IL-16 against DEX-induced apoptosis in cells from one infected subject are shown in Fig. 2. Cultures maintained in medium without any stimulants for a period of 24 h showed 14.3% YOPRO-1⁺ cells undergoing spontaneous apoptosis (Fig. 2a). The percentages of YOPRO-1⁺ cells in parallel cultures stimulated either with DEX (Fig. 2b) or with DEX and IL-16 (Fig. 2c) were found to increase to 34.8% or to 24.6%, respectively. Thus, addition of IL-16 to DEX-treated cultures resulted in 50% protection against AICD.

Effect of IL-16 on CD95 expression

The level of AICD in CD4⁺ lymphocytes has been attributed to increased expression of the death receptor CD95 [13,14]. In an attempt to understand the mechanism of the protective activity of IL-16 on AICD, we analysed the level of surface expression of CD95 on CD4⁺ lymphocytes following stimulation of PBMC with DEX, with anti-CD3 or with PHA in the absence or presence

Table 2. Levels of spontaneous apoptosis and AICD in lymphocytes from healthy controls and HIV-infected subjects

| Subjects tested | Percent spontaneous apoptosis | Percent AICD by | | | |
|-----------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| | | Anti-CD3 | Anti-CD95 | DEX | PHA |
| Healthy | 6.7 ± 0.5 (n = 16)* | 1.6 ± 0.7 (n = 15) | 2.4 ± 1.3 (n = 8) | 9.1 ± 1.3 (n = 16) | 15.1 ± 2.5 (n = 12) |
| HIV-infected | 15.1 ± 1.1† (n = 34) | 4.7 ± 0.8† (n = 33) | 3.6 ± 0.9 (n = 18) | 13.9 ± 0.8† (n = 34) | 13.0 ± 2.3 (n = 21) |

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured for 24 h in the absence or presence of anti-CD3, anti-CD95, dexamethasone (DEX) or phytohaemagglutinin (PHA). The presented percentages of cells undergoing AICD (% AICD) reflect the means ± s.e.m. of net values obtained over those of spontaneous apoptosis.

*Number of individuals tested.

†Significantly different from the corresponding values of healthy subjects ($P < 0.05$; Mann-Whitney U-rank test).

Table 3. Modulation of the levels of spontaneous apoptosis and AICD by IL-16 or macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)

| Activator used | Cytokine added | Percent modulation of apoptosis levels in cells from | |
|----------------|----------------|--|--------------------|
| | | Healthy controls | HIV-infected |
| None | IL-16 | 31.9 ± 11.1* (16)† | 0.2 ± 5.5 (34) |
| None | MIP-1 α | ND | 9.1 ± 5.4 (10) |
| Anti-CD3 | IL-16 | 3.2 ± 13.0 (15) | -21.8 ± 9.6* (33) |
| Anti-CD95 | IL-16 | 7.8 ± 23.0 (8) | -53.4 ± 28.1* (18) |
| DEX | IL-16 | -28.8 ± 10.5* (16) | -26.6 ± 5.4* (34) |
| DEX | MIP-1 α | ND | 11.2 ± 7.3 (10) |
| PHA | IL-16 | -15.2 ± 3.3* (12) | 2.0 ± 8.3 (21) |
| PHA | MIP-1 α | ND | 27.0 ± 3.7 (8) |

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured for 24 h in the absence or presence of activators and one cytokine (IL-16 at 1 μ g/ml or MIP-1 α at 0.25 μ g/ml). Changes in the level of apoptosis due to the presence of a cytokine were calculated as described in Subjects and Methods; presented values are the means ± s.e.m. and negative values reflect reduced levels of apoptosis. ND, Not done.

* Significant differences ($P < 0.05$; Wilcoxon matched-pairs test) between values obtained in the presence and in the absence of cytokine.

† Number of individuals tested.

of IL-16. Results presenting the percentages of CD4 $^+$ and CD95 $^+$ gated lymphocytes in cultures from nine HIV-1-infected subjects are shown in Fig. 3. The mean of double-positive lymphocytes in DEX-treated cultures was 21.1%, and this was found to become significantly reduced in cultures stimulated with DEX and IL-16 (Fig. 3a). Similarly, co-addition of IL-16 with anti-CD3 decreased the percentage of CD4 and CD95 double-positive cells from 36% to 28%. Although this effect did not attain statistical significance ($P > 0.05$), the reduction in the expression of CD95 on CD4 $^+$ lymphocytes could be observed in cultures from seven out of nine tested subjects (Fig. 3b). On the other hand, no change in the percentage of CD4 $^+$ lymphocytes expressing CD95 could be attributed to IL-16 in PHA-stimulated cultures (Fig. 3c).

DISCUSSION

Important advances have recently been made in the recognition of processes involved in HIV-1 entry into cells and in the identification of cytokines with virus-suppressing activities [22–25]. Several α and β chemokine receptors were found to serve as cofactors used by different HIV-1 isolates to infect different cell populations [22,23]. The respective ligands of these receptors were in turn reported to block viral entry [24,25]. On the other hand, IL-16, the lymphocyte chemoattractant that binds to the major HIV-1 receptor CD4, has also been identified as inhibitor of HIV replication in acutely infected PBMC cultures [17,26]. Our results, using M- and T-tropic virus isolates, confirm these earlier findings and the requirement to use 5 μ g/ml of the recombinant cytokine produced in the *E. coli* expression system, to achieve 50% inhibition of viral replication. The need for such a high concentration of recombinant IL-16 was attributed to different folding characteristics of the bacterially derived protein [17]. Our data support these findings and show that the protein derived from expression in *E. coli* is mostly in monomeric or dimeric forms which lack HIV-suppressing activity. Analysis of different batch preparations of IL-16 revealed that the tetrameric form responsible for the virus-inhibiting effect did not exceed 10% of the total protein. Although these results do not clarify the reasons for the improper folding of the bacterially derived IL-16, they clearly suggest that when present in properly folded active form, tetrameric IL-16 exerts potent HIV-suppressing activity at nm concentrations. Similar virus-inhibiting concentrations of the cytokine have been recently reported in Jurkat cells transfected with IL-16 cDNA [18]. The mechanism of HIV suppression by IL-16 has been shown not to involve steric inhibition of viral binding to CD4, but to be mediated through repression of HIV long-terminal repeat promoter activity [27]. Interference with the transcription of early HIV regulatory genes has also been suggested as a complementary or alternative mechanism [18]. All these observations have been made on CD4 $^+$ lymphoid cells, but whether similar IL-16-mediated effects operate on reservoir cells, including macrophages and dendritic cells, is not yet known and needs to be addressed in future studies. Another issue which still awaits clarification is related to the question of whether the 130 amino acid recombinant IL-16 represents a major form of the naturally secreted cytokine [28]. This would be relevant for a proper

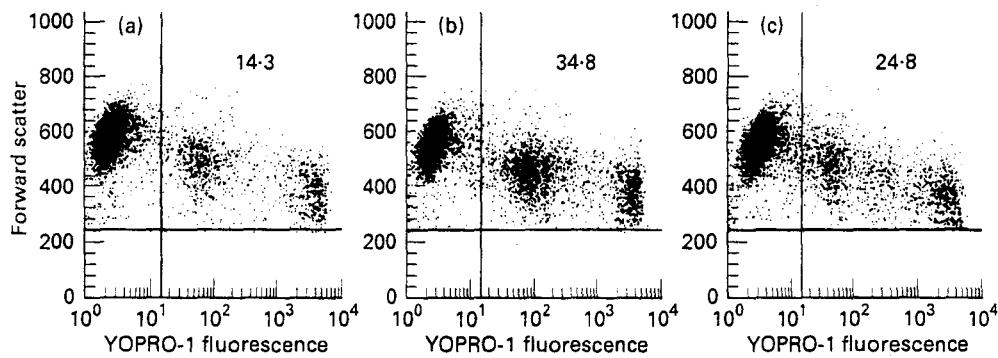


Fig. 2. Flow cytometric analysis of the protective effect of IL-16 on dexamethasone (DEX)-induced apoptosis. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from one HIV-infected subject were cultured for 24 h with (a) medium, (b) DEX and (c) DEX and IL-16. Cells undergoing apoptosis were quantified by staining with YOPRO-1 dye and the percentage of positive cells in the upper right quadrant reflects that of apoptotic cells.

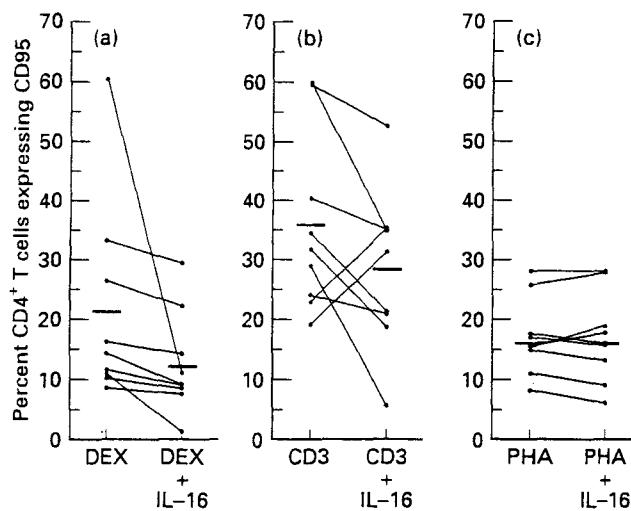


Fig. 3. Effect of IL-16 on CD95 expression in CD4⁺ lymphocytes. Peripheral mononuclear cells from HIV-infected subjects were cultured for 24 h with (a) dexamethasone (DEX), (b) anti-CD3 antibodies and (c) phytohaemagglutinin (PHA), in the absence or presence of IL-16 (1 µg/ml). Cells were then double-stained with fluorescein-conjugated anti-CD4 and PE-conjugated anti-CD95. Plotted values represent the percentage of CD4⁺ lymphocytes expressing CD95. Bars indicate the arithmetic mean values.

understanding of the physiological role of natural IL-16 in the inhibition of HIV replication *in vivo*. However, clarification of this issue will not modify the potential value of recombinant IL-16 in the therapeutic approaches against HIV infection.

Cross-linking CD4 molecules by HIV-envelope protein gp160 or by anti-CD4 antibodies has been shown to induce lymphocyte apoptosis in PBMC cultures from normal individuals. This effect was found to be related to an up-regulation of CD95 expression on lymphocytes through the induced secretion of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and IFN- γ [29,30]. We have also observed a small yet significant increase in spontaneous apoptosis of lymphocytes from healthy donors following incubation with IL-16. However, this was not the case when cells from HIV-infected subjects were treated with the cytokine, and no modification of the already elevated level of spontaneous apoptosis could be detected. Although we have not analysed the mechanisms of this phenomenon, the difference in the effects of IL-16 could be explained by a difference in the responsiveness of CD4 lymphocytes from patients to the chemoattractant cytokine. This may well be attributed to an altered state of cell activation, to an altered level of CD4 expression and/or to an altered efficiency in signal transduction. Alternatively, the explanation may be an indirect one related to defective responses of accessory cells from patients to IL-16. This is supported by two independent findings: (i) an abnormal function of monocytes in HIV-1 infected subjects [31], and (ii) the need for the presence of accessory cells in the PBMC populations in order to induce lymphocyte apoptosis through CD4 cross-linking [29].

The effect of IL-16 on the inhibition of AICD may reflect a major difference in the outcome of signals transduced following CD4 ligation with different ligands. Cross-linking CD4 molecules with gp120 in the presence of anti-T cell receptor stimulation has been reported to increase AICD through a mechanism involving CD95/CD95 ligand interaction [32]. Similar results have also been obtained when anti-CD4 antibodies were used as the ligand [30,33]. Our findings on the ability of IL-16 to down-regulate

CD95 expression on activated CD4 cells may well explain the protective activity of this cytokine against AICD. However, other alternative or additional mechanisms can not be ruled out, including inhibition by IL-16 of the secretion of cytokines which enhance apoptosis [34]. Such a mechanism would clearly differentiate the activity of IL-16 on AICD from that of other CD4 ligands which are known to induce secretion of cytokines implicated in enhancing PCD [30,35]. Alternatively, the difference in the activity of IL-16 from that of other CD4 ligands may well be linked to the recognition of different epitopes on the CD4 molecule [15]. Signals transduced following the binding of certain anti-CD4 antibodies or gp120 to their respective epitopes have been shown to result in the inhibition of binding activities of nuclear factors that are known to up-regulate gene enhancer activity of IL-2 [36]. In addition, different CD4 epitopes have been reported to induce distinct signalling properties, and those recognized by anti-CD4 or gp120 were found inefficient in activating the transcription factor NF-AT, needed for IL-2 gene expression [37]. The latter cytokine, however, is known to possess apoptosis-inhibiting effects on cells from HIV-infected subjects [38]. Thus, it will be of high interest to examine in future studies whether signalling via the IL-16 epitope on CD4 could result in up-regulating IL-2 enhancer activity. On the other hand, the ability of all three CD4 ligands, IL-16, gp120 and anti-CD4, to inhibit HIV replication [39,40] argues that such an effect would have to be mediated by mechanisms that are different from those implicated in regulating apoptosis. This is also substantiated by our findings that MIP-1 α exerts HIV-suppressing but lacks anti-apoptotic activities.

The protective effect of IL-16 against AICD appears to be dependent on the nature of the activator used and on the immune status of lymphocytes tested. In this respect, IL-16 protected lymphocytes from HIV-infected subjects against PCD induced by anti-CD3, by IgM anti-CD95 or by DEX, whereas no such effect could be noted on PHA-induced apoptosis. These findings could be explained by the inability of IL-16 to down-regulate CD95 expression in PHA-stimulated cells (Fig. 3). Alternatively, CD95/CD95 ligand interaction may not be involved in the process of AICD following PHA stimulation of cells from HIV-infected subjects. This would be in agreement with previous findings demonstrating that AICD can be mediated by multiple and/or different mechanisms [41,42]. In addition, our findings of a protective activity of IL-16 on the PHA-induced apoptosis of lymphocytes from healthy controls suggest that distinct mechanisms, which could be triggered by the same activator, may operate in health and in disease [43].

Finally, the state of chronic immune activation in HIV infection has been linked to the gradual and continuous process of immune deficiency resulting from T cell depletion [44]. Although the evidence for a direct correlation between the level of viral load and cell apoptosis is still questionable [45], results on the use of highly active anti-retroviral therapy suggest a direct relationship between sustained suppression of viral replication and enhanced lymphocyte count or immune recovery [46]. Moreover, effective anti-retroviral treatment has been recently demonstrated to result in down-regulation of CD95-ligand expression on T cells, suggesting that significant reduction in virus replication could lead to a decrease in the PCD of uninfected cells [47]. Thus, therapeutics capable of inhibiting viral replication and simultaneously blocking AICD may have stronger and more rapid effects in the treatment of HIV disease. Our results on the efficacy of IL-16 to down-regulate both processes related to the infection give a high potential and

priority for the clinical development of this cytokine as adjunct therapy to anti-retrovirals.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr J. P. Kusnierz for his assistance in the flow cytometry analyses, to M. Loyens and C. Godin for the purification of IL-16, to J. Dewulf for carrying out the infection assays, and to C. Vincent for typing the manuscript. This work was supported by a research grant (no. 97088) from the Agence National pour la Recherche contre le SIDA in France.

REFERENCES

- Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijnster MJ, Keet RPM, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Sci* 1992; **257**:217-9.
- Groux H, Torpier G, Monté D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992; **175**:331-40.
- Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurrie R, Haigwood N, Sekaly RP, Finkel TH. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* 1992; **176**:1099-106.
- Westendorp MO, Frank R, Ochsenerauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 tat and gp120. *Nature* 1995; **375**:497-500.
- Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Med* 1995; **1**:129-34.
- Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons: Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol* 1995; **154**:5555-66.
- Pandolfi F, Pierdomini M, Oliva A et al. Apoptosis-related mortality *in vitro* of mononuclear cells from patients with HIV infection correlates with disease severity and progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir* 1995; **9**:450-8.
- Gougeon ML, Lecoeur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoisier M, Goujard C, Debord T, Montagnier L. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: Increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 1996; **156**:3509-20.
- Carbonari M, Cibati M, Pesce AM, Sbarigia D, Grossi P, D'Offizi G, Luzi G, Fiorilli M. Frequency of provirus-bearing CD4+ cells in HIV type 1 infection correlates with extent of *in vitro* apoptosis of CD8+ but not CD4+ cells. *AIDS Res Hum Retrovir* 1995; **11**:789-94.
- Gougeon ML, Garcia S, Heeney J et al. Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections. *AIDS Res Hum Retrovir* 1993; **9**:553-63.
- Clerici M, Sarin A, Coffman RL et al. Type 1/type 2 cytokine modulation of T cell programmed cell death as a model for human immunodeficiency virus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**:11811-5.
- Estquier J, Idziorek T, Zou W, Emilie D, Farber CM, Bourez JM, Ameisen JC. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 1995; **182**:1759-67.
- Sloane EM, Young NS, Kumar P, Weichold PF, Sato T, Maciejewski JP. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. *Blood* 1997; **89**:1357-63.
- Oyaizu N, Adachi Y, Hashimoto F, McCloskey TW, Hosaka N, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cells apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection. *J Immunol* 1997; **158**:2456-63.
- Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin-16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 1996; **17**:476-81.
- Cruikshank WW, Lim K, Theodore AC, Cook J, Fine G, Weller PF, Center DM. IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J Immunol* 1996; **157**:5240-8.
- Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, Kurth R. HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 1995; **378**:563.
- Zhou P, Goldstein S, Devadas K, Tewari D, Notkins AL. Human CD4+ cells transfected with IL-16 cDNA are resistant to HIV-1 infection: inhibition of mRNA expression. *Nature Med* 1997; **3**:659-64.
- Cruikshank WW, Center DM, Nisar N, Wu M, Natke B, Theodore AC, Kornfeld H. Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**:5109-13.
- Idziorek T, Estquier J, De Beil F, Ameisen JC. YOPRO-1 allows cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with living cell viability. *J Immunol Methods* 1995; **185**:249-58.
- Rey MA, Spire B, Dormont D, Barré-Sinoussi F, Montagnier L, Chermann JC. Characterization of the RNA dependent DNA polymerase of a new human T-lymphotropic retrovirus (lymphadenopathy associated virus). *Biochem Biophys Res Commun* 1984; **121**:126-33.
- Choe H, Farzan M, Sun Y et al. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; **85**:1135-48.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; **272**:872-7.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; **270**:1811-5.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; **382**:829-33.
- Mackewicz CE, Levy JA, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. Role of IL-16 in HIV replication. *Nature* 1996; **383**:488-9.
- Maciaszek JW, Parada NA, Cruikshank WW, Center DM, Kornfeld H, Viglianti GA. IL-16 represses HIV-1 promoter activity. *J Immunol* 1997; **158**:5-8.
- Baier M, Bannert N, Werner A, Lang K, Kurth R. Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:5273-7.
- Oyaizu N, McCloskey TW, Coronelli M, Chirmule N, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linking PBMCs from normal individuals. *Blood* 1993; **82**:3392-400.
- Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Hu R, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Cross-linking of CD4 molecules upregulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing interferon- γ and tumor necrosis factor- α secretion. *Blood* 1994; **84**:2622-31.
- Yoo J, Chen H, Kraus T, Hirsch D, Polyak S, George I, Sperber K. Altered cytokine production and accessory cell function after HIV-1 infection. *J Immunol* 1996; **157**:1313-20.
- Accornero P, Radizzani M, Delia D, Gerosa F, Kurrie R, Colombo MP. Differential susceptibility to HIV-GP120-sensitized apoptosis in CD4+ T cell clones with different T-helper phenotypes: role of CD95/CD95L interactions. *Blood* 1997; **89**:558-69.
- Newell MK, Haughn LJ, Maroun CR, Julius MH. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T cell receptor of antigen. *Nature* 1990; **347**:286-9.
- Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Pahwa S. Inhibition of CD4

Regulation of apoptosis by IL-1 β

91

- cross-linking-induced lymphocytes apoptosis by vesnarinone as a novel immunomodulating agent: vesnarinone inhibits Fas expression and apoptosis by blocking cytokine secretion. *Blood* 1996; **87**:2361–8.
- 35 Clouse KA, Casentino LM, Weih KA, Pyle SW, Robbins PB, Hochstein HD, Natarajan V, Farrar WL. The HIV-1 gp120 envelope protein has the intrinsic capacity to stimulate monokine secretion. *J Immunol* 1991; **147**:2892–901.
- 36 Jabado N, Le Deist F, Fischer A, Hivroz C. Interaction of HIV, gp120 and anti-CD4 antibodies with the CD4 molecule on human CD4+ T cells inhibits the binding activity of NF-AT, NF- κ B and AP-1, three nuclear factors regulating interleukin-2 gene enhancer activity. *Eur J Immunol* 1994; **24**:2646–52.
- 37 Baldari CT, Milia E, Di Somma MM, Baldoni F, Valitutti S, Telford JL. Distinct signaling properties identify functionally different CD4 epitopes. *Eur J Immunol* 1995; **25**:1843–50.
- 38 Cordiali Fei P, Solmone M, Viora M, Vanacore P, Pugliese O, Giglio A, Caprilli E, Ameglio E. Apoptosis in HIV-infection: protective role of IL-2. *J Biol Regul Homeost Agents* 1994; **8**:60–64.
- 39 Benkirane MD, Corbeau P, Housse TV, Deveaux C. An antibody that binds the immunoglobulin CDR3-like region of the CD4 molecule inhibits provirus transcription in HIV-infected T cells. *EMBO J* 1993; **12**:4909–12.
- 40 Tremblay M, Meloche S, Gratton S, Wainberg MA, Sekaly RP. Association of P56-lck with the cytoplasmic domain of CD4 modulates HIV-1 expression. *EMBO J* 1994; **13**:774–83.
- 41 Katsikis PD, Garcia-Ojeda ME, Torres-Roca JF, Greenwald DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. HIV type 1 tat protein enhances activation-but not Fas (CD95)-induced peripheral blood T cell apoptosis in healthy individuals. *Int Immunol* 1997; **9**:835–41.
- 42 Moreno MB, Memon SA, Zacharchuk CM. Apoptosis signaling pathways in normal T cells: differential activity of Bcl-2 and IL-1beta-converting enzyme family protease inhibitors on glucocorticoid- and Fas-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1996; **157**:3845–9.
- 43 Kovacs B, Vassilopoulos D, Vogelgesang SA, Tsokos GC. Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF- α . *Clin Immunol Immunopathol* 1996; **81**:293–302.
- 44 Gougeon ML, Lecoeur H, Boudet F et al. Lack of chronic immune activation in HIV-infected chimpanzees correlates with the resistance of T cells to Fas/Apo-1 (CD95)-induced apoptosis and preservation of a T helper phenotype. *J Immunol* 1997; **158**:2964–76.
- 45 Rothen M, Gratzel S, Hirsch HH, Moroni C. Apoptosis in HIV-infected individuals is an early marker occurring independently of high viremia. *AIDS Res Hum Retrovir* 1997; **13**:771–9.
- 46 Autran B, Carcelain G, Li TS et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997; **277**:112–6.
- 47 Böhler T, Herr I, Debatin KM, Geiss M, Haas J. Downregulation of increased CD95 (APO-1/Fas) ligand in T cells from human immunodeficiency virus-type 1-infected children after antiretroviral therapy. *Blood* 1997; **90**:886–7.

