

Université du Québec

**Thèse présentée à
l'INRS-Institut Armand-Frappier comme
exigence partielle du doctorat en virologie et immunologie**

par

Latifa BOUHDOUN

**Anergie, via le TCR, des CTL CD4⁺ lors de l'infection
au VIH-1 : caractérisation des mécanismes moléculaires
associés à l'anergie**

Août 2002

*À mon très cher père, à ma très chère mère,
à ma très chère fille Hanane,
à ma famille*

TABLE DES MATIÈRES

	page
TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
SOMMAIRE	xiv
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	6
1- VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH)	7
1-1 Classification	7
1-2 Progression de l'infection au VIH-1	7
1-3 Structure et organisation génomique du VIH-1	11
1-4 Récepteurs cellulaires du VIH-1	15
1-5 Tropisme cellulaire du VIH-1	15
1-6 Glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1	16
1-7 Cycle de vie du VIH-1	17
1-7.1 Établissement de l'infection	17
1-7.1.1 Fixation de la gp120 du VIH-1 au récepteur CD4 et pénétration du virus	17
1-7.1.2 Transcription inverse et intégration du génome viral	18
1-7.2 Expression du virus au cours de l'infection	21
1-7.2.1 Événements précoces de l'expression virale	21
1-7.2.1.1 Facteurs cellulaires impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes du VIH-1	22
1-7.2.2 Événements tardifs de l'expression du virus	23
1-8 Cytopathogénicité et effets cytopathogéniques du VIH-1	24
2- RÉPONSES IMMUNITAIRES À L'INFECTION AU VIH-1	26
2-1 Réponse humorale	26
2-2 Réponse cellulaire	27
2-2.1 Réponse des lymphocytes T auxiliaires CD4 ⁺	28
2-2.2 Réponses des lymphocytes T cytotoxiques au VIH-1	29
3- MÉCANISMES D'ÉCHAPPEMENT DU VIH-1 À LA RÉPONSE CTL	33
3-1 Variabilité génétique du VIH-1	33
3-1.1 Délétion de l'épitope CTL	33

3-1.2	Perte de la capacité de présentation de l'épitope CTL par les molécules du CMH	33
3-1.3	Perte ou altération de la reconnaissance du complexe épitope/CMH par le TCR	34
3-2	Autres mécanismes d'échappement du VIH-1 à la réponse CTL	38
4-	ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T	39
4-1	Le complexe TCR/CD3	39
4-1.1	Le motif ITAM ; structure de base pour la transduction du signal du TCR	40
4-1.2	Co-récepteurs CD4, CD8, et CD28	41
4-2	Transduction des signaux à partir du TCR lors de l'activation des lymphocytes T	45
4-2.1	PTK impliquées dans la signalisation du TCR	45
4-2.1.1	PTK de la famille Src et leur régulation	45
4-2.1.2	Les PTK de la famille Syk	50
4-2.1.2.1	Régulation de Zap-70 par les PTK de la famille Src	50
4-2.2	Cascades précoces de la transduction du signal à partir du TCR	54
4-2.3	Cascades tardives de la transduction du signal à partir du TCR	60
4-2.3.1	Cascades de signalisation dépendantes de la PLC γ 1	60
4-2.3.2	Cascades d'activation des MAP kinases	60
4-2.3.2.1	Cascade d'activation des MAP kinases Erk	61
4-2.3.2.2	Cascade d'activation de la MAP kinase JNK	62
4-3	Cascades de co-signalisation via le récepteur CD28	65
4-4	Activation du promoteur du gène codant pour l'IL-2	67
4-4.1	Facteurs de transcription cellulaire	67
4-4.2	Activation des facteurs de transcription cellulaire	70
5-	ANERGIE DES LYMPHOCYTES T	72
5-1	Anergie des cellules T par absence de co-stimulation	72
5-2	Anergie des cellules T par les APL agonistes partiels	77
	MATÉRIEL ET MÉTHODES	79
1-	CLONE CELLULAIRE Ee217	80
1-1	Caractérisation du clone cellulaire Ee217	80
1-2	Propagation des cellules Ee217	82
1-2.1	Conditions de culture	82
1-2.1.1	Préparation des PBMC	82
1-2.1.2	Procédure de stimulation et de propagation des cellules Ee217	82
2-	LES FIBROBLASTES L164.8 HLA-DR4⁺ UTILISÉS COMME APC	83
3-	PEPTIDES SYNTHÉTIQUES; SYNTHÈSE ET PURIFICATION	84

4-	TEST DE PROLIFÉRATION PAR INCORPORATION DE LA THYMIDINE TRITIÉE (^3H TDR)	85
5-	TEST DE CYTOTOXICITÉ	86
6-	TEST D'INDUCTION D'ANERGIE DES CELLULES Een217 PAR LES PEPTIDES SYNTHÉTIQUES DÉRIVÉS DE LA GP120 DE DIFFÉRENTES SOUCHES DU VIH-1	87
7-	TEST DE STIMULATION DES CELLULES Een217 AVEC LES ACM ANTI-CD3 \oplus ANTI-CD28	88
8-	TEST D'INDUCTION D'ANERGIE DES CELLULES Een217 PAR L'ACM ANTI-CD3 IMMOBILISÉ	89
9-	TESTS DE RÉVERSION ET DE PRÉVENTION DE L'ETAT D'ANERGIE PAR L'IL-2hr EXOGÈNE	90
9-1	Réversion de l'état d'anergie	90
9-2	Prévention de l'état d'anergie	90
10-	NIVEAU DE PRODUCTION DE L'IL-2 PAR LES CELLULES EEN217	91
11-	ANALYSE DU NIVEAU D'EXPRESSION DES RÉCEPTEURS CELLULAIRES DE SURFACE PAR CYTOMÉTRIE DE FLUX	92
12-	IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA PTK ZAP-70 DES CELLULES Een217 ET ANALYSE PAR IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN (WESTERN BLOT)	93
12-1	Stimulation et lyse des cellules Een217	93
12-2	Immunoprécipitation et analyse par Western blot	94
13-	PRÉCIPITATION, A PARTIR DES CELLULES Een217, DES CHAÎNES ζ TYROSINE PHOSPHORYLÉES DU TCR EN PRÉSENCE DE LA PROTÉINE DE FUSION GST-ZAP(SH2) ₂	96
13-1	Préparation de la protéine de fusion GST-Zap(SH2) ₂	96
13-2	Précipitation des chaînes ζ tyrosine phosphorylées	96
14-	ACTIVITÉ KINASE DE JNK	97

RÉSULTATS		99
1-	PEPTIDES DÉRIVÉS DE LA GP120 DE VARIANTS DU VIH-1 CAPABLES D'INDUIRE L'ANERGIE DE CTL SPÉCIFIQUES	100
1-1	Réponses fonctionnelles des cellules Een217 à la stimulation avec les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1	100
1-1.1	Prolifération	100
1-1.2	Activité cytotoxique des cellules Een217	105
1-2	Anergie des cellules Een217 induite par le peptide variant HXB2	108
1-3	Inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Een217 rendues anergiques par le peptide variant HXB2 en réponse au peptide agoniste PV22	111
1-4	Analyse phénotypique par cytométrie de flux, des cellules Een217 stimulées avec le peptide agoniste et les peptides variants	114
1-4.1	Expression du récepteur TCR/CD3 et du récepteur CD4	114
1-4.2	Induction de l'expression du récepteur CD25 de l'IL-2	118
2-	ÉVÉNEMENTS PRÉCOCES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL INDUITS PAR LES PEPTIDES DÉRIVÉS DE LA GP120 DE DIFFÉRENTES SOUCHES DU VIH-1	121
2-1	Profil de phosphorylation des chaînes ζ du TCR et de la PTK Zap-70 dans les cellules Een217 stimulées avec le peptide agoniste PV22 et avec le peptide variant anergique HXB2	121
2-1.1	Co-précipitation de la PTK Zap-70 et des chaînes ζ du TCR	121
2-1.2	Précipitations des chaînes ζ phosphorylées du TCR en présence de la protéine de fusion GST-Zap(SH2) ₂	125
2-2	Réduction de la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 dans les cellules Een217 pré-traitées avec le peptide variant anergique HXB2	128
3-	PRÉVENTION ET RÉVERSION, PAR L'IL-2 EXOGÈNE, DE L'ETAT D'ANERGIE DES CELLULES EEN217 INDUITE PAR LE PEPTIDE VARIANT HXB2	131
3-1	Prévention de l'anergie des cellules Een217 par l'IL-2 exogène	131
3-2	Réversion de l'anergie des cellules Een217 par l'IL-2 exogène	132

4-	ANERGIE DES CELLULES E_{en}217 INDUITE PAR ABSENCE DE CO-STIMULATION	135
4-1	Activation et prolifération des cellules E _{en} 217 en réponse à la stimulation avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28	135
4-2	Induction de l'anergie des cellules E _{en} 217 par l'AcM anti-CD3	136
4-3	Inhibition de la prolifération des cellules E _{en} 217, pré-traitées avec l'AcM anti-CD3, en réponse à la stimulation par le peptide agoniste PV22	139
4-4	Inhibition de la prolifération des cellules E _{en} 217 pré-traitées avec le variant anergique HXB2 en réponse à la stimulation par les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28	139
4-5	Inhibition de l'activité cytotoxique des cellules E _{en} 217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 en réponse au peptide agoniste PV22	143
5-	PRÉVENTION ET RÉVERSION, PAR L'IL-2EXOGENÈ, DE L'ANERGIE DES CELLULES E_{en}217 INDUITE PAR ABSENCE DE CO-STIMULATION	146
6-	INDUCTION DE L'EXPRESSION DU RÉCEPTEUR CD25 DE L'IL-2 DANS LES CELLULES E_{en}217 RENDUES ANERGIQUES PAR L'ACM ANTI-CD3 ET STIMULÉES AVEC LE PEPTIDE AGONISTE PV22	149
7-	INHIBITION DE LA SÉCRÉTION DE L'IL-2 PAR LES CELLULES E_{en}217 ANERGIQUES SUITE À LA STIMULATION AVEC LE PEPTIDE AGONISTE PV22 OU AVEC LES ACM ANTI-CD3 ⊕ ANTI-CD28	152
8-	ÉVÉNEMENTS DE TRANSDUCTION DU SIGNAL INDUITS PAR LA STIMULATION MITOGÉNIQUE DES CELLULES E_{en}217 RENDUES ANERGIQUES PAR L'APL DÉRIVÉ DE LA SOUCHE HXB2 OU PAR L'ACM ANTI-CD3	155
8-1	Restauration de la phosphorylation de la PTK Zap-70, des chaînes ζ du TCR et ε du CD3 dans les cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22	155
8-1.1	Immunoprécipitation de Zap-70	155
8-1.2	Précipitations des chaînes ζ du TCR et ε du CD3 en présence de la protéine de fusion GST-Zap(SH2) ₂	159

8-2	Restauration de la voie d'activation des MAP kinases Erk 1/2 dans les cellules Ee217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22	163
8-3	Réduction du niveau d'activation de la MAP kinase JNK dans les cellules Ee217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22	167
DISCUSSION		171
1-	ANERGIE VIA LE TCR DES CTL CD4⁺ PAR UN PEPTIDE DÉRIVÉ D'UN VARIANT DU VIH-1	172
2-	MÉCANISMES MOLÉCULAIRES RESPONSABLES DE L'ANERGIE DES CELLULES T	179
CONCLUSIONS		189
REMERCIEMENTS		193
RÉFÉRENCES		195
ANNEXE		246