RESULTATS 4

ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE REGULATION OF LYMPHOCYTE APOPTOSIS AND HIV-1 MULTIPLICATION

Emmanuel HERMANN*, Thierry IDZIOREK*, Jean-Pierre KUSNIERZ*, Yves
MOUTON†, André CAPRON* and George M. BAHR*

International Journal of Immunopharmacology

OBJECTIFS

Nous avons vu dans l'introduction que le monoxyde d'azote possède des activités microbicides contre des parasites intracellulaires mais aussi contre certains virus et en particulier un rétrovirus murin, le F-MuLV (Friend murine leukemia virus). Nous nous sommes attachés à déterminer le rôle du monoxyde d'azote dans la pathogénèse du virus de l'immunodéficience humaine. A cette fin, nous avons porté notre attention sur deux points importants de la maladie, l'apoptose des cellules T et la multiplication virale dans les cellules réservoirs représentées par les macrophages. Notre but était d'établir une corrélation entre la libération de NO°, l'apoptose des cellules T et la multiplication virale.

MISE AU POINT

Pour cette étude, nous avons utilisé un inhibiteur de la NOS-i, la L-NMA (N méthyl arginine) et une molécule donneuse de NO°, la S-nitroso-acétyl-penicillamine ou SNAP, qui libère spontanément du monoxyde d'azote dans le milieu de culture cellulaire. Une autre molécule donneuse de NO°, SIN-1 (6-morpholino-sydnominine), a été testée. La concentration optimale de L-NMA avait déjà été déterminée lors d'études antérieures dans le laboratoire, mais il nous a fallu évaluer la toxicité des molécules SNAP et SIN. A cette fin des cellules mononucléées du sang périphérique provenant de donneurs sains ont été incubées en présence de SIN-1 ou de SNAP à différentes concentrations (Fig. 6) pendant 24 et 48 heures. La production de monoxyde d'azote a été détectée en dosant les nitrites, un métabolite du NO°, par la méthode de Griess, dans les surnageants de culture. La mort cellulaire a

été mesurée par cytométrie de flux à l'aide d'un marqueur fluorescent, le YOPRO-1.

A concentrations égales ($100\mu\text{M}$), nous pouvons constater que SIN-1 libère plus de nitrites ($52,5\mu\text{M}$ à 24h) que SNAP ($27\mu\text{M}$ à 24h). L'apoptose spontanée augmente, à 24 heures et 48 heures, de façon dose-dépendante en présence de SIN-1 et à un moindre degré de SNAP. Néanmoins, l'augmentation de l'apoptose spontanée n'est observée que pour des concentrations importantes de SIN-1 ($300\mu\text{M}$) et de SNAP ($400\mu\text{M}$). Lorsque les cellules sont activées par des anticorps anti-CD3, l'induction de l'apoptose par SIN-1 et SNAP est de nouveau dose-dépendante, avec les effets les plus spectaculaires à des concentrations élevées de donneur de NO[°].

Nos résultats indiquent que la molécule SNAP à une concentration de $200\mu\text{M}$ induit, après 24 heures d'incubation, peu d'apoptose spontanée par rapport aux cellules non traitées (respectivement 9,5% et 6,5%). Parallèlement, une importante présence de nitrites ($48\mu\text{M}$) est détectée dans le surnageant cellulaire. De la même façon, SNAP accroît peu la mort cellulaire induite par l'activation via les anticorps anti-CD3 (respectivement 9% et 7%) malgré la présence de nitrites ($45\mu\text{M}$). SIN-1, par le fait qu'il libère plus de monoxyde d'azote que le SNAP, mais aussi des peroxynitrites, est très toxique pour les cellules. Ainsi, SIN-1 apparaît comme une molécule possédant une toxicité intrinsèque trop élevée pour notre étude. C'est donc la molécule SNAP que nous avons choisi pour évaluer la sensibilité de cellules provenant de patients.

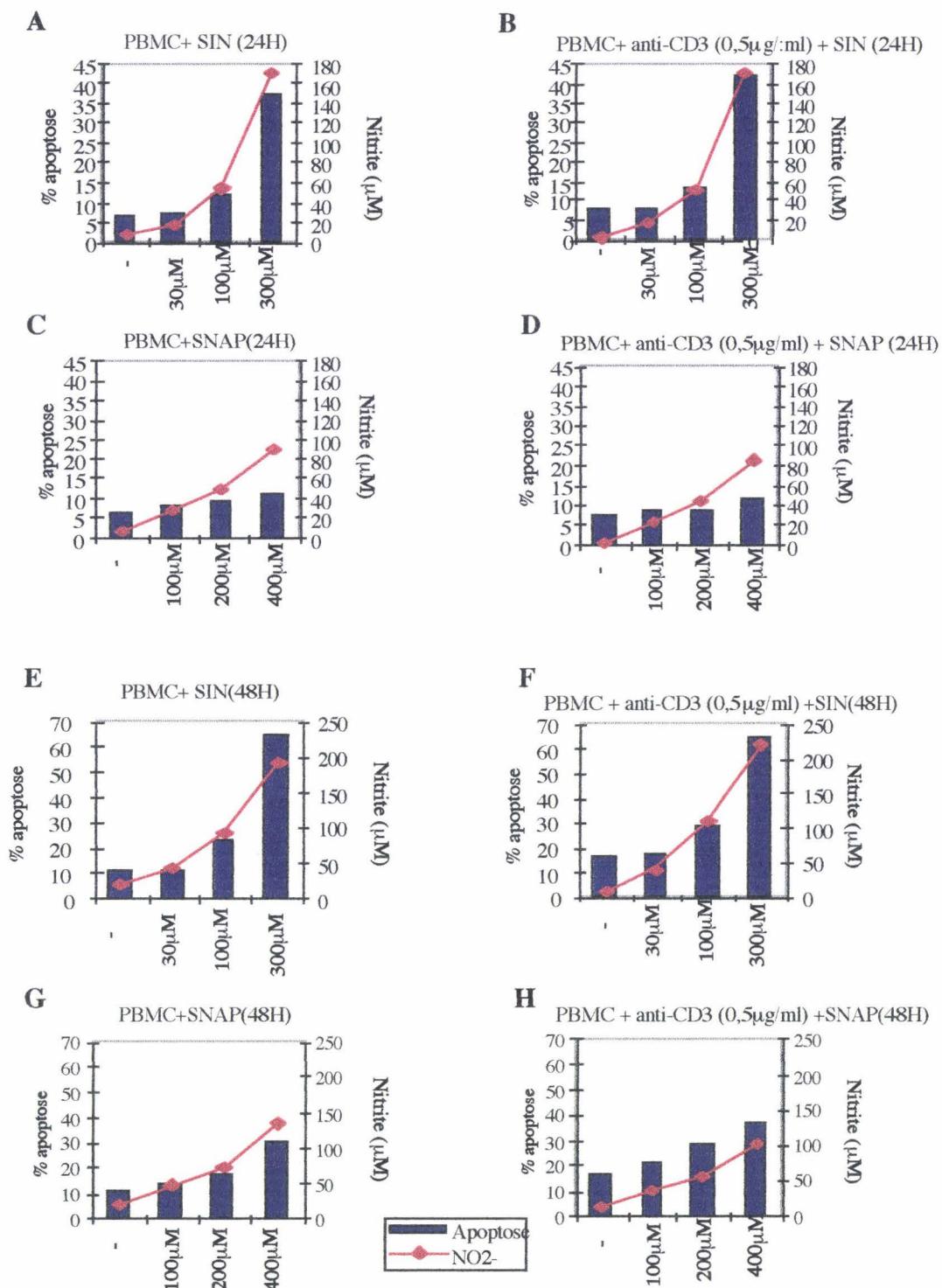


Figure 6: Effet de SIN-1 et SNAP après 24h (A et B; C et D) et 48h (E et F; G et H) d'incubations sur l'apoptose de PBMC en l'absence ou en présence d'anticorps anti-CD3. Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules en apoptose et les courbes la concentration de nitrites mesurée dans le surnageant. Les valeurs représentent la moyenne de deux expériences indépendantes.

Nous avons également évalué l'effet de SNAP sur la viabilité des macrophages ou sur leur adhérence. Nous avons ainsi incubé SNAP en présence de macrophages infectés, et de façon continue, avec une gamme de concentrations de 100 à 1000 μ M. Nous avons observé une inhibition dose-dépendante de la multiplication virale mesurée par la p24. Cependant la détection de la viabilité cellulaire par une coloration au bleu de méthylène nous a permis d'observer un fort degré de toxicité. Pour cette raison, nous avons réduit notre temps d'incubation de SNAP à 24h, avant et pendant l'infection, afin d'éviter la toxicité de SNAP.

RESULTATS

Nous n'avons pas observé de libération de monoxyde d'azote par les cellules T de sujets infectés par VIH-1. De plus, les PBMC provenant de patients produisent moins de monoxyde d'azote que ceux provenant de sujets sains. De même, l'infection des macrophages ne résulte ni en la production de NO°, ni en l'accumulation de l'ARN messager de NOS-i.

Nous avons donc étudié l'effet de donneurs de NO° ou d'inhibiteurs de la NO-synthase sur l'apoptose des cellules T. Notre étude ne nous indique pas d'effets majeurs du monoxyde d'azote sur la mort cellulaire induite par l'activation. Mais le NO° module légèrement l'apoptose spontanée des patients. En effet, l'ajout de SNAP augmente de 21 à 24% la mort cellulaire spontanée. Au contraire l'ajout de L-NMA la diminue de 21 à 18%, mais sans évidence de diminution de production de NO° puisque les niveaux sont déjà très bas. Aucun effet n'est observé au niveau des PBMC des sujets sains.

Le taux d'apoptose spontanée des PBMC est deux fois plus élevé chez les patients que chez les sujets sains. Ainsi, puisque, les cellules des sujets sains libèrent spontanément plus de NO° que celles des patients ($5,7 \pm 0,8 \mu$ M et $1,9 \pm 0,6 \mu$ M, respectivement), qu'une importante

présence de NO° n'induit pas ou peu d'apoptose respectivement dans les cellules de sujets sains et les cellules de patients, nos résultats ne mettent pas en évidence de lien direct entre le monoxyde d'azote et l'apoptose.

Enfin, l'ajout de SNAP et de L-NMA sur des macrophages infectés par une souche de HIV (HIV-Bal), ne change en rien la multiplication du virus.

Ainsi, dans notre système d'étude, nos résultats ne mettent pas en évidence un rôle du monoxyde d'azote dans la diminution des lymphocytes T CD4+ dans la maladie du SIDA, ni de lien avec le taux de multiplication virale. Dans ce cas, le monoxyde d'azote ne semble pas avoir de rôle majeur dans l'immunopathogénèse du VIH.



PII: S0192-0561(97)00060-X

ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE REGULATION OF LYMPHOCYTE APOPTOSIS AND HIV-1 REPLICATION

EMMANUEL HERMANN,* THIERRY IDZIOREK,* JEAN-PIERRE KUSNIERZ,*
 YVES MOUTON,† ANDRE CAPRON* and GEORGE M. BAHR**‡

* Immunopathogénèse du SIDA, Unité INSERM 167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, Lille, France and † Centre Hospitalier de Tourcoing, Pavillon Trouseau, 135 rue du Président Coty, Tourcoing, France

(Received 7 March 1997)

Abstract—Nitric oxide (NO) has been implicated in certain immunopathogenetic mechanisms during the course of infection with human immunodeficiency virus (HIV). We have evaluated the levels of NO release and lymphocyte apoptosis in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures from HIV-1 infected subjects and healthy controls. We have also examined these 2 parameters in parallel cultures maintained under conditions where either NO synthesis was inhibited or high level of NO was present. Nitrite contents in culture supernatants were measured as the stable end products of the released NO. Levels of spontaneous apoptosis and activation-induced cell death (AICD) by anti-CD3 or by phytohemagglutinin were evaluated using flow cytometry. Additional experiments were also aimed at addressing a potential link between NO synthesis and HIV-1 replication in human monocyte-derived macrophages (MDMs). Acutely infected MDMs with HIV-1Bal were maintained in culture, without any additional activation signal, for a period of 14 days. Nitrates in the supernatants and mRNA accumulation of the inducible NO synthase (iNOS) in infected cells were assessed over the whole culture period. In addition, the effect of blocking NO synthesis during and after infection of MDMs, using an inhibitor of NO, was evaluated on the level of viral replication as measured by the presence of P24 antigen in the supernatants. Similarly, the effect on HIV replication of high NO levels in MDM cultures, supplied by a donor of NO during the 24 h period of infection, was also studied.

We conclude that no elevation in NO release could be detected in PBMC cultures from HIV-1 infected subjects and that modulation of NO content may slightly regulate the level of spontaneous lymphocyte apoptosis but not that of AICD. Infection of MDMs with HIV-1 does not seem to induce detectable NO release or iNOS mRNA accumulation. Similarly, neither inhibition of NO synthesis nor the presence of high NO levels during the infection period could modify the outcome of virus replication in macrophages. © 1998 International Society for Immunopharmacology.

Keywords: nitric oxide, lymphocyte apoptosis, HIV replication, macrophages

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is one of the major constituents of the oxidative stress generated from the oxidation of the terminal guanidino nitrogen atoms of L-arginine by the constitutive or inducible NO synthase (iNOS) (Moncada and Higgs, 1993). The free radical has been found to play a critical role in a variety of physiological responses (Nathan, 1992) and to mediate, at least partly, protective immunity against microbial organisms and tumors (Assreuy *et al.*, 1994; Denis, 1991; Jenkins *et al.*, 1995; Munoz-Fernandez *et al.*, 1992). Murine cells of the monocyte/macrophage lineage have been reported to express high levels of

iNOS mRNA following stimulation with macrophage activators including lipopolysaccharide (LPS) and inflammatory cytokines (Albina *et al.*, 1993; Weinberg *et al.*, 1995). However, in man, the ability of monocyte/macrophage cells to express iNOS mRNA and to release NO has been frequently a matter of controversy (Denis, 1991; Schneemann *et al.*, 1993). A role for NO in enhancing or inducing programmed cell death (PCD) was suggested in different experimental models (Albina *et al.*, 1993; Fensel *et al.*, 1995; Sarig *et al.*, 1993). In contrast, this reactive nitrogen intermediate was found to protect human B-lymphocytes from apoptosis following infection with Epstein Barr Virus (Mannick *et al.*, 1994). Thus, the role of NO in

‡ Author to whom correspondence should be addressed at: Institut Pasteur de Lille, Inserm U167, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Tel: 33 3 20 87 71 68. Fax: 33 3 20 87 78 88. E-mail: georges.bahr@pasteur-lille.fr

regulating cell apoptosis appears to be a complex issue and may depend, among other factors, on the cell type or the species studied.

Human immunodeficiency virus (HIV) infection is known to induce a state of immune dysfunction which is partly attributed to an increased level of lymphocyte apoptosis (Estquier *et al.*, 1994; Oyaizu *et al.*, 1993). Lymphocyte subsets in HIV-infected subjects were found to be preferentially depleted due to glutathione redox disturbances (Aukrust *et al.*, 1996). On the other hand, increased serum levels of nitrates and nitrites, the stable end products of NO, were reported in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS), but not in HIV-infected subjects who have not progressed to AIDS (Baldeweg *et al.*, 1996). In addition, stimulation of human monocyte-derived macrophages (MDMs) with HIV-1 envelope glycoprotein gp120, was found to induce the release of NO (Pietraforte *et al.*, 1994). The same viral antigen as well as another regulatory protein were also reported to directly induce T-cell apoptosis (Westendorp *et al.*, 1995). Thus, a role for NO in regulating the level of PCD in HIV infection has been proposed and certain correlations have been made between increased NO release and high viral load in infected patients (Groeneveld *et al.*, 1996).

To gain further insight into the link between NO release, lymphocyte apoptosis and HIV replication, we have carried out a series of experiments, using NO donor or inhibitor, to study direct cause effect relationship. We have evaluated the level of spontaneous apoptosis and activation-induced cell death (AICD) of lymphocytes from healthy controls and HIV-infected subjects using different culture conditions. Furthermore, we have addressed the issue as to whether HIV-1 infection of MDM results in enhanced NO release and/or increased mRNA accumulation of iNOS. Finally, we have evaluated viral replication in MDM under conditions where NO release was continuously blocked during the whole culture period or where high levels of NO were made available prior to and during the 24 h of infection. Our results do not support a critical role of NO in either AICD or in controlling HIV replication in infected cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents

The NO inhibitor N-methyl-L-arginine (LNMA), the NO donor S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) and LPS were purchased from Sigma chemi-

cals (St Quentin Fallavier, France). The nuclear dye YO-PRO-1 was purchased from Molecular Probes (Interchim, Montluçon, France). Interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis α (TNF- α) were purchased from R&D Systems Europe (Abingdon, U.K.), Granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) was kindly provided by Sandoz Research Institute (Vienna, Austria) and muramyl dipeptide (MDP) by Vacsyn S.A. (Paris, France).

Subjects tested

Blood samples were obtained from 9 healthy donors and from 18 HIV-infected subjects. Patients were clinically classified according to criteria from Centers for Disease Control and Prevention. Seven were asymptomatic (grade A) with CD4 $^{+}$ T-cell counts ranging from 288–970 cells per mm 3 (mean \pm S.D., 592 \pm 244) and eleven were symptomatic (grade B) with CD4 $^{+}$ T-cell counts ranging from 394–699 cells per mm 3 (mean \pm S.D., 518 \pm 111). Twelve patients were receiving antiretroviral therapy.

Cell cultures

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human heparinized blood samples were isolated using Ficoll-Paque density gradient centrifugation. PBMCs were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine and 2 mM sodium pyruvate. Stimulation experiments were carried out using 0.5 μ g/ml immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies (Immunotech, Marseille, France) or 1 μ g/ml phytohemagglutinin (PHA) purchased from Sigma chemicals (St Quentin Fallavier, France). In all cases, PBMCs were cultured in the absence or in the presence of LNMA or SNAP for 24 h. Following preliminary dose response studies, 5 mM LNMA was found to block NO release and 200 μ M SNAP to result in high nitrites level without any detectable toxicity on cells during 24 h culture period. These concentrations were then selected in all further experiments.

Monocytes were obtained by culturing PBMCs (1×10^7 cells/ml) in 75 cm 2 plastic flasks for 1 h at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 20% normal human AB serum. Non-adherent cells were recovered by washing the monolayer twice and adherent cells were incubated overnight in RPMI 1640 containing 10% normal human AB serum. Monocytes were then collected by gentle scrapping after addition of cold phosphate buffer (Ca $^{2+}$ and Mg $^{2+}$ free) and were allowed to differentiate into macrophages after 5–7 days culture in medium containing 10% human AB serum.

HIV infection

Monocyte-derived macrophages (MDM) were infected with HIV-1Bal (5000 cpm reverse transcriptase activity/10⁶ cells) for 24 h at 37°C. Free virus was removed by washing the monolayers 3 times with medium and the cells were then kept in culture for a period of 14 days. Cultures were fed twice a week with fresh medium. In experiments aimed at addressing the effect of NO on virus replication, the inhibitor LNMA was added to MDM cultures 4 h before infection, was maintained during the infection period and continuously thereafter without any detectable cytotoxicity. In contrast, the NO donor SNAP was found to induce certain cytotoxicity in long term MDM cultures (infected or uninfected) and therefore was only added to cell cultures 4 h before infection and during the 24 h infection period.

Immunoassay for P24 antigen of HIV-1 was performed using an ELISA kit from Coulter (Margency, France) and following the manufacturer's instructions.

Measurement of apoptosis

Detection of apoptosis was carried out using flow cytometry (Epics Profile, Coulter Coultronics, Margency, France) as previously described (Idziorek *et al.*, 1995). Briefly, after incubation with YO-PRO-1 (5 µM for 10⁶ cells) for 10 min, lymphocytes were gated under forward and side light scatter. Apoptotic cells represented two peaks of high fluorescence intensity and reduced forward scatter. Experiments were run in duplicate and the mean value was taken.

Measurement of nitrite content in supernatants

NO was measured by assaying for nitrates, using the Griess reaction as described previously (Green *et al.*, 1982). The lower limit of detection of the assay was 2 µM.