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	L'infection associée au VIH-1: relation entre la fonction immune et la charge virale	9
Figure 2 :	Représentation schématique de la coupe transversale du VIH-1	13
Figure 3 :	Représentation schématique de la structure secondaire de la glycoprotéine de surface gp120, du VIH-1 HX10	19
Figure 4 :	Cartographie des épitopes reconnus par les CTL dans les produits des gènes du VIH-1	31
Figure 5 :	Structure du complexe TCR/CD3 et des molécules accessoires	43
Figure 6 :	Structure de la PTK Lck de la famille Src	48
Figure 7 :	Structure de la PTK Zap-70 de la famille Syk	52
Figure 8 :	Représentation schématique des événements précoces de la transduction du signal du TCR	56
Figure 9 :	Représentation schématique des cascades d'activation de Ras et de la PLC γ 1	58
Figure 10 :	Représentation schématique des cascades d'activation des MAP kinases Erk 1/2 et JNK	63
Figure 11 :	Structure du promoteur de l'IL-2	68
Figure 12 :	Règles d'activation des lymphocytes T et modèles d'anergie clonale	75
Figure 13 :	Séquence de l'épitope spécifique aux cellules Ee217 au niveau de la gp120 du VIH-1 PV22	81
Figure 14 :	Prolifération des cellules Ee217 en réponse aux peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1	103
Figure 15 :	Activité cytotoxique des cellules Ee217 dirigée contre les cellules cibles présentant les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1	106

Figure 16 :	Induction de l'anergie des cellules Een217 par le peptide variant dérivé de la souche HXB2 du VIH-1	109
Figure 17 :	Inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Een217 rendues anergiques par le peptide variant HXB2 en réponse au peptide agoniste PV22	112
Figure 18 :	Niveaux d'expression des récepteurs TCR/CD3 et CD4 à la surface des cellules Een217 stimulées avec les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1	116
Figure 19 :	Induction de l'expression du récepteur CD25 par les cellules Een217 stimulées avec les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1	119
Figure 20 :	Niveau de phosphorylation de la PTK Zap-70 et son association avec les chaînes ζ du TCR dans les cellules Een217 stimulées avec les peptides dérivés des souches virales PV22 et HXB2 du VIH-1	123
Figure 21 :	Précipitation des chaînes ζ phosphorylées du TCR en présence de la protéine de fusion GST-Zap(SH2) ₂ , dans les cellules Een217 stimulées avec les peptides dérivés des souches virales PV22 et HXB2 du VIH-1	126
Figure 22 :	Réduction de la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 dans les cellules Een217 rendues anergiques avec le peptide variant HXB2	129
Figure 23 :	Prévention et réversion par l'IL-2 exogène, de l'état d'anergie des cellules Een217 induite par le peptide variant HXB2	133
Figure 24 :	A : Prolifération des cellules Een217 en réponse à la stimulation avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28. B : Induction de l'anergie des cellules Een217 par stimulation avec l'AcM anti-CD3	137
Figure 25 :	A : Inhibition de la prolifération des cellules Een217 pré-traitées avec l'AcM anti-CD3 en réponse au peptide agoniste PV22. B : Inhibition de la prolifération des cellules Een217 pré-traitées avec le peptide variant anergique HXB2 en réponse à la stimulation par les AcM	141
Figure 26 :	Inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 en réponse au peptide agoniste PV22	144
Figure 27 :	Prévention et réversion, par l'IL-2 exogène, de l'anergie des cellules Een217 induite par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant anergique HXB2	147

Figure 28 :	Mesure de l'IL-2 secrétée par les cellules Een217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant HXB2, suite la stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22	153
Figure 29 :	Niveau de phosphorylation de la PTK Zap-70, dans les cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant HXB2, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM	157
Figure 30 :	Niveau de phosphorylation des chaînes ζ du TCR et des chaînes ϵ du CD3, dans les cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant HXB2, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM	161
Figure 31 :	Niveau d'activation des MAP kinases Erk 1/2, dans les cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant HXB2, suite à la stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22	165
Figure 32 :	Niveau d'activation de la MAP kinase JNK dans les cellules Een217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM	169
Figure 33 :	Modèle pour expliquer les mécanismes moléculaires, au niveau des événements de transduction du signal du TCR, responsables de l'anergie des cellules T	187

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples documentés de variants naturels présentant des mutations dans les épitopes CTL	36
Tableau 2 : Séquences en acides aminés des peptides utilisés dans cette étude et leur capacité relative d'induire la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules Een217	101
Tableau 3 : Induction de l'expression du récepteur CD25 à la surface des cellules Een217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22	150

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μCi	micro Curie (10^{-6} Curie)
a.a	acide aminé
Ac	anticorps
AcM	anticorps monoclonal
ADCC	"Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity" ; cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
Ag	antigène
APC	"Antigen Presenting Cell" ; cellule présentatrice de l'antigène
APL	"Altered Peptide Ligand" ; ligand peptidique altéré
ATP	adenosine triphosphate
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
cpm	coups par minute
CTL	"Cytotoxic T lymphocyte" ; lymphocyte T-cytotoxique
EBV	virus d'Epstein-Barr
<i>env</i>	gène codant pour les glycoprotéines de l'enveloppe
<i>gag</i>	antigène spécifique du groupe
gp	glycoprotéine
GST	glutathione S-transférase
GTP	guanosine triphosphate
HLA	antigène de leukocytes humains
HTLV	virus de la leucémie des cellules T humaines
Ig	immunoglobuline
IL-2hr	interleukine-2 humaine recombinante
INF	interféron
ITAM	"Immunoreceptor tyrosine-based activation motif" ; motif responsable de la transduction du signal d'activation des lymphocytes T
I κ B	"Inhibitory kappa B protein" ; protéine inhibitrice kappa B

kDa	kilo Dalton (10^3 Dalton)
LTR	"Long terminal repeat" ; longue répétition terminale
MAP	"Mitogen-activated protein" ; protéine activée par un mitogène
MFI	"Mean fluorescence intensity" ; moyenne de l'intensité de fluorescence
NF- κ B	"Nuclear kappa B transcription factor" ; facteur nucléaire de transcription kappa B
NF-AT	"Nuclear factor of activated T cells" ; facteur nucléaire des cellules T activées
NK	"Natural killer" ; cellule tueuse naturelle
PBMC	"Peripheral blood mononuclear cells" ; cellules mononucléaires du sang périphérique
PHA	phytohémagglutinine
<i>pol</i>	gène codant pour la transcriptase inverse, protéase, intégrase et ribonucléase
PTK	protéine tyrosine kinase
PTPase	phosphatase
<i>rev</i>	gène codant pour la protéine Rev qui régule l'expression des protéines du virion
RNase H	ribonucléase H
RRE	"Rev responsive element" ; site de fixation de la protéine Rev
SH2	"src homology-2 domains", domaine d'homologie des PTK de la famille src
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
TAR	"Tat transactivating region" ; région transactivée par la protéine Tat
<i>tat</i>	gène codant pour la protéine Tat transactivateur du promoteur viral LTR
TCR	"T cell antigen receptor" ; récepteur pour l'antigène des cellules T
TH	"T Helper cell" ; lymphocyte T-auxiliaire
TNF	"Tumor Necrosis Factor" ; facteur de nécrose de tumeur
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

Sommaire

L'infection au VIH-1 déclenche une forte réponse CTL spécifique. Cette réponse CTL, efficace durant le stade précoce de l'infection, diminue avec la progression de celle-ci et est incapable d'éliminer les virus, en particulier ceux (variants viraux) qui émergent durant les stades avancés de l'infection.

L'extrême diversité génétique du VIH-1 est le facteur majeur qui contribue à l'échappement du virus à la pression exercée par la réponse CTL, et ce par différentes stratégies. En effet, la variabilité des épitopes CTL immunodominants peut entraîner la perte et/ou l'altération de leur reconnaissance par les CTL spécifiques et par conséquent, l'antagonisme de l'activation des CTL par l'épitope original. Cet antagonisme pourrait être à l'origine de la persistance d'un large spectre de variants de VIH-1 chez les individus infectés.

La variabilité génétique du VIH-1 et le fait que certains APL agonistes partiels (ligands peptidiques altérés) sont capables d'induire l'anergie des lymphocytes T CD4⁺ via le TCR, étaient à l'origine de notre projet de recherche qui consistait en la caractérisation des mécanismes moléculaires responsables de l'anergie des cellules T CD4⁺ dans le cas de l'infection au VIH-1. Plus précisément, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, à déterminer l'effet des peptides dérivés de différentes souches de VIH-1 sur la capacité de prolifération et sur l'activité cytotoxique des CTL CD4⁺ (clone Ee217) spécifiques à un épitope de la glycoprotéine de l'enveloppe, la gp120 de la souche sauvage PV22. Ainsi, nous avons montré que le peptide variant dérivé de la souche virale HXB2 est capable d'induire l'anergie des CTL Ee217 en inhibant 95 % de leur capacité de prolifération en réponse à leur peptide agoniste PV22. Le peptide variant anergique HXB2 inhibe également l'activité cytotoxique des CTL Ee217 dirigée normalement contre le peptide agoniste PV22. Ces inhibitions sont dues à la capacité du peptide variant anergique HXB2 à induire des événements précoces modifiés de transduction du signal du TCR, soit la phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR et leur association avec la PTK Zap-70 non-phosphorylée et inactive. Ces événements modifiés sont caractéristiques des APL inducteurs d'anergie. Ces résultats révèlent, pour la première fois, l'existence d'un peptide dérivé d'un variant naturel du VIH-1 capable d'induire l'anergie clonale des CTL CD4⁺ spécifiques au VIH-1. Cette démonstration suggère l'induction de l'anergie des CTL via le TCR, par les variants du VIH-1, comme un des mécanismes utilisés par le virus pour échapper à la réponse CTL *in vivo*. L'état d'anergie des CTL Ee217 induite par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 est réversible par l'IL-2 humaine recombinante exogène, supportant ainsi l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la sécrétion de l'IL-2 est à la base de l'état d'anergie des CTL CD4⁺.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des mécanismes moléculaires responsables de l'anergie des cellules T en comparant deux modèles d'anergie induits dans les CTL Ee217 anti-VIH-1. Ainsi, nous avons montré que les CTL Ee217 rendues anergiques, soit par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 via le TCR, soit par l'absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3, sont

phénotypiquement identiques sur le plan fonctionnel. En effet dans les deux modèles, les cellules anergiques ne secrètent pas l'IL-2, et ne présentent aucune activité cytotoxique dirigée contre le peptide agoniste PV22. L'examen des événements précoces et tardifs de transduction du signal nous a permis de montrer l'existence de différents mécanismes moléculaires responsables du maintien de l'anergie des cellules T. En effet, la stimulation avec le peptide agoniste PV22 des CTL Eén217 rendues anergiques par absence de co-stimulation, permet la restauration de certains événements de signalisation tels que la phosphorylation normale des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3, la phosphorylation de la PTK Zap-70 ainsi que l'activation des MAP kinases Erk 1/2. Par contre, l'activité kinase de la MAP kinase JNK demeure réprimée. Cette répression explique l'incapacité de ces cellules anergiques à sécréter l'IL-2 et à proliférer suite à la stimulation productive. La stimulation avec le peptide agoniste PV22 des CTL Eén217 rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 ne permet ni l'activation de la PTK Zap-70 qui reste associée aux chaînes ζ du TCR partiellement phosphorylées, ni l'activation des MAP kinases Erk 1/2 et JNK. Ceci prouve que l'APL dérivé de la souche virale HXB2 induit l'anergie des CTL Eén217 via le TCR, en inhibant l'activation de la PTK Zap-70 entraînant ainsi l'inhibition des cascades de signalisations tardives essentielles pour l'activation des facteurs de transcription du gène de l'IL-2. La PTK Zap-70 serait maintenue sous forme inactive par une phosphatase telle que CD45 ou SHP-1.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats en plus d'apporter les réponses ci-dessus, soulève ainsi de nouvelles questions, mais en particulier celles qui visent à caractériser les facteurs responsables de l'inhibition de la transcription du gène de l'IL-2 dans les cellules anergiques, et c'est dans la perspective d'en tenir compte dans le développement d'un éventuel traitement de l'infection au VIH-1.