Northern blot analysis

Total RNA was extracted from 5 × 10⁶ MDMs using 1 ml of RNA-PLUS (Bioprobe Systems, Montrouil-sous-bois, France) and following the manufacturer's instructions. The purified total RNA from each sample was dissolved in 10 µl of 1 × Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) and was processed for Northern blotting as described by Dar-cissac *et al.* (1996). Briefly, RNA samples were fractionated by gel electrophoresis and blotted onto synthetic membrane filters (Hybond N., Amersham, France S.A., Les Ulis, France). The RNA was fixed on the filters using UV crosslinker (Stratagene, Paris, France) and the filters were prehybridized for 4 h at

65°C in buffer consisting of 5 × saline-sodium citrate (1 × saline-sodium citrate is 150 mM NaCl, 15 mM C₆H₅Na₂O₇·2H₂O, pH 7.0), 10 × Denhardt's solution (1 × Denhardt's solution is 0.02% bovine serum albumin, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% Ficoll), 20 mM sodium phosphate, pH7.0, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 100 µg/ml sonicated salmon sperm DNA and 100 µg/ml poly (A). Hybridization was then performed for 16 h at 65°C in prehybridization buffer containing 10% dextran sulfate and a radiolabelled synthetic oligonucleotide probe specific for iNOS, for TNF-α or for β-actin. Sequences of the synthetic oligonucleotide probes specific for each mRNA were the following:

iNOS 5'-CGATGCACAGCTGAGTGAATTCCACGGTGG-3'

TNF-α 5'-GGTGTGGGTGAGGAGCACATGGGTGG-3'

β-Actin 5'-GGCTGGGTGTTGAAGGTCTCAAACATGATCTGG-3'

The synthetic oligonucleotides were labelled at the 3' end with (α^{32} P) deoxyadenosine 5'-triphosphate (Amersham) as previously described (Collins and Hunsaker, 1985). The blots were then washed once in 5% SDS, 3 × SSC, 10 × Denhardt's solution, 20 mM sodium phosphate for 30 min followed by another wash in 1 × SSC, 1% SDS at 65°C. Filters were exposed for up to 14 days at -80°C to Kodak X-OMAT films using intensifying screens. Following hybridization with a probe specific for iNOS mRNA, blots were stripped for 1 h at 70°C in 0.2% SDS and were rehybridized with a probe specific for TNF-α mRNA. Final hybridization was always done with a β-actin probe to control the amount of RNA loaded in the gel.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Wilcoxon matched-pairs test and the Mann-Whitney U rank test. Probability (P) values lower than 0.05 were considered to reflect statistically significant differences.

RESULTS

Regulation of lymphocyte apoptosis by NO

To determine a potential role of NO in modulating the level of spontaneous apoptosis, PBMCs from 18 HIV-infected subjects and 9 healthy controls were cultured in the absence or presence of either the NO inhibitor LNMA or the NO donor SNAP. Following

24 h culture, the percentage of cells undergoing spontaneous apoptosis was evaluated by flow cytometry. Results shown in Table 1 demonstrate that the baseline level of lymphocyte apoptosis quantitated in samples from healthy controls ($10.9 \pm 1.2\%$) was not significantly modified in the presence of either LNMA ($11.1 \pm 1.2\%$) or SNAP ($11.8 \pm 0.8\%$). On the other hand, the percentage of lymphocytes undergoing spontaneous apoptosis in cultures from HIV-infected subjects ($21.1 \pm 1.6\%$) was nearly twice as high as that observed in cultures from healthy controls. This elevated level was also found to be significantly reduced ($18.3 \pm 1.4\%$; $P = 0.0029$) or enhanced ($24.1 \pm 2.1\%$; $P = 0.0278$) in the presence of LNMA or of SNAP respectively. To address the role of NO in the process of AICD, parallel cultures were stimulated with either anti-CD3 antibodies or with PHA and were maintained for 24 h in the absence or presence of LNMA or SNAP. Neither the NO inhibitor nor the donor modified significantly the percentage of lymphocytes undergoing AICD following stimulation with anti-CD3 or with PHA (Table 1). This was effectively the case in PBMC cultures from healthy donors as well as from HIV-infected subjects. Nevertheless, it is relevant to point out that the AICD by anti-CD3 but not by PHA was generally higher in samples from HIV-infected individuals.

The effects of LNMA or SNAP on the levels of spontaneous apoptosis in PBMC cultures from HIV-infected subjects were then analysed in context of stage of infection and as to whether patients were on treatment with anti-retroviral drugs. Results shown in Table 2 clearly indicate that the apoptosis-inhibitory effect of LNMA and the apoptosis-enhancing effect

of SNAP were evident in both asymptomatics and symptomatic patients but only attained statistically significant value in the latter group. On the other hand when the effects of LNMA and of SNAP were analysed between subjects who were and those who were not receiving antiretroviral therapy, no differences could be noted between the 2 groups (Table 2).

Nitrite levels in PBMC cultures

To correlate the regulation of apoptosis levels by the NO inhibitor or donor with an effective blocking or increase in NO, we have analysed the nitrite content of all supernatants after the 24 h culture period. Results presented in Table 3 indicate that the addition of LNMA to PBMC cultures from healthy controls resulted generally in a lower nitrite content but which only attained significant value under the PHA-activated condition. The addition of LNMA to cells from HIV-infected subjects did not result in a modification of the accumulated nitrites since the levels were hardly detectable and significantly lower than those observed in cultures from healthy controls. On the other hand, addition of SNAP to unstimulated or to activated cells resulted in high nitrite levels ($33-40 \mu\text{M}$) which were comparable in supernatants of PBMC cultures from both HIV-infected and healthy subjects (Table 3).

Effect of NO on HIV replication in human MDMs

Macrophages are known to be a major source of NO and therefore, we have attempted to address the issue of whether HIV-infection of MDMs results in increased NO release. Supernatants from non-infected or acutely-infected MDMs with HIV-1 Bal were evalu-

Table 1. Effect of an inhibitor (LNMA) or a donor (SNAP) of NO on the level of apoptosis

| Subjects tested | Compound added to cultures | % Spontaneous apoptosis | % Activation-induced apoptosis by* | |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| | | | anti-CD3 (0.5 $\mu\text{g/ml}$) | PHA (1 $\mu\text{g/ml}$) |
| Healthy controls (n = 9) | RPMI | $10.9 \pm 1.2\ddagger$ | 0.5 ± 0.8 | 6.8 ± 2.1 |
| | LNMA | 11.1 ± 1.2 | -0.9 ± 1.0 | 5.4 ± 1.8 |
| | SNAP | 11.8 ± 0.8 | 0.1 ± 0.5 | 8.1 ± 1.9 |
| HIV-infected (n = 18) | RPMI | $21.1 \pm 1.6\$$ | 3.3 ± 1.3 | 5.9 ± 1.4 |
| | LNMA | $18.3 \pm 1.4\$$ (P = 0.0029)‡ | $5.0 \pm 1.1\$$ | 6.7 ± 1.3 |
| | SNAP | $24.1 \pm 2.1\$$ (P = 0.0278) | $3.7 \pm 1.1\$$ | 6.2 ± 1.0 |

* Levels reflect net activation-induced apoptosis over spontaneous apoptosis.

† Mean \pm standard error of the mean.

‡ Significantly different (P < 0.05) from values of non-treated cultures (Wilcoxon matched-pairs test).

§ Significantly different (P < 0.05) from values of healthy controls (Mann-Whitney U rank test).

Table 2. Modulation of spontaneous apoptosis by NO donor or inhibitor in cultures from subgroups of HIV-infected subjects

| Compound added to PBMC cultures | % Spontaneous lymphocyte apoptosis from HIV-infected subjects | | | |
|---------------------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | Asymptomatics (grade A) n = 7 | Symptomatics (grade B) n = 11 | Not receiving treatment n = 6 | On treatment n = 12 |
| RPMI | 19.6 ± 1.3* | 21.9 ± 2.7 | 20.1 ± 1.7 | 21.6 ± 2.2 |
| LNMA | 17.4 ± 3.7 | 18.6 ± 2.4† | 17.4 ± 1.5† | 18.8 ± 2.0† |
| SNAP | 20.7 ± 2.4 | 25.8 ± 3.3† | 23.6 ± 3.7 | 24.3 ± 2.7 |

* Mean ± standard error of the mean.

† Significantly different ($P < 0.05$) from values of non-treated cultures (Wilcoxon matched-pairs test).

Table 3. Nitrite content in supernatants of PBMC cultures

| Subjects tested | Compound added to cultures | Nitrite levels (μM) in 24 h cultures stimulated with | | |
|--------------------------|----------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| | | — | anti-CD3 (0.5 μg/ml) | PHA (1 μg/ml) |
| Healthy controls (n = 9) | RPMI | 5.7 ± 0.8 (9)*† | 3.2 ± 0.8 (7) | 2.8 ± 0.7 (6) |
| | LNMA | 3.6 ± 1.2 (6) | 2.3 ± 0.8 (6) | 0.5 ± 0.4 (2) |
| | SNAP | 40.8 ± 7.8 (9) (P = 0.0077)‡ | 39.4 ± 7.7 (9) (P = 0.0077) | 37 ± 8.8 (9) (P = 0.0117) |
| HIV-infected (n = 18) | RPMI | 1.9 ± 0.6 (8)§ | 2.4 ± 0.8 (9) | 1.9 ± 0.6 (8) |
| | LNMA | 2.5 ± 0.9 (9) | 2.1 ± 1.3 (6) | 2.5 ± 1.1 (7) |
| | SNAP | 33.5 ± 5.6 (18) (P = 0.0002) | 37.3 ± 6.7 (18) (P = 0.0002) | 34.2 ± 5.4 (18) (P = 0.0002) |

* Mean ± standard error of the mean.

† Number in parentheses reflect the number of subject with detectable nitrite levels.

‡ Significantly different ($P < 0.05$) from values of non-treated cultures (Wilcoxon matched-pairs test).§ Significantly different ($P < 0.05$) from values of healthy controls (Mann-Whitney U rank test).

ated for nitrite content 1–14 days post-culture or post-infection. No detectable nitrite was observed in any of the cultures at any time point tested in 5 separate experiments (data not shown), although viral replication in infected cultures was documented by the presence of P24 antigen in the supernatants. These results however, do not exclude a possible role of NO in regulating the level of HIV replication. Thus, other experiments were performed in which infected cultures were maintained in the presence of LNMA during the whole culture period, or of SNAP 4 h prior to and during the 24 h of infection. Infected cultures in the presence of SNAP contained high nitrite content (20–120 μM) during the first 24 h period whereas cultures maintained in the absence or presence of LNMA did not exhibit any detectable nitrite at any time point

tested. Viral replication was evaluated in all cultures at different time points and results of the P24 levels on day 11 post infection from 4 different experiments are shown in Fig. 1. No significant difference in P24 content could be noted between supernatants harvested from cultures maintained in medium alone as compared with those harvested from cultures kept in the continuous presence of LNMA (Fig. 1A). Similarly, cultures treated with SNAP, before and during the infection, contained comparable P24 antigen to those found in non-treated cultures (Fig. 1B). These results further confirm our findings that NO is not released by MDM upon HIV-1 infection and clearly indicate that the presence of NO during the first day of infection does not significantly modify viral replication.

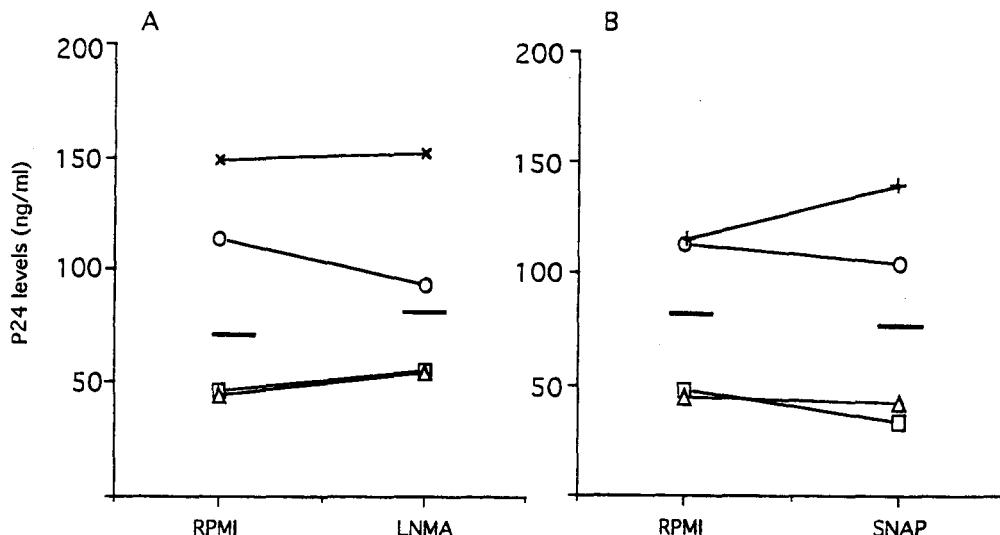


Fig. 1. Effects of the absence or presence of NO on the level of HIV replication. Human MDMs from different donors were infected for 24 h with HIV-1BaI and the level of viral replication, as measured by P24 release, was assessed on day 11 post infection. (A) P24 levels in supernatants of MDMs infected and maintained in the absence (RPMI) or presence of the NO inhibitor LNMA. (B) P24 levels in supernatants of MDMs treated 4 h prior to and during the 24 h infection period with either medium (RPMI) or with the NO donor SNAP. Each symbol represents results from one separate donor and bars reflect the means of 4 different experiments.

Level of iNOS mRNA accumulation in HIV-infected MDM

The sensitivity of detection of nitrites by the used methodology is limited to a level of 2 μ M. This prompted us to examine whether HIV-1 infection of macrophages results in detectable mRNA accumulation of iNOS. Thus, total RNA was extracted from infected MDMs at various time points after infection (2 h-12 days) and the mRNA accumulation of iNOS and TNF- α was measured and compared with that of a house keeping gene β -actin as described under materials and methods. Results shown in Fig. 2 demonstrate a total absence of detectable mRNA accumulation of iNOS in infected macrophages. In contrast, TNF- α mRNA accumulation was detectable at 2 h and 4 h post-infection. In additional experiments, a similar lack of iNOS gene induction was noted either in non-infected or in infected MDMs even following stimulation with 10 μ g/ml LPS and 100 units/ml IFN- γ (data not shown). Therefore, to ensure that the used approach is capable of measuring iNOS mRNA accumulation, we stimulated uninfected MDMs with a cocktail of cytokines and immunomodulators consisting of GM-CSF (1000 units/ml), TNF- α (200 units/ml), IFN- γ (500 units/ml), LPS (10 μ g/ml) and MDP (5 μ g/ml). RNA was extracted from MDMs before (0 h) and at 2 h, 6 h and 24 h after stimulation.

Hybridization with the iNOS specific probe revealed detectable mRNA accumulation only 2 h post-stimulation (Fig. 3) and which was of small magnitude as compared with that of TNF- α . These results further confirm the need for an extremely potent and non-physiological stimulus to induce iNOS mRNA accumulation in human MDMs.

DISCUSSION

Nitrites and nitrates, the final end products of NO were recently found to be elevated in sera from HIV-infected patients (de Bracco, 1997). This elevation also appeared to become more prominent as the patients progressed to full blown AIDS (Baldeweg *et al.*, 1996; Torre *et al.*, 1995; Zangerle *et al.*, 1995). On the other hand, NO and derivatives have been reported to play a role in neuronal cell death (Lipton *et al.*, 1993) and to modulate HIV replication in cell lines of myeloid origin (Ouaaz *et al.*, 1996). In addition, certain correlations have been made during HIV-infection between levels of serum nitrites and lymphocyte apoptosis which were both found to increase as disease progresses (Zangerle *et al.*, 1995; Pandolfi *et al.*, 1995; Sarih *et al.*, 1996; Gougeon *et al.*, 1996). However, these results are contradictory to those reported by

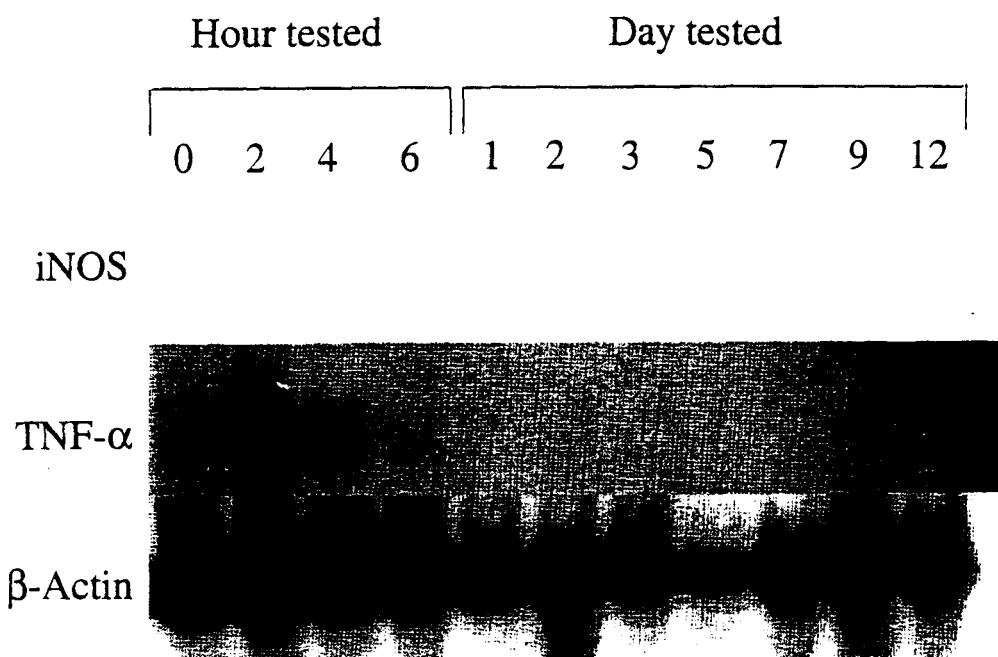


Fig. 2. Northern blot analysis of the induction of iNOS or TNF- α mRNA accumulation in HIV-1 infected MDMs. Analysis was done using total RNA extracted from 5×10^6 cells before infection (0 h), 2 h, 4 h and 6 h as well as 1, 2, 3, 5, 7, 9 and 12 days after infection. Hybridization with synthetic ^{32}P -labelled oligonucleotide probe for iNOS or for TNF- α and washings were performed under stringent conditions. Filters were stripped and rehybridized to an oligonucleotide of β -actin to control for amounts of RNA loaded in gel.

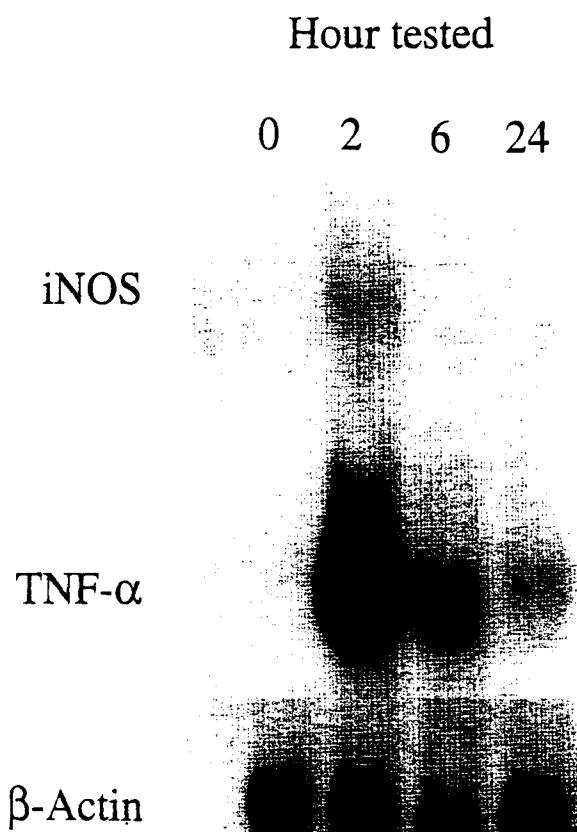


Fig. 3. Northern blot analysis of the induction of iNOS or TNF- α mRNA accumulation in normal MDMs. Analysis was done using RNA extracted from 5×10^6 cells before (0 h) and 2 h, 6 h or 24 h after stimulation with a cocktail of cytokines (GM-CSF, TNF- α and IFN- γ) and immunomodulators (LPS and MDP). Hybridization with synthetic 32 P-labelled oligonucleotide probe for iNOS or for TNF- α and washings were performed under stringent conditions. Filters were stripped and rehybridized to an oligonucleotide of β -actin to control for amounts of RNA loaded in gel.

Meyaard *et al.* (1994) who showed no correlation between increased apoptosis and disease progression, as well as, to the recent findings of de Braco *et al.* (1997) of diminished NO production in hemophiliac patients with AIDS. Our results showed a decreased spontaneous NO release in PBMC cultures from HIV infected subjects as compared to those from healthy controls however, the level of spontaneous lymphocyte apoptosis was significantly elevated in the former group. This evidently argues against a direct link between NO release and PCD in HIV infection. Moreover, we could not find a direct cause-effect relationship between high levels of NO, when supplied by the NO donor SNAP, and AICD in cultures from either healthy controls or HIV-infected subjects. The strong increase of nitrites observed in cell cultures in the presence of SNAP was only associated with a slight increase of spontaneous cell death nevertheless, the decrease in PCD levels in the presence of the inhibitor LNMA, could not be correlated with a corresponding decrease in nitrite concentration in cell cultures. Taken together, our results do not support a role for NO in T-cell depletion during HIV infection. They would also be in agreement with previous studies in Man which demonstrated a lack of apoptosis-inducing effects of NO on B-cells (Mannick *et al.*, 1994) and on endothelial cells (Dimmeler *et al.*, 1997).

HIV-1 proteins including gp120 and gp41 have been reported to induce NO synthesis in macrophages and neurones (Pietraforte *et al.*, 1994; Adamson *et al.*, 1996; Dawson and Dawson, 1994). In addition, elevated nitrites have been detected in the brain of an HIV infected child and suggestions were made to implicate NO release in HIV replication (Bukrinsky *et al.*, 1995; Ouaaz *et al.*, 1996). Our results using primary MDMs did not demonstrate any detectable NO release following infection with a macrophage-tropic HIV-1 strain. This was the case early after infection (2–24 h) as well as at later periods (up to 12 days) when viral replication was at its peak. Furthermore, a continuous blocking of NO synthesis using the inhibitor LNMA had no significant effect on the outcome of HIV replication in MDMs over a 14 days culture period. Similarly, when infection of MDMs was performed in the presence of elevated NO concentration during the 24 h infection period, no effect could be noted on the subsequent level of viral replication (Fig. 1). These results would therefore strongly argue against a direct correlation, on one hand, between HIV infection and NO release and on the other hand, between NO levels and viral replication in human macrophages. Similar findings have been already reported by Bukrinsky *et al.* (1996) who found that the presence of the NO inhibitor LNMA did not modify the outcome of HIV

replication at the peak of reverse transcriptase activity.

Elevated nitrite levels reported by some investigators (Zangerle *et al.*, 1995; Baldeweg *et al.*, 1996) in sera of AIDS patients may be explained by a strong activity of iNOS isoform in macrophages. Monocytes-macrophages are also thought to be a reservoir for HIV and activation of these cells leads to viral replication through a NF κ B-dependent mechanism. Interestingly, the iNOS promoter has been recently found to possess a NF κ B motif (Lowenstein *et al.*, 1993). Thus, to further address a potential link between HIV replication and NO synthesis, we used a more sensitive assay than the Griess reaction to examine the role of HIV replication in the modulation of iNOS mRNA accumulation. As clearly demonstrated in Fig. 2, no detectable mRNA accumulation of iNOS could be found in MDMs up to 12 days after infection. This was not due to a lack of sensitivity of detection since under the same experimental conditions, macrophage activation with a cocktail of cytokines and immunomodulators lead to a measurable iNOS mRNA accumulation (Fig. 3). These results further support our initial findings and clearly establish a lack of direct regulation by HIV replication on NO synthesis in human MDMs. Although our findings appear to be contradictory to those reported by Bukrinsky *et al.* (1996), such a discrepancy may well be attributed to a difference in the culture conditions employed. It is worthwhile to point out that in Bukrinsky's work macrophages were generated under activation conditions due to the continuous presence of macrophage-colony stimulating factor. These conditions might effectively prime macrophages to produce NO upon a second activation signal such as infection with HIV.

Finally, the data presented in this study could not support a role for elevated NO synthesis in either enhanced lymphocyte apoptosis form HIV infected subjects or in the regulation of viral replication in acutely-infected MDMs. Future studies would need to be performed using *in vivo* models such as simian immunodeficiency virus infection in macaques or HIV-infection in humanised-SCID mice. These models could clarify a potential role of NO in the immunopathogenesis of HIV-infection.

Acknowledgements—This work was supported by research grants from the Agence Nationale de Recherche sur le SIDA and the Fondation pour la Recherche Médicale in France. The technical assistance of Joelle Dewulf and Marc Loyens is deeply acknowledged.

REFERENCES

- Adamson, D. C., Wildemann, B., Sasaki, M., Glass, J. D., McArthur, J. C., Christov, V. I., Dawson, T. M. and Dawson, V. L. (1996) Immunologic NO synthase elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science* **274**, 1917–1926.
- Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B. and Reichner, J. S. (1993) Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **150**, 5080–5085.
- Assreuy, J., Cunha, F. Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C. A., Liew, F. Y. and Moncada, S. (1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* **24**, 672–676.
- Aukrust, P., Svardal, A. M., Müller, F., Lunden, B., Nordoy, I. and Froland, S. S. (1996) Markedly disturbed glutathione redox status in CD45RA⁺CD4⁺ lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with selective depletion of this lymphocyte subset. *Blood* **88**, 2626–2633.
- Baldeweg, T., Sooranna, S., Das, I., Catalan, J. and Gazzard, B. (1996) Serum nitrite concentration suggest a role for nitric oxide in AIDS. *AIDS* **10**, 451–452.
- Bukrinsky, M., Schmidtmayerova, H., Zybarth, G., Dubrovsky, L., Sherry, B. and Enikolopov, G. (1996) A critical role of nitric oxide in human immunodeficiency virus type 1-induced hyperresponsiveness of cultured monocytes. *Mol. Med.* **2**, 460–468.
- Bukrinsky, M. I., Nottet, H. S. L. M., Schmidtmayerova, H., Dubrovsky, L., Flanagan, C. R., Mullins, M. E., Lipton, S. A. and Gendelman, H. E. (1995) Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. *J. Exp. Med.* **181**, 735–745.
- Collins, M. and Hunsaker, R. W. (1985) Improved hybridization assays employing tailed oligonucleotide probes and nick-translated plasmid probes. *Anal. Biochem.* **150**, 218–224.
- Darcissac, E. C. A., Bahr, G. M., Pouillart, P. R., Riveau, G. J. and Parant, M. A. (1996) Selective potentiation of cytokine expression in human whole blood by murabutide, a muramyl dipeptide analogue. *Cytokine* **8**, 658–666.
- Dawson, T. and Dawson, V. (1994) gp120 neurotoxicity in primary cortical cultures. *Adv. Neuroimmunol.* **4**, 167–173.
- de Braco, M. M. E., Felippo, M., Vernava, D., Perez-Bianco, R. and de Tezanos Pinto, M. (1997) Nitric oxide production and disease evolution in HIV-infected hemophilic patients. *AIDS* **11**, 822–824.
- Denis, M. (1991) Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J. Leukocyte Biol.* **49**, 380–387.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. and Zeiher, A. M. (1997) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukine-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.* **85**, 601–607.
- Estaquier, J., Idziorek, T., De Bels, F., Barré-Sinoussi, F., Hurtrel, B., Aubertin, A., Venet, A., Mehtali, M., Muchmore, E., Michel, P., Mouton, Y., Girard, M. and Ameisen, J. C. (1994) Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9431–9435.
- Fensel, K., Kröncke, K., Meyer, K. L., Huber, H., Wahn, V. and Kolb-Bachofen, V. (1995) Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.* **155**, 2858–2865.
- Gougeon, M.-L., Lecoeur, H., Dulouast, A., Enouf, M.-G., Crouvoisier, M., Goujard, C., Debord, T. and Montagnier, L. (1996) Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons. Increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T-cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol.* **156**, 3509–3520.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, P. L., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluid. *Anal. Biochem.* **126**, 131–138.
- Groeneveld, P. H., Kroon, F. P., Nibbering, P. H., Bruisten, S. M., Swieten, P. V. and Furth, R. V. (1996) Increased production of nitric oxide correlates with viral load and activation of mononuclear phagocytes in HIV-infected patients. *Scand. J. Infect. Dis.* **28**, 341–345.
- Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F. and Ameisen, J.-C. (1995) YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of apoptosis without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* **185**, 249–258.
- Jenkins, D. C., Charles, I. G., Thomsen, L. L., Moss, D. W., Holmes, L. S., Baylis, S. A., Rhodes, P., Westmore, K., Emson, P. C. and Moncada, S. (1995) Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4392–4396.
- Lipton, S. A., Choi, Y., Pan, Z., Lel, S. Z., Chen, H. V., Sucher, N. J., Loscalzo, J., Singel, D. J. and Stamler, J. S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**, 626–632.
- Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S. H., Russel, S. W. and Murphy, W. J., (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9730–9734.
- Mannick, J. B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E. and Stamler, J. S. (1994) Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* **79**, 1137–1146.
- Meyaard, L., Otto, S. A., Keet, I. P., Roos, M. T. and Miedema, F. (1994) Programmed death of T-cells in human immunodeficiency virus infection. No correlation with progression to disease. *J. Clin. Invest.* **93**, 982–988.
- Munoz-Fernandez, M. A., Fernandez, M. A. and Fresno, M. (1992) Activation of human macrophages for the killing of

- intracellular Trypanosoma cruzi by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol. Lett.* **33**, 35–40.
- Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051–3064.
- Ouaaz, F., Ruscetti, W., Dugas, B., Mikovits, J., Agut, H., Debré, P. and Mossalayi, M. D. (1996) Role of IgE immune complexes in the regulation of HIV-1 replication and increased cell death of infected U1 monocytes: involvement of CD23/Fc ϵ RII-mediated nitric oxide and cyclic AMP pathways. *Mol. Med.* **2**, 38–49.
- Oyaizu, N., McCloskey, T. W., Coronesi, M., Chirmule, N., Kalyanaraman, V. S. and Pahwa, S. (1993) Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from normal individuals. *Blood* **82**, 3392–3400.
- Pandolfi, F., Pierdominici, M., Oliva, A., D'Offizi, G., Mezzaroma, I., Mollicone, B., Giovannetti, A., Rainaldi, L., Quinti, I., and Aiuti, F. (1995) Apoptosis-related mortality *in vitro* of mononuclear cells from patients with HIV infection correlates with disease severity and progression. *J. Acquir Immune Syndr. Hum. Retrovir.* **9**, 450–458.
- Pietraforte, D., Tritarelli, E., Testa, U. and Minetti, M. (1994) gp120 HIV envelope macrophages. *J. Leukocyte Biol.* **55**, 175–182.
- Sarih, M., Maataoui, W. and Benslimane, A. (1996) Analysis of apoptosis and a Th1/Th2 phenotype in HIV-infected patients. *Immunol. Lett.* **50**, 125–129.
- Sarih, M., Souvannavong, V. and Adam, A. (1993) Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 503–508.
- Schneeman, M., Schoedon, G., Hofer, S., Blau, N., Guerrero, L. and Schaffner, A. (1993) Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J. Infect. Dis.* **167**, 1358–1363.
- Torre, D., Ferrario, G., Bonetta, G., Speranza, F. and Zeroli, C. (1995) Production of nitric oxide from peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear leukocytes of patients with HIV-1. *AIDS* **9**, 979–980.
- Weinberg, J. B., Misukonis, M. A., Shami, P. J., Mason, S. N., Sauls, D. L., Dittman, W. A., Wood, E. R., Smith, G. K., McDonald, B., Bachus, K. E., Haney, A. F. and Granger, D. L. (1995) Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* **86**, 1184–1195.
- Westendorp, M., Franck, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.-M. and Krammer P. H. (1995) Sensitization of T-cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**, 497–500.
- Zangerle, R., Fuchs, D., Reibnegger, G., Werner-Felmayer, G., Gallati, H., Wachter, H. and Werner, E. R. (1995) Serum nitrite plus nitrate in infection with human immunodeficiency virus type-1. *Immunobiology* **193**, 59–70.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail a comporté deux parties distinctes. L'une est consacrée à l'étude de l'IL-16, et l'autre à celle du monoxyde d'azote. En ce qui concerne l'IL-16, que nous avons clonée et produite au laboratoire, notre but était de vérifier son activité antivirale dans les lymphocytes T et de le démontrer pour les cellules présentatrices de l'antigène qui expriment la molécule CD4. Parce qu'elle lie la molécule CD4, nous avons étudié 1) ses effets sur les macrophages et les cellules dendritiques et 2) son rôle dans les phénomènes de mort cellulaire des lymphocytes T de sujets infectés par le VIH.

La seconde partie concerne le monoxyde d'azote, dont l'effet sur la physiopathologie de l'infection par le VIH est encore mal connue. Notre but était de savoir si le monoxyde d'azote pouvait avoir un rôle ou non dans l'augmentation de la mort cellulaire spontanée ou celle induite par l'activation des lymphocytes T de sujets infectés par le VIH. Nous désirions aussi évaluer sa capacité à moduler la multiplication virale. Par ailleurs, il était également intéressant de vérifier si l'infection, *per se*, de macrophages, pouvait expliquer l'augmentation de nitrites, un métabolite du NO°, observée dans le sérum de patients.

1) Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote est une importante molécule du système immunitaire. Il possède des activités microbicides, antivirales et anti-tumorales (Zidek et Masek, 1998) mais peut avoir, dans certains cas, des activités cytotoxiques envers les cellules avoisinantes. L'existence de nitrites dans le sérum de patients au stade SIDA (Baldewerg *et al.*, 1996), nous a amené à étudier le rôle, peu clarifié, du monoxyde d'azote dans la pathogénèse du SIDA. Dans nos conditions, nos résultats n'ont pas mis en évidence de rôle majeur du NO°, que ce soit au niveau de la

régulation de la mort cellulaire programmée des lymphocytes T, ou de la multiplication virale dans les macrophages. De plus, nous détectons plus de nitrites dans le surnageant de PBMC de sujets sains que celui des PBMC de sujets infectés par le VIH. Ce résultat pourrait suggérer soit un défaut des lymphocytes ou des monocytes des patients pour la synthèse de NO°, soit un rôle de l'état d'activation des cellules dans leur capacité à produire du NO°, soit une consommation plus importante du NO° par les cellules infectées.

Nous confirmons les résultats de Bukrinsky *et al.* (1996) qui n'ont pas observé de modifications de la multiplication virale en présence de L-NMA, un inhibiteur de la NO-synthase. Ouazz *et al.* (1996) ont suggéré un rôle du NO° dans l'augmentation de la multiplication virale, mais les auteurs ont travaillé sur une lignée myeloïde chroniquement infectée et donc éloignée des modèles de macrophages humains. De plus, les auteurs attribuent la plupart des effets aux peroxynitrites puisque l'augmentation de la multiplication virale est observée lorsque les cellules sont incubées avec le donneur chimique SIN-1 qui libère du NO° et des peroxynitrites. Leurs expériences montrent que l'incubation avec SNAP ne modifie pas l'activité du VIH, ce que nous confirmons. Notre modèle d'étude ne montre pas d'effets direct de l'infection par le VIH, ni sur la production de nitrites, ni sur l'expression de la NO-synthase inducible dans les macrophages. Ces résultats sont contraires à ceux de Bukrinsky *et al.* (1995) qui ont travaillé sur des macrophages différenciés à partir des monocytes en présence de M-CSF. Les macrophages ainsi pré-activés pourraient être plus susceptibles à produire du NO° suite à l'infection. Bien qu'ils soient négatifs, ces résultats semblent plutôt valider le fait que les macrophages humains produisent peu de monoxyde d'azote.

Cependant, Blond *et al.* (1998), dans un modèle macaque, ont de nouveau suggéré l'importance de NO° lors de l'infection par le

SIVmac251. Ils ont en effet détecté une expression de NOS-i augmentée dans les cellules mononucléées provenant de lavages bronchoalvéolaire, et une détection accrue de nitrates dans le sérum des macaques infectés. Une autre étude, dans un modèle de souris SCID infectée par VIH-1, a également montré une augmentation de l'activité de NOS-i dans la cavité péritonéale (Del Real *et al.*, 1998). Mais ces deux publications ont simplement décrit une corrélation entre le niveau de la charge virale et la présence de NO° (Blond *et al.*, 1998), la présence concomitante d'IFN- γ et du NO° dans les tissus (Blond *et al.*, 1998; Del Real *et al.*, 1998), sans pour autant déterminer l'origine cellulaire de la synthèse de NO°. Ils n'apportent donc pas d'explications quant au rôle potentiellement néfaste du NO° lors de la maladie, ni de l'origine cellulaire du NO°. Il a récemment été décrit que l'infection de souris SCID humanisées pouvait entraîner des problèmes neurologiques important chez ces souris (Gendelman, 1997). Les protéines gp120 et gp41 du VIH sont connues pour augmenter la synthèse du NO° au niveau des cellules du cerveau et d'être ainsi à l'origine des dysfonctions neuronales observées chez certains patients (Adamson *et al.*, 1996). Il n'est donc pas impossible que les nitrites détectés dans le sérum des patients, chez le macaque et la souris SCID, aient pour origine des cellules autres que celles du système immunitaire.

Malgré les résultats de notre étude, nous ne pouvons pas ne pas tenir compte d'éventuelles effets délétères du NO° à long terme. Notre étude n'est donc qu'une étape, qui demande confirmation dans un modèle physiologique plus approprié. L'utilisation d'inhibiteur de NOS-i ou de molécules chimiques donneuses de NO° chez la souris SCID, reconstituée par des cellules mononucléées humaines et infectées par VIH-1, pourrait apporter une meilleure compréhension de l'influence du monoxyde d'azote sur l'apoptose des cellules T et sur la charge virale.

2) L'IL-16

L'IL-16 a été caractérisée comme une molécule chimioattractante pour les lymphocytes T CD4+ (Center *et al.*, 1996). Sa présence au niveau des sites inflammatoires, *in vivo*, rend ce rôle pertinent (Cruikshank *et al.*, 1995). Mais l'IL-16 s'est essentiellement révélée au monde de la recherche sur le sida comme l'un des facteurs produit par les cellules T CD8+, possédant une activité anti-VIH sur les lymphocytes T et les macrophages (Barker *et al.*, 1998, Mackewicz *et al.*, 1995; Baier *et al.*, 1995).

Nos résultats montrent plusieurs points importants:

- a) L'IL-16 possède une activité immune sur les macrophages et les cellules dendritiques.
- b) L'IL-16 inhibe la multiplication virale, d'un virus à tropisme macrophagique, dans les macrophages et les cellules dendritiques.
- c) L'IL-16 inhibe la multiplication virale de virus à tropisme M et T dans les cellules T, et inhibe l'apoptose des cellules T de patients.

L'IL-16 augmente la sécrétion de MIP-1 α et MIP-1 β par les macrophages, mais diminue l'expression de l'ARNm de CCR5. La diminution de CCR5 pourrait être une résultante de la synthèse des chimiokines suite à l'activation par l'IL-16 et leur consommation par les cellules (Aramori *et al.*, 1997). Mais nous observons une modulation transcriptionnelle précoce et stable jusqu'à 24 heures dans les macrophages. Il est donc peu probable, bien que non démontré, que MIP-1 α et MIP-1 β soient à l'origine des modifications observées. Il nous reste cependant à démontrer que la modulation transcriptionnelle de CCR5 se traduit par une modulation de la protéine à la surface des cellules.

Sica *et al.* (1997) ont également observé une légère diminution de CCR5 suite à l'activation des monocytes par le LPS. Des conditions proinflammatoires auraient donc tendance à diminuer l'expression de CCR5 à la surface des macrophages. Les conséquences physiologiques de la diminution de CCR5 sont à déterminer, mais elle pourrait impliquer un échappement des cellules à l'action des β -chimiokines, présentes dans les sites inflammatoires. Par ailleurs, MIP-1 α est un chimioattractant pour les cellules T CD4+ et CD8+. Il apparaît ainsi que l'IL-16, lors d'une inflammation, participerait non seulement au recrutement des cellules T CD4+ et des monocytes, mais également favoriserait l'attraction des lymphocytes T CD8+ via la production de MIP-1 α par les macrophages.

L'activité de l'IL-16 sur les cellules dendritiques semble restreinte au processus de leur maturation puisque seules les expressions de CD83 et CD25 sont augmentées. La diminution de CCR5 est limitée et transitoire. Cependant, la diminution de CCR5 a été associée au processus de maturation des cellules dendritiques (Delgado *et al.*, 1998). Comme il a été suggéré que les cellules dendritiques matures pouvaient être réfractaires à l'action d'agents immunomodulateurs, telles que l'IL-10 et la prostaglandine E2 (Kaliszki *et al.*, 1998), il serait intéressant de définir les effets de l'IL-16 sur des cellules dendritiques immatures. En particulier, l'IL-16 est-elle capable d'induire une maturation initiale des cellules dendritiques? Quel serait alors son rôle respectif en relation avec les autres signaux de l'environnement? Est-elle capable, par la modulation des récepteurs des chimiokines, d'altérer le comportement et la migration des cellules dendritiques? Dans ce cas, la modulation de CCR5 pourrait permettre l'échappement des cellules dendritiques à l'action de MIP-1 α , MIP-1 β , et RANTES, et ainsi leur migration vers les ganglions lymphatiques

(Sozzani *et al.*, 1998). A cette fin, l'étude de l'activité de l'IL-16 sur l'expression de CCR7 apporterait des éclaircissements. L'expression de ce récepteur des chimiokines est en effet augmentée lors de la maturation des cellules dendritiques, et régule le trafic cellulaire en direction des zones T des ganglions lymphatiques, via la chimiokine SLC ("secondary lymphoid-tissue chemokine") (Saeki *et al.*, 1999).

La compréhension de la modulation de CXCR4 par l'IL-16 semble plus complexe. Il a été montré que lors de la maturation des cellules dendritiques, l'expression de CXCR4 est augmentée (Lin *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 1998). Notre travail montre une diminution faible et transitoire de CXCR4 dans les macrophages et les cellules dendritiques, qui contredit, pour ces dernières, les observations précédentes. Ceci peut être expliqué par le fait que nous avons travaillé sur des cellules dendritiques matures contrairement à Lin et Delgado qui ont étudiés la maturation de cellules dendritiques immatures. Il a été décrit que l'IL-12 diminue l'expression de CXCR4 dans les lymphocytes (Galli *et al.*, 1998). L'absence de détection d'IL-12 dans le surnageant de culture des cellules stimulées par l'IL-16 ne permet pas d'expliquer la modulation de CXCR4 par une action de l'IL-12. Il est également peu probable, que l'IFN- γ capable de diminuer l'expression de CXCR4 dans les cellules endothéliales (Gupta *et al.*, 1998), soit à l'origine des effets observés. Mais Gupta a montré que la modulation de CXCR4 par des facteurs pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL1- β ou le LPS est complexe. Comme lors de nos expériences avec l'IL-16, il observe une diminution précoce et transitoire de l'ARNm de CXCR4. Le mode de régulation de CXCR4 par ces facteurs inflammatoires n'est pas établi.

Nous démontrons également que l'IL-16 diminue l'expression de la molécule CD4 à la surface des macrophages. Il a déjà été observé,

dans d'autres systèmes d'étude, une modulation de la molécule CD4 à la surface des macrophages. En particulier, le LPS et la gp120 diminuent l'expression de CD4 via la synthèse de cytokines proinflammatoires endogènes comme le TNF- α (Herbein *et al.*, 1995; Karsten *et al.*, 1996). Néanmoins, dans nos conditions de culture, il est peu probable que la quantité de TNF- α produite par les macrophages, stimulés par l'IL-16, soit à l'origine de la diminution de l'expression de CD4. Cependant, la gp120 est capable de diminuer l'expression de surface de CD4, par un mécanisme d'internalisation des complexes gp120/CD4 dans des lignées T (Cefai *et al.*, 1992). Ce mécanisme doit être plus complexe dans nos conditions de culture, car nous observons une diminution stable des transcrits de CD4. Il reste donc à élucider ce mécanisme, mais nos résultats soulèvent le problème intéressant du rôle de la liaison CD4/IL-16 sur la transduction du signal dans des types cellulaires différents exprimant la molécule CD4.