INTRODUCTION

Le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1) est l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Le SIDA est caractérisé par une altération profonde du système immunitaire avec une atteinte fonctionnelle précoce des lymphocytes T CD4⁺. Cependant et malgré l'altération de la fonction des lymphocytes T CD4⁺, il y a une forte augmentation des CTL spécifiques au VIH-1 durant les stades précoces de l'infection (Borrow *et al.*, 1994). Cette réponse CTL est responsable de la baisse de la charge virale durant la phase primaire de l'infection participant ainsi au maintien de l'état asymptomatique chez les individus infectés. La réponse CTL diminue, et est moins efficace avec la progression de l'infection au VIH-1 vers le stade SIDA (McMichael et Phillips, 1997).

La perte de la réponse CTL lors de l'infection est due, entre autres, à la remarquable diversité génétique du VIH-1 (Hu et Temin, 1990; Koup *et al.*, 1994). Cette diversité dépend du haut niveau de réplication du virus ainsi qu'à la faible précision de la transcriptase inverse virale (McMichael et Phillips, 1997). Certains des mécanismes par lesquels le VIH-1 échappe à la réponse CTL grâce à sa diversité génétique sont bien documentés. Ainsi, la variabilité génétique du VIH-1, en plus de mener à la délétion complète d'un épitope CTL, peut empêcher la fixation des épitopes viraux par les molécules du CMH, ou conduire à la perte ou à l'altération de la reconnaissance du complexe CMH/peptide variant par le TCR (récepteur des cellules T) des CTL spécifiques au VIH-1 (Phillips *et al.*, 1991., Koenig *et al.*, 1995., McAdam *et al.*, 1995). L'altération de la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR peut entraîner l'antagonisme de l'activation des CTL par l'épitope original permettant ainsi au VIH-1 d'échapper à la réponse CTL spécifique (Sewell *et al.*, 1997; Klenerman *et al.*, 1994, 1995; Meier *et al.*, 1995).

La stimulation productive des lymphocytes T nécessite non seulement l'engagement du TCR par le complexe CMH/peptide, mais dépend également de l'induction des signaux co-stimulateurs délivrés par les APC (June *et al.*, 1995). Le signal engendré par l'interaction du récepteur CD28 à la surface des lymphocytes T avec ses ligands (CD80/CD86) exprimés à la surface des APC est suffisant pour compléter le signal engendré par le TCR et permettre la prolifération et l'activation fonctionnelle des cellules T (Lenschow *et al.*, 1996). Il a été

démontré, dans différents systèmes expérimentaux, que la stimulation du TCR en absence de la co-stimulation du CD28 par son ligand se traduit par un état d'anergie clonale dans lequel les cellules T ne produisent pas l'IL-2 et donc ne prolifèrent pas en réponse à la stimulation mitogénique, et ce même si le signal co-stimulateur est fourni (Schwartz, 1997). L'anergie des cellules T peut aussi être induite via le TCR, par les ligands faibles tels que les APL agonistes partiels en présence même du signal co-stimulateur dérivé du CD28 (Sloan-Lancaster *et al.*, 1993). Les APL agonistes partiels sont des peptides analogues du ligand antigénique (ligand agoniste) dans lesquels le site de contact avec le TCR est modifié au niveau de leurs séquences en acides aminés sans pour autant affecter leur interaction avec les molécules du CMH ou avec le TCR (Jameson et Bevan, 1995).

Le TCR est composé de l'hétérodimère $\alpha\beta$ qui interagit avec le complexe antigène/CMH. Le TCR est associé de façon non covalente avec les dimères du complexe CD3 ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$), l'homodimère $\zeta\zeta$ et l'hétérodimère $\zeta\eta$ à la surface de la cellule (Samelson *et al.*, 1985 ; Weissman *et al.*, 1989 ; Weiss et Littman, 1994). La transduction du signal du TCR se fait par les modules conservés de signalisation ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) caractérisés par la présence de deux séquences en acides aminés Y-X-X-I/L séparées par 6-8 acides aminés variables. Les molécules ϵ , γ , et δ du CD3 contiennent chacune un seul motif ITAM, alors que la chaîne ζ contient trois motifs (Reth, 1989). Un des premiers événements détectable à la suite de la stimulation du TCR est la phosphorylation par la protéine tyrosine kinase (PTK) Lck, des chaînes ζ et du complexe CD3 sur leurs résidus tyrosine (Samelson *et al.*, 1986). La phosphorylation de deux résidus tyrosine d'un motif ITAM par Lck permet le recrutement de la PTK cytoplasmique Zap-70 au TCR qui va interagir par ses deux domaines SH2 avec les motifs ITAM phosphorylés des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 (Hatada *et al.*, 1995). Cette interaction permet à Lck d'interagir avec Zap-70 et la phosphoryler sur son résidu tyrosine en position 493, permettant ainsi l'activation catalytique de Zap-70 (Chan *et al.*, 1991, 1992 ; Kong *et al.*, 1996). Une fois que ces événements précoces se soient produits, Zap-70 activée recrute et phosphoryle divers substrats cellulaires incluant les protéines Lat et SLP-76 (Zhang *et al.*, 1998 ; Jackman *et al.*, 1995 ; Raab *et al.*, 1997 ; Wardenburg *et al.*, 1996), qui vont ensuite permettre de déclencher les voies d'activation de la protéine Ras et des MAP kinases Erk1/2,

JNK et p38 (Izquierdo *et al.*, 1993; Weiss et Littman, 1994; Rudd *et al.*, 1994; Franklin *et al.*, 1994), ainsi que la libération du calcium intracellulaire (Altman *et al.*, 1990). Ces événements conduisent à l'activation des facteurs de transcription cellulaire, tels que le NF-AT et l'AP-1 requis pour l'activation du gène codant pour l'IL-2 (Rudd, 1996). La co-stimulation du CD28 va compléter les signaux du TCR en renforçant certaines cascades de signalisation et en initiant d'autres signaux qui vont augmenter l'activation transcriptionnelle du promoteur de l'IL-2, particulièrement à travers la MAP kinase JNK requise pour la formation des complexes AP-1 (Rudd, 1996).

Bien que les événements intracellulaires déclenchés par les APL inducteurs d'anergie et les mécanismes moléculaires responsables du maintien de l'anergie des cellules T ne sont pas bien définis, certaines études incluant la nôtre, ont montré que les cellules anergiques présentent une déficience au niveau des événements précoces de signalisation nécessaire à l'induction de l'expression de l'IL-2. Ainsi, la stimulation des lymphocytes T CD4⁺ humains ou murins avec les APL agonistes partiels engendre des événements de signalisation modifiés caractérisés par la non-activation de la PTK Lck. Ceci entraîne la phosphorylation déficiente des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 et, par conséquent, le recrutement de la PTK Zap-70 non phosphorylée et inactive au complexe TCR/CD3 (Sloan-Lancaster *et al.*, 1994; Madrenas *et al.*, 1995; Migita *et al.*, 1995 ; Couture *et al.*, 1997 ; Tang *et al.*, 1998; Bouhdoud *et al.*, 2000). De plus, dans les cellules T rendues anergiques par absence de co-stimulation, la protéine Ras et les MAP kinases Erk1/2 et JNK sont inhibées (Fields *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1996), résultant ainsi dans la non-activation des facteurs de transcription cellulaire NF-AT et AP-1 nécessaires pour l'activation du gène codant pour l'IL-2. Par contre, et malgré de nombreuses recherches, il n'existe toujours pas de modèle unifiant l'ensemble des événements de signalisation responsables de l'anergie. Ceci est dû, entre autres, à la complexité des événements de signalisation induits et à l'utilisation de différents systèmes expérimentaux. Il s'agit en général les cellules T humaines versus les cellules T murines, les cellules TH1 versus les cellules TH2, les cellules T CD4⁺ versus les cellules T CD8⁺. En plus il n'existe aucune étude comparative des différents modèles d'anergie des cellules T utilisant la même lignée cellulaire pour caractériser les mécanismes moléculaires responsables de l'anergie des cellules T.

À cause de l'extrême variabilité du génome viral durant l'infection au VIH-1 et le fait que certains APL agonistes partiels peuvent induire l'anergie des cellules T via le TCR, nous avons considéré qu'il est très probable que les CTL spécifiques au VIH-1 peuvent être rendues anergiques suite à la stimulation avec les souches variantes du VIH-1. Ainsi, nous avons, d'une part, démontré, et ce pour la première fois, la capacité d'un peptide dérivé d'un variant du VIH-1 à induire l'anergie des CTL spécifiques au VIH-1 et à inhiber leur activité cytotoxique *in vitro* pour ensuite caractériser les événements de transduction du signal induit par ce variant. D'autre part, nous avons comparé, en utilisant le même système cellulaire (CTL Een217 anti-VIH-1), deux modèles d'anergie induits suite à la stimulation des cellules T avec l'APL anergique en présence de la co-stimulation ou bien avec l'AcM anti-CD3 en absence de co-stimulation. La caractérisation de ces deux modèles d'anergie nous a permis de montrer l'existence de mécanismes moléculaires distincts responsables de l'anergie des cellules T.

Objectifs de la recherche : Nous avons établi au début de notre recherche, des objectifs précis qui ont guidé la progression de nos travaux.

- Déterminer si les peptides dérivés de la gp120 de variants du VIH-1 peuvent induire l'anergie des CTL CD4⁺ du clone Een217. Ce clone CTL est spécifique pour l'épitope 410-429 de la gp120 de la souche PV22 du VIH-1.
- Caractériser les événements précoces de transduction du signal du TCR induits dans les CTL CD4⁺ stimulées par les peptides variants anergiques du VIH-1 (phosphorylation de la PTK Zap-70 et des chaînes associées au TCR).
- Étudier l'effet de l'IL-2 humaine recombinante exogène sur la réversion ou la prévention de l'anergie induite dans les CTL CD4⁺ par les peptides variants anergiques du VIH-1.
- Caractériser et comparer les activités fonctionnelles des CTL CD4⁺ rendues anergiques, par absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3 ou via le TCR par les peptides variants anergiques du VIH-1, après la stimulation productive des cellules.
- Caractériser et comparer les événements précoces et tardifs de transduction du signal du TCR induits dans les CTL CD4⁺ rendues anergiques, par absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3 ou via le TCR par les peptides variants anergiques du VIH-1, après la stimulation productive des cellules. Déterminer les mécanismes moléculaires responsables de l'anergie des cellules T dans le cas de l'infection au VIH-1.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

1-1 Classification

Le développement du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est le résultat de l'infection progressive par le VIH-1, dont le cours est affecté par l'interaction entre les facteurs viraux et les facteurs cellulaires de l'hôte (Graziosi *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 1991). Le VIH est un virus à ARN, non oncogène et cytopathogène, membre de la famille Retroviridae qui est composée de sept genres dont les Lentivirus. Le genre des Lentivirus comprend les lentivirus bovins, lentivirus équins, lentivirus félins, lentivirus ovins/caprins et les lentivirus de primates dont fait partie le VIH (Murphy *et al.*, 1995). Le VIH comprend deux sérotypes principaux, le VIH-1 et le VIH-2 (Clavel *et al.*, 1986, Coffin *et al.*, 1986). Les différences sérologiques majeures entre le VIH-1 et le VIH-2 résident principalement au niveau des glycoprotéines de l'enveloppe. Les anticorps contre le VIH-2 montrent généralement des réactions croisées avec les protéines Gag et Pol du VIH-1, mais pas avec les protéines de l'enveloppe du VIH-1 (Clavel *et al.*, 1987, Gnann *et al.*, 1987).

Les anticorps dirigés contre les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-2 montrent des réactions croisées avec les protéines de l'enveloppe des souches du virus de l'immunodéficience simien (SIV), un groupe complexe de lentivirus de primates. Certains isolats de SIV peuvent causer une maladie similaire au SIDA chez certaines espèces de primates (macaque Rhésus), alors qu'ils sont relativement non pathogéniques pour leurs espèces d'origines (singes verts d'Afrique) (Gardner et Luciw, 1989).