Finalement, il apparaît que les signaux induit par la ligation de CD4 sont importants dans la régulation des récepteurs des chimiokines. En effet, la gp120 du VIH et des anticorps anti-CD4 sont capables de diminuer l'expression des récepteurs des chimiokines C5a et FMLP (Wahl *et al.*, 1989, Wang *et al.*, 1998) ou de diminuer l'expression de CXCR4 (Wang *et al.*, 1998). Notre étude confirme l'importance de la ligation de CD4 dans la régulation des récepteurs des chimiokines. Sachant que la gp120 augmente notablement la synthèse de cytokines dans les macrophages (Merrill *et al.*, 1989; Taoufik *et al.*, 1997), contrairement à l'IL-16, il est probable que le mécanisme d'action de l'IL-16 soit différent et rejoigne le problème soulevé dans le paragraphe précédent.

L'expression de CD80 est augmentée par l'IL-16 dans les macrophages. Par contre, l'expression de CD86 est faiblement diminuée.

Nous ne connaissons pas encore les conséquences de la modulation des molécules costimulatrices sur les cellules présentatrices de l'antigène. Des expériences de cocultures, mettant en présence des macrophages et des lymphocytes T, seront nécessaires pour déterminer la part de l'augmentation de CD80 et de la diminution de CD86, suite à la stimulation par l'IL-16, dans l'induction de la réponse immunitaire. En particulier, il a été suggéré que CD80 et CD86 pouvaient être impliquées dans la différenciation, respectivement des cellules Th1 et Th2 (Kuchroo *et al.*, 1995). Néanmoins, Parada *et al.* (1998) n'ont pas détecté de profil type Th1 ou Th2 sur des lymphocytes T stimulés par l'IL-16 pendant 15 jours. De plus, dans notre étude, l'IL-16 n'induit pas de sécrétion d'IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques. Bien que d'autres travaux soient encore nécessaires pour affiner l'action de l'IL-16, compte tenu notre étude et de celle de Parada, il ne semble pas que les propriétés de la chimiokine soient représentées par le profil de cytokines induit.

Notre travail a montré que l'IL-16 inhibe, dans les cellules T issus de patients, la mort induite par les anticorps anti-CD3, la dexaméthasone et les anticorps anti-Fas. Les résultats obtenus dans les cellules T issus de sujets sains sont différents et indique une inhibition de l'apoptose uniquement lorsque les cellules sont stimulées par la dexaméthasone et le PHA. De façon étonnante, nous observons que l'IL-16 augmente l'apoptose spontanée des cellules T de sujets sains, mais n'a pas d'effet significatif sur l'apoptose spontanée des lymphocytes T des patients.

L'IL-16 favorise le passage de la phase G0 du cycle cellulaire à la phase G1, dans laquelle les cellules T sont bloquées (Center *et al.*, 1996). Le blocage en G1 pourrait protéger les cellules de la mort induite par l'activation (Boehme et Lenardo, 1993), et expliquerait nos

résultats qui suggèrent que l'action de l'IL-16, sur l'apoptose des cellules T, dépend de leur état d'activation. Mais il a aussi été montré que l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire pouvait sensibiliser les cellules à la mort induite par l'activation (Lissy et al., 1998). L'implication du blocage du cycle cellulaire par l'IL-16 dans son activité inhibitrice sur la mort induite par l'activation n'est donc pas évident. Par ailleurs, nous observons une augmentation d'apoptose spontanée dans les cellules T de sujets sains. Ce résultat est surprenant et suggère la nécessité de signaux supplémentaires, via le récepteur T pour l'antigène, puisque que Cruikshank (1996) a montré que l'IL-16 est capable d'inhiber la mort cellulaire induite par des anticorps anti-CD3. Il est cependant possible que l'action d'anticorps anti-CD3 et celle de l'IL-16 soit mutuellement exclusive. Par exemple, la sensibilité d'hybridomes T à l'apoptose induite par des anticorps anti-CD3 ou par les glucocorticoïdes, n'est pas observée lorsque les deux molécules sont incubées ensemble (Zacharchuk et al., 1990; Iseki et al., 1991). Dans ce cas, les deux processus d'induction d'apoptose sont mutuellement antagonistes (Zacharchuk et al., 1990; Iseki et al., 1991). La présence d'autres cytokines pourrait aussi protéger les cellules de l'apoptose. En effet, Labege et al. (1998) ont démontré que l'addition d'IL-2 en alternance avec l'IL-16 favorise la croissance des cellules T. Finalement, l'état d'activation chronique des cellules T issus de patients pourrait expliquer l'absence d'effet de l'IL-16 sur l'apoptose spontanée.

L'IL-16 agit comme une molécule suppressive de l'activation cellulaire T, ce qui pourrait expliquer l'inhibition de l'augmentation de l'expression de CD25 et de Fas suite à l'activation par les anticorps anti-CD3 (Cruikshank et al., 1996), et ainsi protéger les cellules de la mort cellulaire programmée. Nos résultats qui démontrent une

diminution de l'expression de Fas lorsque les cellules de patients sont stimulées par la dexaméthasone et les anticorps anti-CD3 rejoignent donc ceux de Cruikshank. Mais, contrairement à Cruikshank, nous ne détectons pas de modulation de l'apoptose sur les cellules T issus de sujets sains et activés par les anticorps anti-CD3. Cette contradiction est probablement due au protocole d'activation. En effet, dans nos expériences, l'IL-16 a été incubée en même temps que le stimulateur, alors que Cruikshank a observé une diminution de l'apoptose lorsque l'IL-16 est préincubée 1 heure avant l'activation. Le fait que Cruishank n'observe pas d'effet de l'IL-16 lorsqu'il est incubé en même temps que les anticorps anti-CD3 confirme cet aspect.

Inversement, le même raisonnement est valable pour les cellules T issus de sujets sains et activées par la PHA. En effet, Cruikshank décrit l'absence d'effet de l'IL-16 sur les cellules T activées par la PHA (Cruikshank *et al.*, 1996). Dans notre travail, nous observons que l'IL-16 induit une légère diminution de la mort des cellules T de sujets sains suite à l'activation par la PHA. Par contre, l'IL-16 n'a aucun effet sur les cellules T de patients activées par la PHA, et n'induit pas la diminution de Fas. L'une des voies d'activation de la lectine passe par la molécule CD2, dont la ligation induit la mort des cellules T indépendamment de Fas (Mollereau *et al.*, 1996). Cette observation pourrait expliquer l'insensibilité des cellules T de patients à la chimiokine, suite à leur activation par la PHA, et renforce l'hypothèse que l'IL-16 protège les cellules T de l'apoptose en modulant l'expression de Fas. Finalement ces résultats démontrent une sensibilité différente, des cellules T de patients par rapport aux cellules T de sujets sains, à l'action de l'IL-16. Le mode et/ou l'état d'activation des cellules T est donc un facteur important pour l'action de l'IL-16.

La stimulation des cellules T par l'IL-16 et la gp120 aboutit à l'inhibition de la prolifération des cellules T (Mittler et Hoffmann, 1989; Cruishank *et al.*, 1996). Nos résultats et ceux de Cruikshank (1996) indiquent que cet état d'immunosuppression n'est pas dû à l'induction de l'apoptose, car l'IL-16 protège les cellules contre la mort induite par l'activation. Par contre la gp120 du VIH sensibilise les cellules T à l'apoptose via un mécanisme Fas dépendant (Oyaizu *et al.*, 1994). Les différences entre les effets de l'IL-16 et ceux de gp120 peuvent se situer à plusieurs niveaux. La gp120 induit l'expression de Fas par sa capacité à stimuler la production de TNF- α et d'IFN- γ (Oyaizu *et al.*, 1994), mais l'IL-16 n'induit pas ou peu la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les cellules T (Amiel *et al.*, 1999). Gp120 induit l'internalisation de la molécule CD4 (Cefai *et al.*, 1992), contrairement à l'IL-16 (Cruikshank *et al.* 1996). Enfin, gp120 et l'IL-16 reconnaissent différentes structures de la molécule CD4. Gp120 interagit avec les domaines D1 et D2 et ainsi entre en compétition pour la reconnaissance du CMH de classe II. L'IL-16 interagit avec les domaines D3/D4. Il apparaît donc que la molécule CD4 est capable d'induire des signaux différents selon le ligand. Les conséquences de l'état d'inactivation des cellules T suite à la ligation de CD4 par l'IL-16 est inconnu. Mais il pourrait s'agir d'un état transitoire caractéristique des cellules en voie d'être recrutées sur un site inflammatoire, et qui ainsi seraient protégées de l'apoptose. La démonstration de l'augmentation de l'apoptose spontanée dans les cellules T stimulées par l'IL-16 suggère une dépendance d'un second signal pour la protection des cellules. Ainsi, l'état transitoire des cellules T recrutées et ses conséquences sur le devenir des cellules, est probablement dépendant du temps qui passe entre la stimulation par l'IL-16, et celui que prend la cellule pour sa migration et sa rencontre avec l'antigène spécifique sur le site de l'inflammation.

Les relations intercellulaires et intermoléculaires dans la trilogie lymphocytes T/monocytes et macrophages/IL-16 ne sont pas encore bien comprises. Plusieurs études sur des modèles de coculture *in vitro* de cellules différenciées à partir de monocytes humains et de lymphocytes T, et sur des modèles *in vivo*, par exemple des lignées de souris, aideront à la compréhension des mécanismes de l'IL-16 sur l'induction de la réponse immunitaire.

Quoi qu'il en soit, il apparaît que les propriétés de l'IL-16 ne soient pas limitées au chimiotactisme. Bien au contraire, ses effets s'élargissent aux cellules présentatrices d'antigène. L'IL-16 pourrait donc représenter un facteur de liaison dans les relations entre l'immunité innée et acquise.

L'un de nos objectifs était d'évaluer le rôle antiviral de l'IL-16 dans les cellules réservoirs. A cette fin, nous avons testé son activité anti-virale sur les macrophages et les cellules dendritiques et démontré sa capacité à inhiber la multiplication virale dans les deux populations. Nos résultats suggèrent plusieurs mécanismes d'inhibition.

Le premier mécanisme pourrait être un phénomène de compétition avec le VIH pour ses récepteurs. Dans des lignées T, le mécanisme d'inhibition peut être expliqué à un niveau transcriptionnel et non par une compétition. Mais les lymphocytes T expriment plus de molécules CD4 à leur surface que les cellules présentatrices de l'antigène. Ainsi, à concentrations égales, la saturation des sites de la molécule CD4 par l'IL-16 peut être plus importante dans les macrophages et les cellules dendritiques que dans les lymphocytes T. Nous ne pouvons donc pas éliminer l'hypothèse d'une compétition dans les CPAg pour la molécule CD4, tant qu'elle n'est pas vérifiée.

Les chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES inhibent l'infection des cellules par un phénomène de compétition, qui empêche la fusion du virus avec la membrane cellulaire (Moore *et al.*, 1997). La concentration des chimiokines présentes dans le surnageant des CPAg stimulés par l'IL-16 est loin de celle décrite comme inhibitrice de l'infection (Verani *et al.*, 1997) et n'explique probablement pas les effets observés. De plus, nos résultats ne montrent pas d'activité antivirale de MIP-1 α , à une concentration décrite comme inhibitrice dans les lymphocytes T.

Le second mécanisme pourrait être corrélé avec la modulation des récepteurs du VIH. Dans ce sens, l'IL-16 décroît l'expression de CD4 à la surface des cellules. L'effet observé n'est pas simplement due à une internalisation de la molécule CD4, puisqu'il est retrouvé de façon stable à un niveau transcriptionnel. Cependant, l'expression de CD4 dans les macrophages reste importante. De plus, l'IL-16 diminue la multiplication du VIH dans les cellules dendritiques, dont l'expression de CD4 est peu régulée. Nous ne pouvons négliger une éventuelle importance de la diminution de l'expression de CD4 dans la limitation de l'infection, mais l'observation ci-dessus ne nous indique pas une importance majeure de l'intensité d'expression de CD4 dans l'activité anti-virale de l'IL-16. Il a été suggéré que le degré d'infection par un virus à tropisme M est dépendant des concentrations respectives de CD4 et CCR5 à la surface de cellules HeLa (Platt *et al.*, 1998). Plus précisément, l'infectabilité des cellules T est directement corrélée au niveau d'expression de CCR5 (Wu *et al.*, 1997). La diminution d'expression de l'ARNm de CCR5 que nous observons dans les macrophages et à un degré moindre dans les cellules dendritiques pourraient donc être responsable, du moins en partie, du rôle antiviral de l'IL-16. Cependant, elle paraît de nouveau trop faible, en particulier dans les cellules dendritiques pour expliquer en totalité une inhibition virale de près de 100%. En effet, il a été suggéré que l'internalisation de

CCR5 suite à la ligation des chimiokines ne change pas la sensibilité de cellules à l'infection par le VIH (Aramori *et al.*, 1997). Cependant ce résultat a été démontré sur une lignée cellulaire de rein embryonnaire et s'éloigne de ce que l'on peut observer au niveau des cellules du système immunitaire. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'augmentation de l'expression de CCR5 induite par l'IL10 et la protéine virale Tat et CXCR4 induite par Tat est concomitante à l'augmentation de la multiplication virale dans les monocytes/macrophages (Sozzani *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1998). Au contraire, la diminution de CCR5 induite par l'IL-2 et la prostaglandine E2 et la diminution de CD4 induite par l'IL-2 et l'IFN- γ favorise la suppression de l'infection de monocytes/macrophages (Kutza *et al.*, 1998; Thivierge *et al.* 1998; Hariharan *et al.*, 1999). Malgré ces résultats, l'importance relative de la modulation des récepteurs du VIH, dans les mécanismes d'inhibition de l'infection, reste incertaine et dépend certainement des modèles d'étude. Par exemple, Hariharan (1999) montre les effets suppresseurs de l'IFN- γ sur l'infection du VIH dans des macrophages, malgré l'augmentation de l'expression de CCR5, mais en observant une diminution de l'expression de CD4. Finalement, la diminution de l'infection que nous observons, pourrait être due à la diminution de l'expression des récepteurs du VIH, qui pourrait être un mécanisme complémentaire de l'inhibition de la pénétration du virus par compétition, comme l'ont suggéré Alkhatib *et al.* (1997).

Le troisième mécanisme pourrait se situer au niveau de la signalisation et de la transcription. Nous avons vu dans l'introduction que l'IL-16 active la même famille de kinases que le LPS. Il a été montré que l'activité inhibitrice du LPS sur la multiplication virale est dépendante de la synthèse des chimiokines (Verani *et al.*, 1997) et passe par l'activation des p38MAPK (Zybarth *et al.*, 1999). Au contraire de

Verani, ce second travail démontre que le LPS n'inhibe pas la pénétration du virus, mais plutôt la stimule. Par contre, son action inhibitrice serait plus tardive et se situerait au niveau du transport nucléaire de l'ADN viral. Ceci suggère que l'action de l'IL-16, suite à l'activation de la MAPK p38, soit à un niveau postérieur à l'entrée du virus. Par ailleurs, l'IL-16 n'induit pas la synthèse de cytokines proinflammatoires qui facilitent la multiplication virale. Ainsi, d'autres facteurs, que ceux activés par le LPS ou le TNF- α , sont impliqués dans les voies de signalisation en réponse à la stimulation par l'IL-16.

Enfin, nos expériences démontrent que l'activité antivirale de l'IL-16, à des doses pourtant plus faibles ($3\mu\text{g/ml}$), est plus importante dans les cellules présentatrices de l'antigène (>90%) par rapport aux lymphocytes T (50-60% en présence de $5\mu\text{g/ml}$ d'IL-16). La modulation de la multiplication virale via la ligation de CD4 est dépendante de la présence de p56lck (Tremblay *et al.*, 1994). Cette kinase est absente dans les macrophages et les cellules dendritiques. D'autres mécanismes sont donc impliqués dans ces cellules.

La compréhension globale des mécanismes d'inhibition de l'infection par l'IL-16 n'est pas établie et nécessite un travail plus approfondi sur les différents types cellulaires cités. La préincubation de l'IL-16 avant l'infection par exemple, permet-elle d'inhiber l'entrée du virus. La modulation du VIH est-elle à un niveau transcriptionnel? Quelle est la voie de signalisation impliquée?

Dans le cadre de l'infection par le VIH, l'IL-16 possède donc les propriétés suivantes:

- Inhibition de la multiplication virale dans les lymphocytes T.
 - + au cours d'infection aiguë.
 - + au cours d'infections endogènes (cellules de patients) (Amiel et al., 1998).
- Inhibition de la multiplication virale dans les macrophages.
- Inhibition de la multiplication virale dans les cellules dendritiques.
- modulation de CD4, CCR5 et CXCR4. La diminution de l'expression de CCR5 dans les macrophages et les cellules dendritiques est d'autant plus importante que ces cellules représentent des filtres, au niveau des muqueuses, pour la propagation des virus à tropisme macrophagiques (Reece et al., 1998; Tuttle et al., 1998; Marzio et al., 1998).
- Protection des lymphocytes T de patients à l'encontre de la mort cellulaire programmée.
- Expansion des cellules CD4+ en association avec l'interleukine-2 (Parada et al, 1998).
- Rôle dans la régulation de la réponse immunitaire: commutation vers un profil Th1?

Malgré ces résultats, l'importance de l'IL-16 comme molécule effective, *in vivo*, n'est pas encore démontrée. Son importance, dans le développement de la réponse immunitaire lors de l'infection lentivirale a été suggéré par Chéret et al. (1997) dans un modèle de macaque infecté par SIVmac251. Les auteurs ont en effet détecté sa présence dans les cellules mononucléées obtenues à partir de lavages bronchoalvéolaires. Par ailleurs, l'expression de l'IL-16 est augmentée dans des clones cellulaires T provenant de patients dont la maladie ne progresse pas, et ce à long terme (Scala et al., 1997) et chez les sujets

traités par une molécule anti-rétrovirale, l'indinavir (Bisset et al., 1997). Récemment, notre laboratoire a démontré une présence importante de l'IL-16 dans le sérum des patients asymptomatiques, avec une chute de la concentration de la chimiokine lors de la progression vers le stade SIDA (Amiel et al., 1999). L'ensemble de ces observations suggère un rôle de l'IL-16 dans la lutte anti-virale. Pour confirmer un rôle effecteur de l'IL-16 *in vivo*, la mise en place d'un modèle de souris SCID pourrait s'avérer intéressant. Il permettrait d'étudier l'influence de l'IL-16, en présence ou non de l'IL-2, sur la charge virale au niveau d'un organisme, et ses effets sur l'homéostasie et la localisation des lymphocytes T CD4+, mais aussi T CD8+.

3) L'interaction CD4/Ligand.

L'activation de la cellule T par la cellule présentatrice de l'antigène requiert l'association physique du TCR et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Moebius et al., 1993), ainsi que celle de la molécule CD4 à des régions non polymorphes du CMH de classe II. Depuis, l'interleukine-16, comme d'autres nouveaux ligands naturels de la molécule CD4, les molécules gp17, SABP (pour secretory actin-binding protein), isolées du liquide séminal ainsi que GCDFP-15 (pour gross-cystic-disease fluid protein-15) et PIP (pour prolactin-inducible protein) isolées de tumeurs du sein, ont été caractérisées (Caputo et al., 1998). Bien que leurs fonctions soient encore inconnues, ces dernières partagent des séquences similaires et une structure quaternaire vraisemblablement tétramérique (Caputo et al., 1998), comme l'IL-16. La gp17 et l'IL-16 possèdent plusieurs propriétés communes. La première, qui se fixe au domaine D1 de la molécule CD4 inhibe, 1- la fixation de la molécule gp120 à la molécule CD4, 2- la formation de syncitia et 3- l'apoptose induite par la ligation de CD4 suivie par la

ligation du TCR en augmentant la synthèse de Bcl-2 (Gaubin et al., 1999; Autiero et al., 1997). La seconde, qui se fixe plutôt au domaine D3 de la molécule CD4 (Center et al., 1996) inhibe, 1- la multiplication virale dans les lymphocytes et les cellules présentatrices de l'antigène et 2- l'apoptose induite par l'activation en diminuant l'expression de la molécule de mort cellulaire Fas (Cruikshank et al., 1996 et notre travail). Ces caractéristiques communes pourraient permettre d'apporter un nouveau regard sur la liaison ligand-CD4 et la transduction du signal induite par la formation du complexe.

Au niveau du lymphocyte, on observe:

La forme monomérique:

- l'IL-16 monomérique possède un effet chimio-attractant (Muhlhahn et al., 1998).
- la glycoprotéine d'enveloppe gp120, qui lie la boucle CDR2 de la molécule CD4, associée à la protéine virale Tat, augmente la mort des lymphocytes T CD4+ en augmentant l'expression de la molécule de mort cellulaire Fas (Westendorp et al., 1995).
- la gp120 diminue l'expression de la molécule CD4 à la surface des lymphocytes T CD4+, par un mécanisme d'internalisation (Cefai et al., 1992)

La forme dimérique:

- lors de l'activation cellulaire T, deux molécules de CMH de classe II sont associées et reconnaissent la boucle CDR3 du domaine D1 de CD4, et activent la protéine kinase p56^{lck} (Zhang et al., 1996; Sakihama et al., 1995).

- la religation de la molécule gp120, liée à la boucle CDR2 du domaine D1 de CD4, par des anticorps (Banda et al., 1992) augmente la mort des lymphocytes T CD4+.

La forme trimérique:

- les molécules gp120 et gp41 à la surface du virus forment un complexe trimérique (Wyatt et al., 1998). Lors du processus d'infection , ce complexe reconnaît la boucle CDR3 de la molécule CD4, et initie un signal qui permet la translocation au noyau du facteur de transcription NF κ B et l'initialisation de la multiplication virale (Briant et al., 1997).

La forme tétramérique:

- les molécules de la famille gp17, qui semblent lier le domaine 1 de la molécule CD4 et dont les fonctions restent à déterminer, bien qu'elles inhibent l'apoptose.

- l'IL-16 qui semble lier le domaine 3 de CD4, dont l'action naturelle est le chimiotactisme suite à l'activation de p56^{lck}, qui par l'intermédiaire de ses domaines SH2 et SH3, recrute d'autres protéines nécessaires à l'induction du processus de migration.(Center et al., 1996).