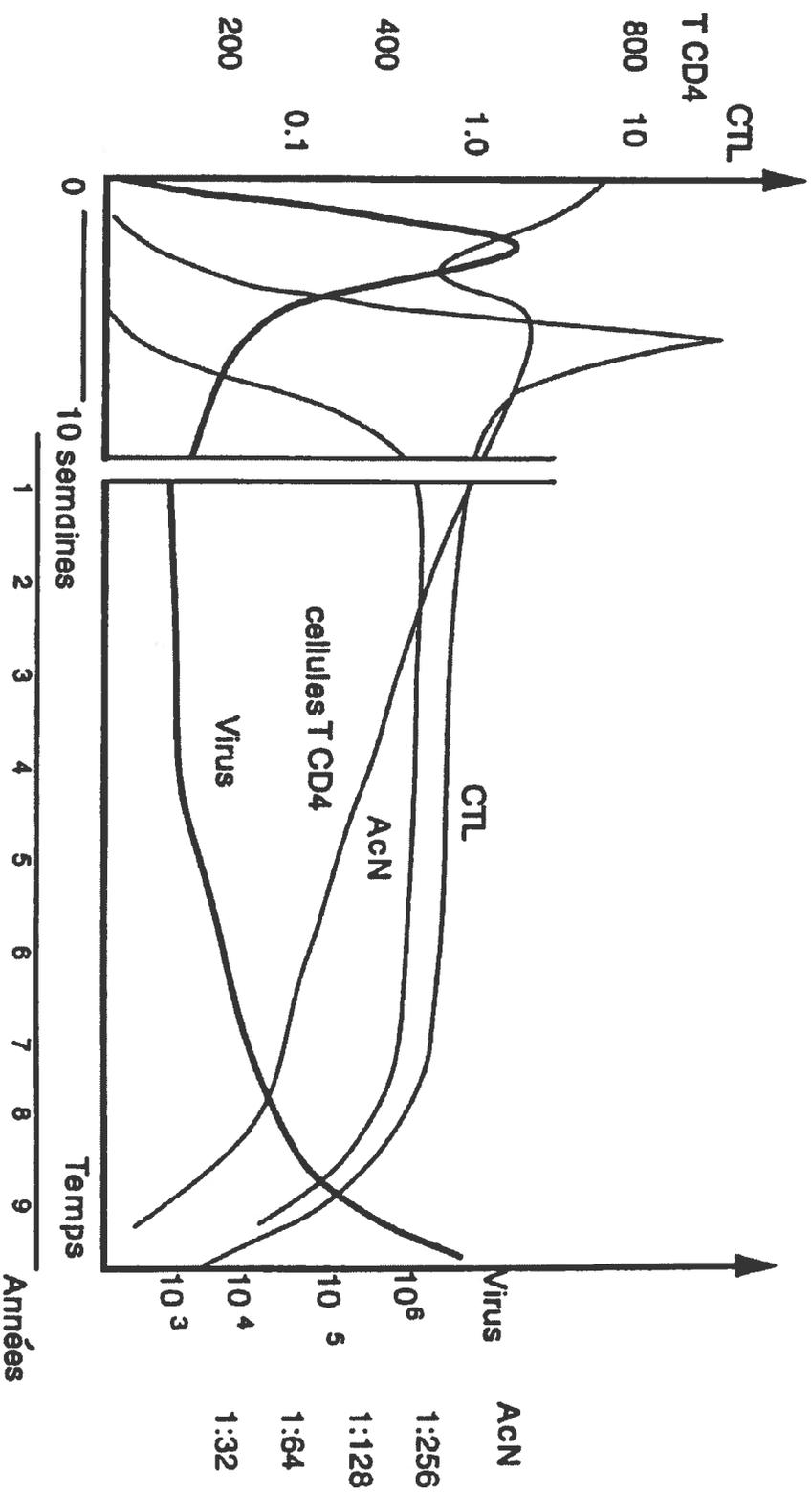
1-2 Progression de l'infection au VIH-1

La progression de l'infection au VIH-1 peut être divisé en 4 stades. Le premier stade appelé infection initiale ou infection primaire aiguë, est caractérisée par une haute réplication virale (Daar *et al.*, 1991), et une perte massive de cellules CD4⁺. Le système

immunitaire répond par une expansion clonale massive des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques (CTL) CD8⁺ et par l'apparition de réponses humorales (Graziosi *et al.*, 1998) (fig. 1). Le deuxième stade, appelé aussi la période de latence clinique ou phase asymptomatique, est d'une durée de 2 à 15 ans. Durant cette phase, la destruction très importante des cellules T se poursuit mais en parallèle avec un taux élevé de production de cellules T (rotation de la population des cellules T), stabilisant ainsi la fonction immune des cellules. La réplication virale est relativement importante dans le sang périphérique (Ho *et al.*, 1989 ; Graziosi *et al.*, 1998). Bien qu'elles soient vigoureuses, les réponses humorales et cellulaires sont généralement incapables d'éradiquer l'infection. La réplication du VIH-1 durant le stade asymptomatique persiste particulièrement dans les ganglions lymphatiques (Pantaleo *et al.*, 1993). Le troisième stade est caractérisé par le développement de l'infection symptomatique associée au VIH. Les individus à ce stade montrent des signes de lymphadénopathie, de perte de poids, d'infections récurrentes et de neuropathie périphérique. L'apparition de l'un de ces symptômes est un indicateur de la progression de l'infection vers le stade SIDA dans les 2 à 3 années suivantes. Le stade SIDA est la dernière étape de la maladie durant laquelle la charge virale augmente dramatiquement et le virus peut être isolé à partir de 1 % de cellules T CD4⁺ (McMichael et Phillips, 1997).

Figure 1. L'infection associée au VIH-1: relation entre la fonction immune et la charge virale.