Ces résultats montrent qu'il existe une diversité des fonctions de la molécule CD4. Cette diversité permet de contrôler l'activation cellulaire T par l'initialisation de signaux négatifs ou positifs, et est bien illustrée par le travail de Dumaurier et al. (1998). En se basant sur l'étude de la synthèse de la phosphatidylserine (PtSer), les auteurs ont montré que la molécule CD4 induit des signaux différents selon les ligands utilisés. La gp120 et les anticorps OKT4a inhibent la synthèse de la PtSer et génèrent un signal négatif, la jacaline, une lectine liant CD4, diminue la synthèse de PtSer et génère un signal activateur, et

enfin l'IL-16 qui ne module pas l'activité de synthèse de PtSer. Il semble donc que la transduction des signaux à partir de la molécule CD4, qui aboutissent aux résultats observés, sont très complexes, et dépendent, de la nature des structures formées à la surface de la cellule. Les ligands physiologiques de la molécule CD4 peuvent donc s'associer de façon monomériques (chimiotactisme), dimériques (activation lymphocytaire) ou tétramériques (chimiotactisme), et les associations qui ne s'effectueraient pas strictement dans ces contextes physiologiques, interféreraient avec ces deux fonctions.

La fonction de la molécule CD4 à la surface des cellules présentatrices de l'antigène n'est pas encore connue. Mais la démonstration que l'IL-16, en se liant à la molécule CD4, induit des signaux dans les macrophages et les cellules dendritiques, en l'absence de p56^{lck}, met en évidence un rôle nouveau de CD4 dans la modulation de l'activité des deux types cellulaires. Ce rôle demande à être élucidé

BIBLIOGRAPHIE

A

- Adamson D.C., Wildemann B., Sasaki M., Glass J.D., McArthur J.C., Christov V.I., Dawson T.M.&Dawson V.L. (1996) Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science* **274**, 1917-1926.
- Adler H., Beland J.L., Del-Pan N.C., Kobzik L., Brewer J.P., Martin T.R.&Rimm I.J. (1997) Suppression of Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)induced pneumonia in mice by inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS, NOS2). *J. Exp. Med.* **185**, 1533-1540.
- Akarid K., Sinet M., Desforges B.&Gougerot-Pocidalo M.A. (1995) Inhibitory effect of nitric oxide on the replication of a murine retrovirus *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.* **69**, 7001-7005.
- Albina J.E. (1995) On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J. Leuk. Biol.* **58**, 643-649.
- Alderson M.R., Tough T.W., Davis-Smith T., Braddy S., Falk B., Schooley K.A., Goodwin R.G., Smith C.A., Ramsdell F.&Lynch D.H. (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 71-77.
- Algeciras A., Dockrell D.H., Lynch D.H.&Paya C.V. (1998) CD4 regulates susceptibility to Fas-ligand and tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* **187**, 711-720.
- Alkhatib G., Locati M., Kennedy P.E., Murphy P.M.&Berger E.A. (1997) HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology* **234**, 340-438.
- Amara A., Le Gall S., Schwartz O., Salamero J., Montes M., Loetscher P., Baggolini M., Virelizier J.-L.&Arenzana-Seisdedos F. (1997) HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 α -dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med.* **186**, 139-146.
- Ameisen J.C.&Capron A. (1991) T cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* **123**, 102-105.
- Amiel C., Darcissac E., Truong M.-J., Dewulf J., Loyens M., Mouton Y., Capron A.&Bahr G.M. (1999) Interleukin-16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects and serum IL-16 drop with disease progression. *J. Clin. Invest.* **179**, 83-91.
- Aramori I., Zhang J., Ferguson S.S.G., Bieniasz P.D., Cullen B.R.&Caron M.G. (1997) Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *EMBO* **16**, 4606-4616.
- Arima M., Plitt J.R., Stellato C., Schwiebert L.M.&Schleimer R.P. (1995) The expression of lymphocyte chemoattractant (LCF) in human bronchial epithelial cells. *J. All. Clin. Immunol.* **97**, 293A.
- Autiero M., gaubin M., Mani J.C., Castejon C., Martin M., Marhomy S., Guardiola J.&Piatier-Tonneau D. (1997) Surface plasmon resonance analysis of gp17, a natural CD4 ligand from human seminal plasma inhibiting human immunodeficiency virus type-1 gp120-mediated syncitium formation. *Eur. J. Biochem.* **245**, 208-213.

B

- Badley A.D., Dockrell D., Simpson M., Schut R., Lynch D.H., Leibson P.&Paya C.V. (1997) Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **185**, 55-64.
- Baggiolini M.&Dahinden C.A. (1994) CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol. today* **15**, 127-133.
- Baggiolini M.&Moser B. (1997) Blocking chemokine receptors. *J. Exp. Med.* **186**, 1189-1191.
- Bahr G.M., Capron A.&Dewulf J. (1997) Elevated serum level of Fas ligand correlates with the asymptomatic stage of human immunodeficiency virus infection. *Blood* **84-91**, 896-898.
- Baier M., Bannert N., Werner A., Lang K.&Kurth R. (1997) Molecular cloning, sequence, expression, and processing of the interleukin 16 precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5273-5277.
- Baier M., Werner A., Bannert N., Metzner K.&Kurth R. (1995) HIV suppression by interleukine-16. *Nature* **375**, 563.
- Baldeweg T., Sooranna S., Das I., Catalan J.&Gazzard B. (1996) Serum nitrite concentration suggest a role for nitric oxide in AIDS. *AIDS* **10**, 451-452.
- Banchereau J.&Steinman R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- 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 gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **176**, 1099-1106.
- Barnes P.J.&Liew F.Y. (1995) Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol. Today* **16**, 128-130.
- Bergstresser P.R., Kitajima T., Xu S., Arizumi K.&Takashima A. (1997) T cell-mediated terminal maturation of dendritic cells. *Dendritic cells in Fundamental and Clinical Immunology edited by Ricciardi-Castagnoli, Plenum Press, New York* 65-69.
- Bisset L.R., Rothen M., Joller-Jemelka H.I., Dubs R.W., Grob P.J.&Opravil M. (1997) Change in circulating levels of the chemokines macrophage inflammatory proteins 1 α and 1 β , RANTES, , monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-16 following treatment of severely immunodeficient HIV-infected individuals with indinavir. *AIDS* **11**, 485-491.
- Blauvelt A., Asada H., Saville M.W., Klaus-Kovtun V., Altman D.J.&Yarchoan R. (1997) Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J. Clin. Invest.* **100**, 2043-2053.
- Blond D., Chéret A., Raoul H., Le Grand R., Caufour P., Théodoro F.&Dormont D. (1998) Nitric oxide synthesis during acute SIVmac251 infection of macaques. *Res. Virol.* **149**, 75-86.
- Bockaert J. (1993) NO, un messager de l'environnement synaptique. *Regard sur la biochimie* **4**, 20-32.
- Boehme S.A.&Lenardo M.J. (1993) Propiocidal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1552-1560.
- Bras A., Rodriguez-Borlado L., Gonzalez-Garcia A.&Martinez C. (1997) Nitric oxide regulates clonal expansion and activation-induced cell death triggered by staphylococcal enterotoxin B. *Infection and Immunity* **65**, 4030-4037.
- Briant L., Signoret N., Gaubin M., Robert-Hebmann V., Zhang X., Murali R., Greene M.I., Piatier-Tonneau D.&Devaux C. (1997) Transduction of activation signal that follows

- HIV-1 binding to CD4 and CD4 dimerization involves the immunoglobulin CDR3-like region in domain 1 of CD4. *J. Biol. Chem.* **272**, 19441-19450.
- Buelens C., Verhasselt V., De Groote D., Thielemans K., Goldman M. & Willems F. (1997) Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1848-1852.
- Bukrinsky M., Schmidtmayerova H., Zybarth G., Dubrovsky L., Sherry B. & Enikolopov G. (1996) A critical role of nitric oxide in human immunodeficiency virus type 1-induced hyperresponsiveness of cultured monocytes. *Molecular Medicine* **2**, 460-468.
- Bukrinsky M.I., Nottet H.S.L.M., Schmidtmayerova H., Dubrovsky L., Flanagan C.R., Mullins M.E., Lipton S.A. & Gendelman H.E. (1995) Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. *J. Exp. Med.* **181**, 735-745.
- Bukrinsky M.I., Stanwick T.L., Dempsey M.P. & Stevenson M. (1991) Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* **254**, 423.

C

- Capobianchi M.R., Abbate I., Antonelli G., Turriziani O., Dolei A. & Dianzani F. (1998) Inhibition of HIV type 1 Bal replication by MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES in macrophages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 233-240.
- Caputo E., Autiero M., Mani J.C., Basmocigullari S., Piatier-Tonneau D. & Guardiola J. (1998) Differential antibody reactivity and CD4 binding of the mammary tumor marker protein GCDFP-15 from breast cyst and its counterparts from exocrine epithelia. *Int. J. Cancer* **78**, 76-85.
- Caux C. (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* **180**, 1263-1272.
- Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Barthelemy C., Liu Y.J. & Banchereau J. (1994) Interleukine 10 inhibits T cell alloreactivity induced by human dendritic cells. *Int. Immunol.* **6**, 1177-1185.
- Cefai D., Ferrer M., Serpente N., Idziorek T., Dautry-Varsat A., Debre P. & Bismuth G. (1992) Internalization of HIV glycoprotein gp120 is associated with down-modulation of membrane CD4 and p56lck together with impairment of T cell activation. *J. Immunol.* **149**, 285-294.
- Celada A. & Nathan C. (1994) Macrophage activation revisited. *Immunol. Today* **15**, 100-102.
- Cella M., Sallusto F. & Lanzavecchia A. (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 10-16.
- Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., Lane P., Lanzavecchia A. & Alber G. (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukine-12 and enhances T-cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**, 747-752.
- Center D.M. & Cruikshank W.W. (1982) Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. I. Identification and characterization of chemoattractant activity for lymphocytes from mitogen-stimulated mononuclear cells. *J. Immunol.* **128**, 2563-2568.
- Center D.M., Kornfeld H. & Cruikshank W.W. (1996) Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol. Today* **17**, 476-481.
- Chambers C.A. & Allison J.P. (1997) Co-stimulation in T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 396-404.

- Chan D.C.&Kim P.S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
- Chaturvedi S.&Newman S.L. (1997) Modulation of the effector function of human macrophages for *Histoplasma capsulatum* by HIV-1. *J. Clin. Invest.* **100**, 1465-1474.
- Chéret A., Le Grand R., Caufour P., Neildez O., Matheux F., Théodoro F., Boussin F., Vaslin B.&Dormont D. (1997) Chemoattractant factors (IP-10, MIP-1 α , IL-16) mRNA expression in mononuclear cells from different tissues during acute SIV mac251 infection of macaques. *J. Med. Primatol.* **26**, 19-26.
- Chesrown S.E., Monnier J., Visner G.&Nick H.S. (1994) Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, IFN- γ , TGF- β , and IL-10 in murine macrophages cell lines and rat peritoneal macrophages. *Bioch. Bioph. Res. Com.* **200**, 126-134.
- Chllichlia K., Peter M.E., Rocha M., Scaffidi C., Bucur M., Krammer P.H., Schirrmacher V.&Umansky V. (1998) Caspase activation is required for nitric oxide-mediated CD95 (APO-1/Fas)-dependent and independent apoptosis in human lymphoid cells. *Blood* **91**, 4311-4320.
- Choe H., Farzan M., Sun Y., Sullivan N., Rollins B., Ponath P.D., Wu L., MacKay C.R., Larosa G., Newman W., Gerard N., Gerard C.&Sodroski J. (1996) The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.
- Chun T.-W., Carruth L., Finzi D., Shen X., DiGiuseppe J.A., Taylor H., Hermankova M., Chadwick K., Margolick J., Quinn T.C., Kuo Y.-H., Brookmeyer R., Zeiger M.A., Barditch-Crovo P.&Siliciano R.F. (1997) Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-188.
- Chupp G.L., Wright E.A., Wu D., Vallen-Mashikian M., Cruikshank W.W., Center D.M., Kornfeld H.&Berman J.S. (1998) Tissue and T cell distribution of precursor and mature IL-16. *J. Immunol.* **161**, 3114-3119.
- Cocchi F., Devico A.L., Garzino-Demico A., Arya S.K., Gallo R.C.&Lusso P. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-1815.
- Cohen J.J. (1993) Apoptosis. *Immunol. Today* **14**, 126-130.
- Corradin S.B., Fasel N., Buchm Yller-Rouiller Y., Ransijn A., Smith J.&Maul J. (1993) Induction of macrophage nitric oxide production by interferon- γ and tumor necrosis factor- α is enhanced by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* **20**, 45-2048,
- Croft M.&Dubey C. (1997) Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit. Rev. Immunol.* **17**, 89-118.
- Cruikshank W.W., Berman J.S., Theodore A.C., Bernardo J.&Center D.M. (1987) Lymphokine activation of T4+ T lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* **138**, 3817-3823.
- Cruikshank W.W.&Center D.M. (1982) Modulation of lymphocyte migration by human lymphokines. II. Purification of lymphotactic factor (LCF). *J. Immunol.* **128**, 2569-2574.
- Cruikshank W.W., Center D.M., Nisar N., Wu M., Natke B., Theodore A.C.&Kornfeld H. (1994) Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: association of biologic function with CD4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5109-5113.
- Cruikshank W.W., Greenstein J.L., Theodore A.C.&Center D.M. (1991) Lymphocyte chemoattractant factor induces CD4-dependent intracytoplasmic signalling in lymphocytes. *J. Immunol.* **146**, 2928-2934.

- Cruikshank W.W., Kornfeld H.&Center D.M. (1998) Signaling and functional properties of interleukine-16. *Intern. Rev. Immunol.* **16**, 523-540.
- Cruikshank W.W., Lim K., Theodore A.C., Cook J., Fine G., Weller P.F.&Center D.M. (1996) IL-16 inhibition of CD3-dependent lymphocyte activation and proliferation. *J. Immunol.* **157**, 5240-5248.
- Cruikshank W.W., Long A., Tarpy R., Kornfeld H., Caroll M.P., Teran S.T., Holgate S.T.&Center D.M. (1995) Early identification of lymphocyte chemoattractant factor (IL-16) and macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α) in BAL of antigen challenged asthmatics. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **13**, 738-747.
- Curfs J.H.A.J.&Meis H.-K. J.A.A. (1997) A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin. Microb. Rev.* **10**, 742-780.

D

- 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.
- Davis I.C., Girard M.&Fultz P.N. (1998) Loss of CD4+ T cells in human immunodeficiency virus type 1-infected chimpanzees is associated with increased lymphocytes apoptosis. *J. Virol.* **72**, 4623-4632.
- de Braco M.M., felippo M., Vernava D., Perez-Bianco R.&de Tezanos Pinto M. (1997) Nitric oxide production and disease evolution in HIV-infected hemophilic. *AIDS* **11**, 822-824.
- Defer M.-C., Dugas B., Paul-Eugène N., Yamaoka K., Kolb J.-P.&Damais C. (1994) RTMle de l'interleukine-4 dans la régulation de la production de monoxyde d'azote (NO) par les monocytes humains normaux. *C.R. Acad. Sci. Paris* **317**, 1021-1025.
- DeKruyff R.H., Fang Y.&Umetsu D.T. (1998) Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *J. Immunol.* **160**, 2231-2237.
- Del Llano A.M., Amiero-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.
- Del Real G., Llorente M., Bosca L., Hortelano S., Serrano A., Lucas P., Gomez L., Toran J.L., Redondo C.&Martinez-A C. (1998) Suppression of HIV-1 infection in linomide-treated SCID-hu-PBL mice. *AIDS* **12**, 865-872.
- Delgado E., Finkel V., Baggolini M., Mackay C.R., Steinman R.M.&Granelli-Piperno A. (1997/1998) Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several β -chemokines. *Immunobiol.* **198**, 490-500.
- Deng H., Unutmaz D., Kewalramani V.N.&Littman D.R. (1997) Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296-300.
- Di Marzio P., Tse J.&Landau N.R. (1998) Chemokine receptor regulation and HIV type 1 tropism in monocyte-Macrophages. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **14**, 129-138.
- Dimmeler S., Haendeler J., Sause A.&Zeiher A.M. (1998) Nitric oxide inhibits APO-1/Fas-mediated cell death. *Cell Growth Differ.* **9**, 415-22.
- Doherty T.M. (1995) T-cell regulation of macrophage function. *Cur. Opin. Immunol.* **7**, 400-404.

- Doranz B.J., Rucker J., Yi Y., Smyth R.J., Samson M., Peiper S.C., Parmentier M., Collman R.G.&Doms R.W. (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158.
- Doyle C.&Strominger J.L. (1987) Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **330**, 256.
- Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y., Nagashima K.A., Cayanan C., Madden P.J., Koup R.A., Moore J.P.&Paxton W.A. (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.
- Dumaurier M.-J., Pelassy C., Breittmayer J.-P.&Aussel C. (1998) Regulation of the serine-base exchange enzyme system by CD4: effects of monoclonal antibodies, jacalin, interleukin 16 and the HIV membrane protein gp120. *Biochem. J.* **329**, 49-54.
- Dybul M., Weissman D., Rubbert A., Machado E., Cohn M., Ehler L., O'Callahan M., Mizell S.&Fauci A.S. (1998) The role of dendritic cells in the infection of CD4+ T cells with the human immunodeficiency virus: use of dendritic cells from individuals homozygous for the Δ 32CCR5 allele as a model. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **14**, 1109-1113.

E

- Estaquier J., Idziorek T., De Bels F., Barré-Sinoussi F., Hurtrel B., Aubertin A.M., Venet A., Mehtali M., Muchmore E., Michel P., Mouton Y., Girard M.&Ameisen J.C. (1994) Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and non pathogenic primate lentiviral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9431-9435.
- Estaquier J., Idziorek T., Zou W., Emilie D., Farber C.M., Bourez J.M.&Ameisen J.C. (1995) T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J. Exp. Med.* **182**, 1759-1767.
- Estaquier J., Tanaka M., Suda T., Nagata S., Goldstein P.&Ameisen J.C. (1996) Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists. *Blood* **87**, 4959-4966.
- Evans T.G., Rasmussen K., Wiebke G.&Hibbs JR J.B. (1994) Nitric oxide synthesis in patients with advanced HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* **97**, 83-86.

F

- Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E.&Berger E.A. (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-876.
- Finco O., Nuti S., De Magistris M.T., Mangiavacchi L., Aiuti A., Forte P., Fantoni A., van der Putten H.&Abrignani S. (1997) Induction of CD4+ T cell depletion in mice doubly transgenic for HIV gp120 and human CD4. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1319-1324.
- Finkel T.H., Tudor-Williams G., Banda N.K., Cotton M.F., Curiel T., Monks C., Baba T.W., Ruprecht R.M.&Kupfer A. (1995) Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nature Medicine* **1**, 129-134.

- Finkelman F.D., Lees A., Birnbaum R., Gause C.&morris S.C. (1996) Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* **157**, 1406-1414.
- Fleury S., de Boer R.J., Rizzardi G.P., Wolthers K.C., Otto S.A., Welbon C.C., Graziosi C., Knabenhans C., Soudeyns H., Bart P.A., Gallant S., Corpataux J.M., Gillet M., Meylan P., Schnyder P., Meuwly J.Y., Spreen W., Glauser M.P., Miedema F.&Pantaleo G. (1998) Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: Effect of highly active antiretroviral therapy. *Nature Medicine* **4**, 794-801.
- Forster I.&Lieberam I. (1996) Peripheral tolerance of CD4 T cells following local activation in adolescent mice. *Eur. J. Immunol.* **26**, 3194-3202.
- Foster S., Beverley P.&Aspinall R. (1995) gp120-induced programmed cell death in recently activated T cells without subsequent ligation of the T cell receptor. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1778-1782.
- Franz J.K., Kolb S.A., Hummel K.M., Lahrtz F., Neidhart M., Aicher W.K., Pap T., Gay R.E., Fontana A.&Gay S. (1998) Interleukin-16, produced by synovial fibroblast, mediates chemoattraction for CD4+ T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2661-2671.
- Fuji Y., Otake K., Tashiro M.&Adachi A. (1996) In vitro cytoidal effects of human immunodeficiency virus type 1 Nef on unprimed CD4+ T cells without MHC restriction. *J. Gen. Virol.* **77**, 2943-2951.

G

- Galli G., Annunziato F., Mavilia C., Romagnani P., Cosmi C., Manetti R., Pupilli C., Maggi E.&Romagnani S. (1998) Enhanced HIV expression during Th2-oriented responses explained by the opposite regulatory effect of IL-4 and IFN- γ on fusin/CXCR4. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3280-3290.
- Gandhi R.T., Chen B.K., Strauss S.E., Dale J.K., Lenardo M.J.&Baltimore D. (1998) HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism. *J. Exp. Med.* **187**, 1113-1122.
- Gao M., Tsuchie H., Detorio M.A., Hossain M.M., Owatari S., Zhang J., Taniguchi K., Nishimoto A., Shirono H., Koga J., Takata N., Matsumoto T., Yoshizaki K.&Kurimura T. (1997) Interleukin-16 does not suppress HIV-1 replication in naturally infected peripheral blood mononuclear cells. *AIDS* **11**, 538-539.
- Gaubin M., Autiero M., Basmaciogullari S., Métivier D., Mis'hal Z., Culerrier R., Oudin A., Guardiola J.&Piatier-Tonneau D. (1999) Potent inhibition of CD4/TCR-mediated T cell apoptosis by a CD4-binding glycoprotein secreted from breast tumor and seminal vesicle cells. *J. Immunol.* **162**, 2631-2638.
- Gendelman H.E., Orenstein J.M., Baca L.M., Weiser B., Burger H., Kalter D.C.&Meltzer M.S. (1989) The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS* **3**, 475-495.
- Gendelman H.E., Persidsky Y., Ghorpade A., Limoges J., Stins M., Fiala M.&Morrisett R. (1997) The neuropathogenesis of the AIDS dementia complex. *AIDS* **11**, S35-S45.
- Ghanekar S., Zheng L., Logar A., Navratil J., Borowski L., Gupta P.&Rinaldo C. (1996) Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated *in vitro* with HIV-1 and herpes simplex virus. *J. Immunol.* **157**, 4028-4036.
- Gougeon M.-L., Lecoeur H., Duloust A., Enouf M.-G., Crouvoisier M., Goujard C., Debord T.&Montagnier L. (1996) Programmed cell death to apoptosis of CD4 and CD8 T cells

- correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol.* **156**, 3509-3520.
- Granelli-Piperno A., Moser B., Pope M., Chen D., Wei Y., Isdell F., O'Doherty U., Paxton W., Koup R., Mojsov S., Bhardwaj N., Clark-Lewis I., Baggolini M.&Steinman R.M. (1996) Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J. Exp. Med.* **184**, 2433-2438.
- Granelli-Piperno A., Delgado E., Finkel V., Paxton W.&Steinman R.M. (1998) Immature dendritic cells selectively replicate macrophagotropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* **72**, 2733-2737.
- Groeneveld P.H.P., Kroon F.P., Nibbering P.H., Bruisten S.M., Swieten P.V.&Furth R.V. (1996) Increased production of nitric oxide correlates with viral load and activation of mononuclear phagocytes in HIV-infected patients. *Scand. J. Infect. Dis.* **28**, 341-345.
- 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.
- Gupta S.K., Lysko P.G., Pillarisetti K., Ohlstein E.&Stadel J.M. (1998) Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* **273**, 4282-4287.

H

- Hariharan D., Douglas S.D., Lee B., Lai J.P., Campbell D.E.&Ho W.Z. (1999) Interferon-gamma upregulates CCR5 expression in cord and adult blood mononuclear phagocytes. *Blood* **93**, 1137-1144.
- Harris N., Buller M.L.&Karupiah G. (1995) Gamma interferon-induced nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *J. Virol.* **69**, 910-915.
- Hart D.N.J. (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245-3287.
- Haseltine W.A. (1991) Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *Faseb J.* **5**, 2349.
- Hashimoto F., Oyaizu N., Kalyanaraman V.S.&Pahwa S. (1997) Modulation of Bcl-2 protein by CD4 cross-linking: a possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by interleukin-2. *Blood* **90**, 745-753.
- Hathcock K.S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P.&Hodes R.J. (1994) Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* **180**, 631-640.
- Heidenreich S., Schmidt M., August C., Cullen P., Rademaekers A.&Pauels H.-G. (1997) Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule. *J. Immunol.* **159**, 3178-3188.
- Herbein G., Doyle A.G., Montaner I.J.&Gordon S. (1995) Lipopolysaccharide (LPS) down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumor necrosis factor (TNF) and IL-1 beta. *Clin. Exp. Immunol.* **102**, 430-437.
- Hessel E.M., Cruikshank W.W., Van Ark I., de Bie J.J., Van esch B., Hofman G., Nijkamp F.P., Center D.M.&Oosterhout J.M. (1998) Involvement of IL-16 in the induction of

- airway hyper-responsiveness and up-regulation of IgE in a murine model of allergic asthma. *J. Immunol.* **160**, 2998-3005.
- Heufler C., koch F., Stanzl U., Topar G., Wysocka M., Trinchieri G., Enk A., Steinmann R.M., romani N.&Schuler G. (1996) Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 659-668.
- Hirji N., Lin T.J., Bissonnette E., Belosevic M.&Befus A.D. (1998) Mechanism of macrophage stimulation through CD8: macrophage CD8 α and CD8 β induce nitric oxide production and associated killing of the parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* **160**, 6004-6011.
- Hirsch V.M., Sharkey M.E., Brown C.R., Brichacek B., Goldstein S., Wakefield J., Byrum R., Elkins W.R., Hahn B.H., Lifson J.D.&Stevenson M. (1998) Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIVsmPBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification. *Nature Medicine* **4**, 1401-1408.
- Huang F.-P., Niedbala W., Wei X.-Q., Xu D., Feng G.-J., Robinson J.H., Lam C.&Liew F.Y. (1998) Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4062-4070.
- Huang L., I. B., Hofmann W., Sodroski J.&Pardee A.B. (1998) Tat protein induces human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) coreceptors and promotes infection with both macrophage-tropic and T-lymphotropic HIV-1 strains. *J. Virol.* **72**, 8952-8960.

I

- Inaba K., Pack M., Inaba M., Sakuta H., Isdell F.&Steinman R.M. (1997) High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell area of lymph nodes. *J. Exp. Med.* **186**, 665-672.
- Iseki R., Mukai M.&Iwata M. (1991) Regulation of T lymphocyte apoptosis. Signals for the antagonism between activation -and glucocorticoid-induced death. *J. Immunol.* **147**, 4286-4292.

J

- Jacobs F., Chaussabel D., Truyens C., Leclercq V., Carlier Y., Goldman M.&Vray B. (1998) IL-10 up-regulates nitric oxide (NO) synthesis by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages: improved control of *trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **113**, 59-64.
- Janeway C. (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.
- Jenkins M.K.&Johnson J.G. (1993) Molecules involved in T-cell costimulation. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 361.
- Jones P.L.S.J., Korte T.&Blumenthal R. (1998) Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and coreceptors. *J. Biol. Chem.* **272**, 404-409.
- June C.H., Bluestone J.A., Nadler L.M.&Thompson C.B. (1994) The B7 and CD28 receptors families. *Immunol. Today* **15**, 321-331.

K

- Kacani L., Frank I., Spruth M., Schwendiger M.G., Mÿllauer B., Sprinzi G.M., Steindl F.&Dierich M.P. (1998) Dendritic cells transmit human immunodeficiency virus type 1 to monocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Virol.* **72**, 6671-6677.
- Kalinski P., Schuitemaker J.H.N., Hilkens C.M.U.&Kapsenberg M.L. (1998) Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: The levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J. Immunol.* **161**, 2804-2809.
- Kaplan D.&Sieg S. (1998) Role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in human immunodeficiency virus type 1 disease. *J. Virol.* **72**, 6279-6282.
- Karsten V., Gordon S., Kim A.&Herbein G. (1996) HIV-1 envelope glycoprotein gp120 down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* **88**, 55-60.
- Katsikis P.D., Garciaojedan M.E., Wunderlich E.S., Smith C.A., Yagita H., Okumura K., Kayagaki N., Alderson M., Herzenberg L.A.&Herzenberg L.A. (1996) Activation-induced peripheral blood T cell apoptosis is Fas independent in HIV-infected individuals. *Int. Immunol.* **8**, 1311-1317.
- Keane J., Nicoll J., kim S., Wu D.M.H., Cruikshank W.W., Brazer W., Natke B., Zhang Y., Center D.M.&Kornfeld H. (1998) Conservation of structure between human and murine IL-16. *J. Immunol.* **160**, 5945-5954.
- Kerr J.F., Wyllie A.H.&Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.
- Kitajima T., Ariizumi K., Bergstresser P.R.&Takashima A. (1996) A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J. Clin. Invest.* **98**, 142-147.
- Klatzmann D., Champagne E., Chamaret S., Gruet D., Hercend T., Gluckman J.C.&Montagnier L. (1984) T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-768.
- 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.
- Koppi T.A., Tough-Bement T., Lewinsohn D.M., Lynch D.H.&Alderson M.R. (1997) CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3161-3165.
- Kornfeld H., Berman J.S., Beer D.J.&Center D.M. (1985) Induction of human T lymphocyte motility by interleukin-2. *J. Immunol.* **134**, 3887-3890.
- Krautwald S. (1998) IL-16 activates the SAPK signaling pathway in CD4+ macrophages. *J. Immunol.* **160**, 5874-5879.
- Kronin V., Winkel K., Sÿss G., Kelso A., Heath W., Kirberg J., von Boehmer H.&Shortman K. (1996) A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J. Immunol.* **157**, 3819-3827.
- Krummel M.F.&Allison J.P. (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* **183**, 2533-2540.
- Kuchroo V.K., Prabhu Das M., Brown J.A., Ranger A.M., Zamvil S.S., Sobel R.A., Weiner H.L., Nabavi N.&Glimcher L.H. (1995) B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate preferentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* **80**, 707-718.

- Kurts C., Kosaka H., Carbone F.R., Miller J.F.A.P.&Heath W.R. (1997) Class I-restricted crosspresentation of exogenous self antigens leads to deletion of autoreactive CD8+ cells. *J. Exp. Med.* **186**, 239-245.
- Kutza J., Hayes M.P.&Clouse K.A. (1998) Interleukin-2 inhibits HIV-1 replication in human macrophages by modulating expression of CD4 and CC-chemokine receptor-5. *AIDS* **12**, F59-F64.

L

- Labege S., Cruikshank W.W., Kornfeld H., Beer D.J.&Center D.M. (1996) Secretion of IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) from serotonin-stimulated CD8+ T cells *in vitro*. *J. Immunol.* **156**, 310-315.
- Laberge S., Ernst P., Ghaffar O., Cruikshank W.W., Kornfeld H., Center D.M.&Hamid Q. (1997) Increased expression of interleukine-16 in bronchial mucosa of subjects with atopic asthma. *1997* **17**, 193-202.
- Laberge S., W.W. C., Kornfeld H.&Center D.M. (1995) Histamine-induced secretion of lymphocyte chemoattractant factor from CD8+ T cells is independent of transcription and translation: evidence for constitutive protein synthesis and storage. *J. Immunol.* **155**, 2902-2910.
- Lane T.E., Paoletti A.D.&Buchmeier M.J. (1997) Disassociation between the *in vitro* and *in vivo* effects of nitric oxide on a neurotropic murine coronavirus. *J. Virol.* **71**, 2202-2210.
- Leenen P.J.M., Raosevic K., Voerman J.S.A., Salomon B., van Rooijen N., Klatzmann D.&van Ewijk W. (1998) Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: *in vivo* phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J. Immunol.* **160**, 2166-2173.
- Liao F., Alkhatib G., Peden K.W.C., Sharma G., Berger E.A.&Farber J.M. (1997) STRL33, a novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophages-tropic and T cell-line tropic HIV-1. *J. Exp. Med.* **185**, 2015-2023.
- Liew F.Y. (1995) Interactions between cytokines and nitric oxide. *Adv. Neuroimmunol.* **5**, 201-209.
- Liew F.Y. (1995) Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 396-399.
- Liew F.Y., Li Y., Severn A., Millott S., Schmidt J., Salter M.&Moncada S. (1991) A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2489-2494.
- Liew F.Y.&Vickerman K. (1997) Immune effector mechanism in parasitic infection. *Parasitology Today* **13**, 365-366.
- Lim K.G., Wan H.C., Bozza P.T., Resnick M.B., Wong D.T., Cruikshank W.W., Kornfeld H., Center D.M.&Weller P.F. (1996) Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J. Immunol.* **156**, 2566-2570.
- Lin C.-L., Suri R.M., Rahdon R.A., Austyn J.M.&Roake J.A. (1998) Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**, 4114-4122.

- Lissy N.A., Van Dyk L.F., Becker-Hapak M., Vocero-Akbani A., Mendler J.H.&Dowdy S.F. (1998) TCR antigen-induced cell death occurs from a late G1 phase cell cycle check point. *Immunity* **8**, 57-65.
- Littman D.R. (1987) The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu. Rev. Immunol.* **5**, 561.
- Liu L., Rich B.E., Inobe J.-I., Chen W.&Weiner H.L. (1998) Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cells culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *International Immunology* **10**, 1017-1026.
- Liu L., Zhang M., Jenkins C.&MacPherson G.G. (1998) Dendritic cells heterogeneity in vivo: Two functionally different dendritic cell population in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J. Immunol.* **161**, 1146-1155.
- Loetscher M., Amara A., Oberlin E., Brass N., Legler D., Loetscher P., D'Apuzzo M., Meese E., Rousset D., Virelizier J.L., Bagiolini M., Arenzana-Seisdedos F.&Moser B. (1997) TYMSTR, a putative chemokine receptor selectively expressed in activated T cells, exhibits HIV-1 coreceptor function. *Curr. Biol.* **7**, 652-660.
- Lopez-Guerrero A.&Alonso M.A. (1997) Nitric oxide production induced by herpes simplex virus type 1 does not alter the course of the infection in human monocytic cells. *J. Gen. Virology* **78**, 1977-1980.

M

- Mac lean A., Wei X.-Q., Huang F.-P., Al-Alem U.A., Chan W.L.&Liew F.Y. (1998) Mice lacking inducible nitric-oxide synthase are more susceptible to herpes simplex virus infection despite enhanced Th1 cell responses. *J. Gen Virol.* **79**, 825-830.
- Maciaszek J.W., Parada N.A., Cruikshank W.W., Center D.M., Kornfeld H.&Viglianti G.A. (1997) IL-16 represses HIV-1 promoter activity. *J. Immunol.* **158**, 5-8.
- Mackewicz C.E., Blackbourn D.J.&Levy J.A. (1995) CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2308-2312.
- Maddon P.J., Littman D.R., Godfrey M., Maddon D.E., Chess L.&Axel R. (1985) The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* **42**, 93.
- Mancino G., Placido R., Bach S., Mariani F., Montesano C., Ercoli L., Zembala M.&Colizzi V. (1997) Infection of human monocytes with *mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus type 1 replication and transmission to T cells. *J. Inf. Dis.* **175**, 1531-1535.
- Mangan D.F.&Wahl S.M. (1991) Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and proinflammatory cytokines. *J. Immunol.* **147**, 3408-3412.
- Mannick J.B., Asano K., Izumi K., Kieff E.&Stamler J.S. (1994) Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* **79**, 1137-1146.
- Masurier C., Salomon B., Guettari N., Pioche C., Lachapelle F., Guigon M.&Klatzmann D. (1998) Dendritic cells route human immunodeficiency virus to lymph nodes after vaginal or intravenous administration to mice. *J. Virol.* **72**, 7822-7829.
- Mayer B.&Hemmens B. (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *TIBS* **22**, 477-481.

- McCloskey T.W., Ott M., Tribble E., Khan S.A., Teichberg S., Paul M.O., Pahwa S., Verdin E.&Chirmule N. (1997) Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J. Immunol.* **158**, 1014-1019.
- Melino G., Bernassola F., Knight R.A., Corasaniti M.T., Nistico G.&Finazzi-Agro A. (1997) S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* **388**, 432-433.
- Merrill J.E., Koyanagi Y.&Chen I.S. Y. (1989) Interleukin-1 and tumor necrosis factor α can be induced from mononuclear phagocytes by human immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *J. Virol.* **63**, 4404-4408.
- 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.
- Michel J.-B.&Arnal J.-F. (1993) Monoxyde d'azote et hypertension artérielle. *Méd/Sci.* **9**, 1061-1067.
- 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.
- Moebius U., Pallai P., Harrison S.C.&Reinherz E.L. (1993) Delineation of an extended surface contact area on human CD4 involved in MHC class II major histocompatibility complex binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8259-8263.
- Mollereau B., Deckert M., Dugas O., Rieux-Laucat F., Hirsch F., Bernard A., Fischer A., Lynch D.H., Charpentier B., Le Deist F.&Senik A. (1996) CD2-induced apoptosis in activated human peripheral T cells. *J. Immunol.* **156**, 3184-3190.
- Moncada S.&Higgs A. (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Eng. J. Med.* **329**, 2002-2012.
- Moore J.P., Trkola A.&Dragic T. (1997) Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 551-562.
- Morelli A., Larregina A., Chuluyan E., Kolkowski E.&Fainboim L. (1996) Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. *Immunology* **89**, 126-134.
- Mühlahn P., Zweckstetter M., Georgescu J., Ciosto C., Renner C., Lanzenderfer M., Lang K., Ambrosius D., Baier M., Kurth R.&Holak T.A. (1998) Structure of interleukin 16 resembles a PDZ domain with an occluded peptide binding site. *Nature struct. Biol.* **5**, 682-686.
- Muller P., Engelstedter M., Werner A., Braner J., Staszewski S., Miller V., Doerr H.-W., Kurth R.&Cichutek K. (1997) Increased serum and mRNA levels of RANTES associated with elevated levels of activated CD8+CD38+ T cells in HIV-1-infected individuals. *Intervirology* **40**, 263-270.
- Munn D.H., Pressey J., Beall A.C., Hudes R.&Alderson M.R. (1996) Selective activation-induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. *J. Immunol.* **156**, 523-532.

N

- Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
- Naif H.M., Li S., Alali M., Sloane A., Wu L., Kelly M., Lynch G., Lloyd A.&Cunningham A.L. (1998) CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **72**, 830-836.
- Nathan C. (1997) Inducible nitric oxide synthase: what differences does it make. *J. Clin. Invest.* **100**, 2417-2423.
- Newell M.K., Haughn L.J., Maroun C.R.&Julius M.H. (1990) Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* **347**, 286-289.

- Nozaki Y., Hasegawa Y., ichiyama S., Nakashima I.&Shimokata K. (1997) Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect. Immunity* **65**, 3644-3647.
- Nussler A.&Billiar T.R. (1993) Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leuk. Biol.* **54**, 171-178.

O

- Oberg H.-H., Sanzenbacher R., Lengl-Janben B., Dobmeyer T., Flindt S., Janssen O.&Kabelitz D. (1997) Ligation of cell surface CD4 inhibits activation-induced death of human T lymphocytes at the level of Fas ligand expression. *J. Immunol.* **159**, 5742-5749.
- Oberlin E., Amara A., Bachelerie F., Bessia C., Virelizier J.-L.&Arenzana-Seisdedos O. (1996) The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**, 833-835.
- Ogasawara H., Takeda-Hirokawa N., Sekigawa I., Hashimoto H., Kanego Y.&Hirose S. (1999) Inhibitory effects of interleukin-16 on interleukin-2 production by CD4+ T cells. *Immunology* **96**, 215-219.
- Oravecz T., Pall M.&Norcross M.A. (1996) β -chemokine inhibition of monocytotropic HIV-1 infection. Interference with a postbinding fusion step. *J. Immunol.* **157**, 1329-1332.
- Ouaaz F., Ruscetti w., Dugas B., Mikovits J., Agut H., Debré P.&Mossalayi M.D. (1996) Role of IgE immune complexes in the regulation of HIV-1 replication and increased cell death of infected U1 monocytes: involvement of CD23/Fc ϵ RII-mediated nitric oxide and cyclic AMP pathways. *Molecular Medicine* **2**, 38-49.
- Oyaizu N., Adachi Y., Hashimoto F., McCloskey T.W., Hosaka N., Kayagaki N., Yagita H.&Pahwa S. (1997) Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cell apoptosis. *J. Immunol.* **158**, 2456-2463.
- Oyaizu N., McCloskey T.W., Coronesi M., Chirmule N., Kalyanaraman V.S.&Pahwa S. (1993) Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals. *Blood* **82**, 3392-3400.
- Oyaizu N., McCloskey T.W., Than S., Hu R., Kalyanaraman V.S.&Pahwa S. (1994) Cross-linking of CD4 molecules upregulates Fas antigen expression in lymphocytes by inducing interferon- γ and tumor necrosis factor- α secretion. *Blood* **84**, 2622-2631.

P

- Pantaleo G.&Perrin L. (1998) Can HIV be eradicated? *AIDS* **12**, S175-S180.
- Parada N.A., Center D.M., Kornfeld H., Rodriguez W.L., Cook J., Vallen M.&Cruikshank W.W. (1998) Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. *J. Immunol.* **160**, 2115-2120.
- Parada N.A., Cruikshank W.W., Danis H.L., Ryan T.C.&Center D.M. (1996) IL-16 and other CD4 ligand-induced migration is dependent upon protein kinase C. *Cell. Immunol.* **168**, 100-106.
- Parnes J.R. (1989) Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.* **44**, 265.
- Perelson A.S., Neumann A.U., Markowitz M., Leonard J.M.&Ho D.D. (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582-1586.

- Perno C.F., Newcomb F.M., Davis D.A., Aquaro S., Humphrey R.W., Calio R.&Yarchoan R. (1998) Relative potency of protease inhibitors in monocytes/macrophages acutely and chronically infected with human immunodeficiency virus. *J. Inf. Dis.* **178**, 413-422.
- Pietraforte D., Tritarelli E., Testa U.&Minetti M. (1994) gp120 HIV envelope glycoprotein increases the production of nitric oxide in human monocyte-derived macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **55**, 175-182.
- Pinchuk L.M., Polacino P.S., Agy M.B., Klaus S.J.&Clark E.A. (1994) The role of CD40 and CD80 accessory cell molecules in dendritic cell-dependent HIV-1 infection. *Immunity* **1**, 317-325.
- Platt E.J., Wehrly K., Kuhmann S.E., Chesebro B.&Kabat D. (1998) Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophage tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72**, 2855-2864.
- Pope M., Gezelter S., Gallo N., Hoffman L.&Steinman R.M. (1995) Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **182**, 2045-2056.
- Price A.A., Cumberbatch M., Kimber I.&Ager A. (1997) $\alpha 6$ integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J. Exp. Med.* **186**, 1725-1735.

R

- Rand T., Cruikshank W.W., Center D.M.&Weller P.F. (1991) CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil eosinophil migration. *J. Exp. Med.* **173**, 1521-1528.
- Reece J.C., Handley A.J., Anstee E.J., Morrison W.A., Crowe S.M.&Cameron P.U. (1998) HIV-1 selection by epidermal dendritic cells during transmission across human skin. *J. Exp. Med.* **187**, 1623-1631.
- Reiss C.S.&Komatsu T. (1998) Does nitric oxide play a critical role in viral infections? *J. Virol.* **72**, 4547-4551.
- Rieser C., B_ck G., Klocker H., Bartsch G.&Thurnher M. (1997) Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor α cooperate to activate human dendritic cells: Synergistic activation of interleukin-12 production. *J. Exp. Med.* **186**, 1603-1608.
- Rissoan M.-C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal Malefydt R.&Liu Y.-J. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183-1186.
- Romani N.&Schuler G. (1992) The immunologic properties of epidermal langerhans cells as part of the dendritic cells system. *Springer Semin. Immunopathol.* **13**, 265-279.
- Rumsaeng V., Cruikshank W.W.&Foster B. (1997) Human mast-cells produce the CD4(+) T-lymphocyte chemoattractant factor, IL-16. *J. Immunol.* **159**, 2904-2910.
- Russel J.H., White C.L., Loh D.Y.&Meleedy-Rey P. (1991) Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2151-2155.
- Ryan T., Cruikshank W.W., Kornfeld H., Collins T.&Center D.M. (1995) The CD4-associated tyrosine kinase p56lck is required for lymphocyte chemoattractant factor-induced T lymphocyte migration. *J. Biol. Chem.* **270**, 17081-17086.

S

- Saeki H., Moore A.M., Brown M.J.&Hwang S.T. (1999) Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J. Immunol.* **162**, 2472-2475.
- 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.
- Sakihama T., Smolyar A.&Reinherz E.L. (1995) Oligomerization of CD4 is required for stable binding to class II MHC proteins but not for interaction with human immunodeficiency virus gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6444-6448.
- Sallusto F.&Lanzavecchia A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* **179**, 1109-1118.
- Salomon B., Cohen J.L., Masurier C.&Klatzmann D. (1998) Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics. *J. Immunol.* **160**, 708-717.
- Samson M., Libert F.M., Doranz B.J., Rucker C., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti C., Lapoumeroulie J., Cognaux J., Forceille C., Muyldemans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R.J., Collman R.G., Doms R.W., Vassart G.&Parmentier M. (1996) Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-725.
- Scala E., D'offizi G., Rosso R., Turriziani O., Ferrara R., Mazzone A.M., Antonelli G., Aiuti F.&Paganelli R. (1997) C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J. Immunol.* **158**, 4485-4492.
- Scharton-Kersten T.M. (1997) Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* **185**, 1261-1273.
- Schebesch C., Kodelja V., Mÿller C., Hakij N., Bisson S., Orfanos C.E.&Goerdt S. (1997) Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4+ T cells *in vitro*. *Immunology* **92**, 478-486.
- Schmidt Mayerova H., Alfano M., Nuovo G.&Bukrinsky M. (1998) Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a post entry level. *J. Virol.* **72**, 4633-4642.
- Schmidt Mayerova H., Nottet H.S., Nuovo G., Raabe T., Flanagan C.R., Dubrovsky L., Gendelman H.E., Cerami A., Bukrinsky M.&Sherry B. (1996) Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 700-704.
- Schmidt Mayerova H., Sherry B.&Bukrinsky M. (1996) Chemokines and HIV replication. *Nature* **382**, 767.
- Schrier R.D., McCutchan A.&Wiley C.A. (1993) Mechanism of immune activation of human immunodeficiency virus in monocytes/macrophages. *J. Virol.* **67**, 5713-5720.

- Seguin M.C., Klotz F.W., Schneider I., Weir J.P., Goodbary M., Slayter M., Raney J.P., Goodbary M., Slayter M., Raney J.J., Aniagolu J.U.&Green S.J. (1994) Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon γ and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **180**, 353-358.
- Shen X.&König R. (1998) Regulation of T cell immunity and tolerance in *vivo* by CD4. *Int. Immunol.* **10**, 247-257.
- Sica A., Saccani A., Borsatti A., Power C.A., Wells T.N.C., Luini W., Polentaruti N., Sozzani S.&Mantovani A. (1997) Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J. Exp. Med.* **185**, 969-974.
- Simmons G., Reeves J.D., McKnight A., Dejucq N., Hibbitts S., Power C.A., Aarons E., Schols D., De Clercq E., Proudfoot A.E.I.&Clapham P.R. (1998) CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J. Virol.* **72**, 8453-8457.
- Singh R.K., Berry K., Matsushima K., Yasumoto K.&Fidler I.J. (1993) Synergism between human monocyte chemotactic and activating factor and bacterial products for activation of tumoricidal properties in murine macrophages. *J. Immunol.* **151**, 2786-2793.
- Snijders A., P. K., Hilkens C.M.U.&Kapsenberg M.L. (1998) High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *International Immunology* **10**, 1593-1598.
- Sozzani S., Allavena P., D'Amico G., Luini W., Bianchi G., Kataura M., Imai T., Yoshie O., Bonecchi R.&Mantovani A. (1998) Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* **161**, 1083-1086.
- Sozzani S., Ghezzi S., Iannolo G., Luini W., Borsatti A., Polentarutti N., Sica A., Locati M., MacKay C., Wells T.N.C., Biswas P., Vicenzi E., Poli G.&Mantovani A. (1998) Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J. Exp. Med.* **187**, 439-444.
- Spira A.I., Marx P.A., Patterson B.K., Mahoney J., Koup R.A., Wolinsky S.M.&Ho D.D. (1996) Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into Rhesus Macaques. *J. Exp. Med.* **183**, 215-225.
- Standiford T.J., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Greenberger M.J., Danforth J.M., Kunkel R.G.&Strieter R.M. (1995) Macrophage inflammatory protein-1 α mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. *J. Immunol.* **155**, 1515-1524.
- Steinbrink K., W_Ifl M., Jonuleit H., Knop J.&Enk A.H. (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* **159**, 4772-4780.
- Steinman R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271-296.
- Stumbles P.A., Thomas J.A., Pimm C.L., Lee P.T., Venaille T.J., Proksch S.&Holt P.G. (1998) Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J. Exp. Med.* **188**, 2019-2031.
- Süss G.&Shortman K. (1996) A subclass of dendritic cells kill CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**, 1789-1796.

T

- Tai X.-G., Toyo-oka K., Yamamoto N., Yashiro Y., Mu J., Hamaoka T.&Fujiwara H. (1997) Expression of an inducible type of nitric oxide (NO) synthase in the thymus and involment of NO in deletion of TCR-stimulated double-positive thymocytes. *J. Immunol.* **158**, 4696-4703.
- Tang A., Amagai M., Granger L.G., Stanley J.R.&Udey M.C. (1993) Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* **361**, 82-85.
- Taoufik Y., Lantz O., Wallon C., Charles A., Dussaix E.&Delfraissy J.F. (1997) Human immunodeficiency virus gp120 inhibits interleukin-12 secretion by human monocytes: an indirect interleukin-10 mediated effect. *Blood* **89**, 2842-2848.
- Than S., Oyaizu N., Tetali S., Romano J., Kaplan M.&Pahwa S. (1997) Upregulation of human immunodeficiency virus (HIV) replication by CD4 cross-linking in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected adults. *J. Virol.* **71**, 6230-6232.
- Theodore A.C., Center D.M., Nicoll J., Fine G., Kornfeld H.&Cruikshank W.W. (1996) CD4 ligand IL-16 inhibits the mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.* **157**, 1958-1964.
- Thivierge M., Le Gouill C., Tremblay M.J., Stankova J.&Rola-Pleszczynski M. (1998) Prostaglandin E₂ induces resistance to human immunodeficiency virus-1 infection in monocyte-derived macrophages: downregulation of CCR5 expression by cyclic adenosine monophosphate. *Blood* **92**, 40-45.
- Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Torre D., Ferrario G., Bonetta G., Speranza F.&Zeroli C. (1995) Production of nitric oxide from peripheral blood mononuclear cells and polymorphonuclear leukocytes of patients with HIV-1. *AIDS* **9**, 979-980.
- Torre D., Ferrario G., Speranza F., Martegani R.&Zeroli C. (1996) Increased levels of nitrite in the sera of children infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clinical Infectious Disease* **22**, 650-3.
- Tremblay M., Meloche S., Gratton S., Wainberg M.A.&Sékaly R.-P. (1994) Association of p56lck with the cytoplasmic domain of CD4 modulates HIV-1 expression. *EMBO* **13**, 774-783.
- Trinchieri G. (1997) Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr. Op. Immunol.* **9**, 17-23.
- Tsunetsugu-Yokota Y., Akagawa K., Kimoto H., Susuki K., Iwasaki M., Yasuda S., Hausser G., Hultgren C., Meyerhans A.&Takemori T. (1995) Monocyte-derived culture dendritic cells are susceptible to human immunodeficiency virus infection and transmit virus to resting T cells in the process of nominal antigen presentation. *J. Virol.* **69**, 4544-4547.
- Tucek-Szabo C.L., Andielic S., Lacy E., Elkron K.B.&Nikolic-Zugic. (1996) Surface T cell fas receptor/CD95 regulation, in vivo, activation, and apoptosis. *J. Immunol.* **156**, 192-200.
- Tuttle D.L., Harrison J.K., Anders C., Sleasman J.W.&Goodenow M.M. (1998) Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **72**, 4962-4969.

U

- Ueda H., Howard O.M.Z., Grimm M.C., Su S.B., Gong W., Evans G., Ruscetti F.W., Oppenheim J.J.& Wang J.M. (1998) HIV-1 envelope gp41 is a potent inhibitor of chemoattractant receptor expression and function in monocytes. *J. Clin. Invest.* **102**, 804-812.

V

- Vallance P.&Moncada S. (1991) Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* **337**, 776-778.
- Velde A.A., Malefijt R.W., Huijbens R.J.F., Vries J.E.D.&Figdor C.G. (1992) IL-10 stimulates monocyte Fc γ R surface expression and cytotoxic activity. *J. Immunol.* **149**, 4048.
- Verani A., Scarlatti G., Comar M., Tresoldi E., Polo S., Giacca M., Lusso P., Siccardi A.G.&Vercelli D. (1997) C-C chemokines released by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages suppress HIV-1 infection in both macrophages and T cells. *J. Exp. Med.* **185**, 805-816.
- Viney J.L., Mowat A.M., O'Malley J.M., Williamson E.&Fanger N.A. (1998) Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J. Immunol.* **160**, 5815-5825.

W

- Wahl S.M., Allen J.B., Gartner S., Orenstein J.M., Popovic M., Chenoweth D.E., Arthur L.O., Farrar W.L.&Wahl L.M. (1989) HIV-1 and its envelop glycoprotein down-regulate chemotactic ligand receptors and chemotactic function of peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **142**, 3553-3559.
- Wang J.M., Ueda H., Howard O.M., Grimm M.C., Chertov O., Gong X., Resau J.H., Broder C.C., Evans G., Arthur L.O., Ruscetti F.W.&Oppenheim J.J. (1998) HIV-1 envelope gp120 inhibits the monocyte response to chemokines through CD4 signal-dependent chemokine receptor down-regulation. *J. Immunol.* **161**, 4309-4317.
- Weissman D., Daucher J., Barker T., Adelsberger J., Baseler M.&Fauci A.S. (1996) Cytokine regulation of HIV replication induced by dendritic cell-CD4 positive T cell interactions. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **12**, 759-767.
- Weissman D.&Fauci A.S. (1997) Role of dendritic cells in immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin. Micro. Rev.* **10**, 358-367.
- Weissman D., Li Y., Orenstein J.M.&Fauci A.S. (1995) Both a precursor and a mature population of dendritic cells can bind HIV. *J. Immunol.* **155**, 4111-4117.
- Westendorp M.O., Rainer F., Ochssenbauer C., Stricker K., Dhein J., Walczak H., Debatin K.-M.&Krammer P.H. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 tat and gp120. *Nature* **375**, 497-500.
- Williams M.S., Noguchi S., Henkart P.A.&Osawa Y. (1998) Nitric oxide synthase plays a signaling role in TCR-triggered apoptotic death. *J. Immunol.* **161**, 6526-6531.
- Wink D.A.&Mitchell J.B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.* **25**, 434-456.
- Winzler C., Rovere P., Rescigno M., Citterio S., Granucci F., Mutini C., Adorini L., Penna G., Delia D., Zimmermann V.S., Davoust J.&Ricciardi-Castagnoli P. (1997) Maturational stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* **185**, 317-328.

- Wodarz D., Llotd A.L., Jansen V.A.A.&Nowak M.A. (1999) Dynamics of macrophage and T cell infection by HIV. *J. Theo. Biol.* **196**, 101-113.
- Wu D.M.H., Zhang Y., Parada N.A., Kornfeld H., Nicoll J., Center D.M.&Cruikshank W.W. (1999) Processing and release of IL-16 from CD4+ but not CD8+ T cells is activation dependent. *J. Immunol.* **162**, 1287-1293.
- Wu L., Paxton W.A., Kassam N., Ruffing N., Rottman J.B., Sullivan N., Choe H., Sodroski J., Newman W., Koup R.A.&MacKay C.R. (1997) CCR5 levels and expression pattern correlates with infectability by macrophages-tropic HIV-1 in vitro. *J. Exp. Med.* **185**, 1681-1691.
- Wyatt R.&Sodroski J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888.
- Wyatt R., Kwong P.D., Desjardins E., Sweet R.W., Robinson J., Hendrickson W.A.&Sodroski J.G. (1998) The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-711.

Z

- Zacharchuk C.M., Mercep M., Chakraborti P.K., Simons S.S.J.&Ashwell J.D. (1990) Programmed T lymphocyte death. Cell activation- and steroid-induced pathways are mutually antagonistic. *J. Immunol.* **146**, 4037-4045.
- Zack J.A., Arrigo S.J., Weitsman S.R., Go A.S., Haislip A.&Chen I.S. (1990) HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile latent viral structure. *Cell* **61**, 213-222.
- Zaitseva M., Blauvelt A., Lee S., Lapham C.K., Klaus-kovtun V., Mostowski H., Manischewitz J.&Golding H. (1997) Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nature Medicine* **3**, 1369-1375.
- Zangerle R., Fuchs D., Reibnegger G., Werner-Felmayer G., Gallati H., Wachter H.&Werner E.R. (1995) Serum nitrite plus nitrate in infection with human immunodeficiency virus type-1. *Immunobiology* **193**, 59-70.
- Zembala M.&Asherson G.L. (1989) Human monocytes. *Academic press, New York*
- Zhang Y., Center D.M., Wu D.M.H., Cruikshank W.W., Yuan J., Andrews D.W.&Kornfeld H. (1998) Processing and activation of pro-interleukin-16 by Caspase-3. *J. Biol. Chem.* **273**, 1144-1149.
- Zhang X., Piatier-Tonneau D., Auffray C., Murali R., Mahapatra A., Zhang F., Maier C.C., saragovi H.&green M.I. (1996) Synthetic CD4 exocyclic peptides antagonize CD4 holoreceptor binding and T cell activation. *Nat. Biotechnol.* **14**, 472-475.
- Zhou P., Goldstein S., Devadas K., Tewari D.&Notkins A.L. (1997) Human CD4+ cells transfected with Il-16 cDNA are resistant to HIV-1 infection: inhibition of mRNA expression. *Nature Medicine* **3**, 659-670.
- Zidek Z.&Masek K. (1998) Erratic behavior of nitric oxide within the immune system: illustrative review of conflicting data and their immunopharmacological aspects. *Int. J. Immunopharmacol.* **20**, 319-343.
- Zybarth G., Reiling N., Schmidtmayerova H., Sherry B.&Bukrinsky M. (1999) Activation-induced resistance of human macrophages to HIV-1 infection in vitro. *J. Immunol.* **162**, 400-406.

Publications faisant l'objet de la thèse.

Truong MJ, Darcissac E, **Hermann E**, Dewulf J, Loyens M, Capron A, Bahr GM. Interleukin-16 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages and dendritic cells. (*J. Virol.*, in press).

Hermann E, Darcissac E, Idziorek T, Capron A, Bahr GM. Recombinant Interleukin-16 selectively modulate surface receptor expression and cytokine release in macrophages and dendritic cells. *Immunology* (sous presse)

Idziorek T, Khalife J, Billaut-Mulot O, **Hermann E**, Aumercier M, Mouton Y, Capron A, Bahr GM. Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death (AICD). *Clin Exp Immunol.* 1998 Apr; **112**(1): 84-91.

Hermann E, Idziorek T, Kusnierz JP, Mouton Y, Capron A, Bahr GM. Role of nitric oxide in the regulation of lymphocyte apoptosis and HIV-1 replication. *Int J Immunopharmacol.* 1997 Jul; **19**(7): 387-397.

Idziorek T, Khalife J, Billaut-Mulot O, **Hermann E**, Aumercier M, Mouton Y, Capron A, Bahr GM. Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death (AICD). *Immunology*, 1997, **92**, supp 1, pp4. abstract.

Hermann E, Idziorek T, Kusnierz JP, Mouton Y, Capron A, Bahr GM. Role of nitric oxide in the regulation of lymphocyte apoptosis and HIV-1 replication. *Immunology*, 1997, **92**, supp 1, pp2. abstract.

Autres travaux de recherche.

Ban E, Dupré L, **Hermann E**, Vendeville C, Quatannens B, Capron A, Riveau G. Activation of dendritic cells by oligonucleotides containing the CpG motif. (Manuscrit en préparation).

Communications.

Hermann E, Darcissac E, Idziorek T, Capron A, Bahr GM. Recombinant Interleukin-16 selectively modulate surface receptor expression and cytokine release in macrophages and dendritic cells. Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie, Palais de l'UNESCO, Paris, France nov. 98.

MJ Truong, E Darcissac, E Hermann, J Dewulf, A Capron, GM Bahr. Human rIL-16 exerts potent HIV-suppressing activity in acutely-infected-reservoir cells.
12Th World AIDS Conference, Genève, Suisse,

E Baert, E Hermann, J Dewulf, T Idziorek. Glucocorticoid hormone is the major inducer of cell death in CD4+ T lymphocytes in asymptomatic HIV-infected subjects.
12Th World AIDS Conference, Genève, Suisse, 28 June-3 July 1998

Idziorek T, Khalife J, Billaut-Mulot O, Hermann E, Aumercier M, Mouton Y, Capron A, Bahr GM. Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death (AICD).

5Th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, February 1-5, 1998, Chicago, IL

Hermann E, Idziorek T, Kusnierz JP, Mouton Y, Capron A, Bahr GM.

Role of nitric oxide in the regulation of lymphocyte apoptosis and HIV-1 replication.

5th annual congress of the British Society for Immunology, Brighton, UK, 2-5 dec 1997.

Idziorek T, Khalife J, Billaut-Mulot O, Hermann E, Aumercier M, Mouton Y, Capron A, Bahr GM. Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death (AICD).

5th annual congress of the British Society for Immunology, Brighton, UK, 2-5 dec 1997.

Hermann E, Idziorek T, Kusnierz JP, Mouton Y, Capron A, Bahr GM.

Role du monoxyde d'azote dans la régulation de la réplication du VIH-1 et de l'apoptose des lymphocytes.

Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie, Palais du Pharo, Marseille, France 26-28 nov 97.

Idziorek T, Khalife J, Billaut-Mulot O, Hermann E, Aumercier M, Mouton Y, Capron A, Bahr GM. Rôle inhibiteur de l'interleukine-16 sur la réplication du VIH-1 dans des cellules T et la mort cellulaire programmée (apoptose) induite par l'activation.

Congrès annuel de la Société Française d'Immunologie, Palais du Pharo, Marseille, France 26-28 nov 97.

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| RESUME | 5 |
| SUMMARY | 6 |
| LISTE DES ABBREVIATIONS | 7 |
| INTRODUCTION | 8 |
| AVANT-PROPOS | 9 |
| I) Les cellules présentatrices d'antigène | 12 |
| A) Les monocytes/macrophages | 12 |
| 1) <i>La migration</i> | |
| 2) <i>Régulation de la différenciation</i> | |
| 3) <i>Activité immunomodulatrices des macrophages</i> | |
| B) Les cellules dendritiques | 15 |
| 1) <i>Les cellules de Langerhans</i> | |
| 2) <i>Le processus de maturation</i> | |
| 3) <i>Contrôle de la réponse cellulaire T</i> | |
| C) Les molécules costimulatrices | 22 |
| II NO: une molécule effective du système immunitaire | 24 |
| A) La NO-synthase | 24 |
| B) Régulation de la synthèse du monoxyde d'azote | 26 |
| C) NO° et immunité | 27 |
| 1) <i>Modulation de l'activation des cellules T</i> | |
| 2) <i>L'apoptose</i> | |
| 3) <i>Activité bactéricide et tumoricide.</i> | |
| 4) <i>activité anti virale.</i> | |
| III L'infection par le VIH | 32 |
| A) Généralités | 32 |
| B) Fixation à la cellule cible | 33 |
| C) Cellules cibles du VIH | 34 |
| 1) <i>Les cellules T</i> | |
| 2) <i>Les cellules dendritiques</i> | |
| 3) <i>Les monocytes/macrophages</i> | |
| D) Modulation de la multiplication virale | 40 |

| | |
|---|----|
| IV L'immunopathogénèse du VIH | 42 |
| A) La mort cellulaire programmée | 42 |
| 1) Généralités | |
| 2) L'interaction Fas/Fas-ligand | |
| 3) Apoptose ou mort cellulaire programmée dans l'infection par le VIH | |
| 4) Modulation de l'apoptose par la ligation de CD4 | |
| B) Le monoxyde d'azote dans l'infection par le VIH | 47 |
| V) L'IL-16: le ligand naturel de CD4 | 49 |
| A) La molécule CD4 | 49 |
| B) L'IL-16 | 50 |
| 1) Origine cellulaire | |
| 2) Structure | |
| 3) Activation cellulaire | |
| a) Signaux intracellulaires | |
| b) IL-16 et chimiotactisme | |
| c) IL-16 et activation cellulaire | |
| C) IL-16 et VIH | 54 |
| OBJECTIFS | 57 |
| RESULTATS 1 | 61 |
| (Recombinant Interleukin-16 modulate surface receptors expression and cytokine release in macrophages and dendritic cells.) | |
| Objectifs | 62 |
| Résultats | 62 |
| Article 1 | 64 |
| Résultats complémentaires | 90 |
| RESULTATS 2 | 94 |
| (L'interleukine-16 inhibe la réplication du VIH-1 dans les macrophages et les cellules dendritiques.) | |
| Objectifs | 95 |
| Matériels et méthodes | 95 |
| Résultats et discussion | 96 |

| | |
|--|------------|
| RESULTATS 3 | 101 |
| (Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death(AICD).) | |
| <u>Objectifs</u> | 102 |
| <u>Résultats</u> | 102 |
| <u>Article 3</u> | 104 |
| | |
| RESULTATS 4 | 112 |
| (Role of nitric oxide in the regulation of lymphocyte apoptosis and HIV-1 replication) | |
| <u>Objectifs</u> | 113 |
| <u>Mise au point et résultats</u> | 113 |
| <u>Article 4</u> | 119 |
| | |
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 129 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 150 |
| | |
| PUBLICATIONS | 171 |