Profil général du déroulement de l'infection au VIH-1 chez un individu infecté au VIH. La réponse CTL est présentée sous forme de % de CTL effecteurs dans les PBMC, les titres d'anticorps neutralisants et le nombre des cellules CD4⁺ sont indiqués, et la charge virale est présentée sous forme de copies d'ARN/ml de sang. **Réf. McMichael et Phillips, 1997.**



1-3 Structure et organisation génomique du VIH-1

Le virion mature du VIH-1 a une structure icosaédrique (Gelderblom, *et al.*, 1987) d'environ 100 nm de diamètre (fig. 2-A). La nucléocapside centrale ou "core" du virion est composée de la capsidie à l'intérieur de laquelle se trouve le génome viral composé de deux molécules d'ARN simples brins identiques étroitement liées à l'ADN polymérase virale ARN-dépendant appelée transcriptase inverse (p66/p51), et des protéines de la nucléocapside p9 et p6 (Mervis *et al.*, 1988). La partie interne de la membrane virale est tapissée par la protéine p17 myristilée qui constitue la matrice pour le maintien de la structure virale (Gelderblom *et al.*, 1989; Yu *et al.*, 1992). La surface du virus est formée de 72 protubérances contenant des glycoprotéines de l'enveloppe en trimères ou tétramères (Ozel *et al.*, 1988). Ces glycoprotéines sont insérées dans la bicouche lipidique issue de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte. Les glycoprotéines de l'enveloppe sont dérivées d'un précurseur de 160 kDa, qui est clivé par une protéase cellulaire en la glycoprotéine externe de surface, la gp120 et en la glycoprotéine transmembranaire, la gp41, qui est ancrée dans l'enveloppe virale par sa partie hydrophobe (McCune *et al.*, 1988; Earl *et al.*, 1990)

L'ARN génomique du VIH-1 d'environ 9.8 Kb (fig. 2-B), est caractérisé par la présence de deux longues séquences terminales répétitives appelées LTR, qui encadrent les gènes structuraux *gag*, *pol* et *env* (Hahn *et al.*, 1984). Contrairement aux autres rétrovirus, le génome du VIH-1 renferme au moins six gènes régulateurs *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpr*, qui codent pour les protéines auxiliaires impliquées dans la régulation de l'expression des gènes viraux.

Les précurseurs Gag (55) et Gag/Pol (160) sont synthétisés à partir d'un ARNm non épissé. Le précurseur Gag est clivé par la protéase virale en 4 petites protéines, p24, p17, p9 et p6 (Navia *et al.*, 1989; Tritch *et al.*, 1991; Wlodawer *et al.*, 1989). Le précurseur Gag/Pol est clivé en protéase (p10), transcriptase inverse/ARNase H (p66/p51), et en intégrase (p32)

(Lightfoote *et al.*, 1986; Mous *et al.*, 1988). Les protéines virales accessoires Vif, Vpr et Vpu sont synthétisés à partir d'ARNm simplement épissés, alors que Tat, Rev et Nef sont synthétisées à partir d'ARN multi-épissés (Schwartz *et al.*, 1990a, 1990b, 1991).

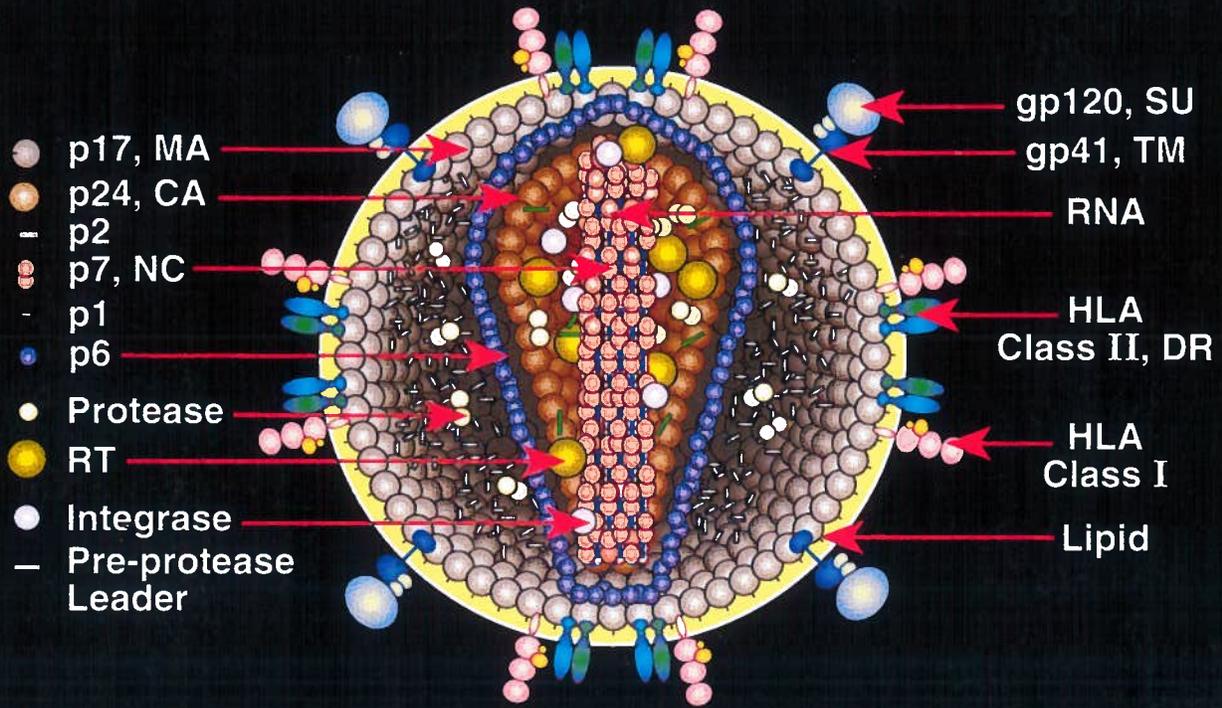
Figure 2.

A: Représentation schématique de la coupe transversale du VIH-1.

Le virus est encapsulé dans une enveloppe lipidique contenant 72 protubérances externes composées de la gp120 de surface (SU) et de la gp41 transmembranaire (TM), et contenant des protéines d'origine cellulaire (HLA de classe I et II). L'intérieur du virus est composé de l'ARN viral associé aux produits des précurseurs Gag et Gag/Pol. Les produits protéolytiques du précurseur Gag comprennent la matrice p17 (MA), la capsid p24 (CA), la nucléocapsid p2, p7 (NC), p1 et p6. Les produits protéolytiques du précurseur Gag/Pol comprennent la transcriptase inverse (RT), l'intégrase et la protéase. **Réf. NIH Publication, 94-1536.**

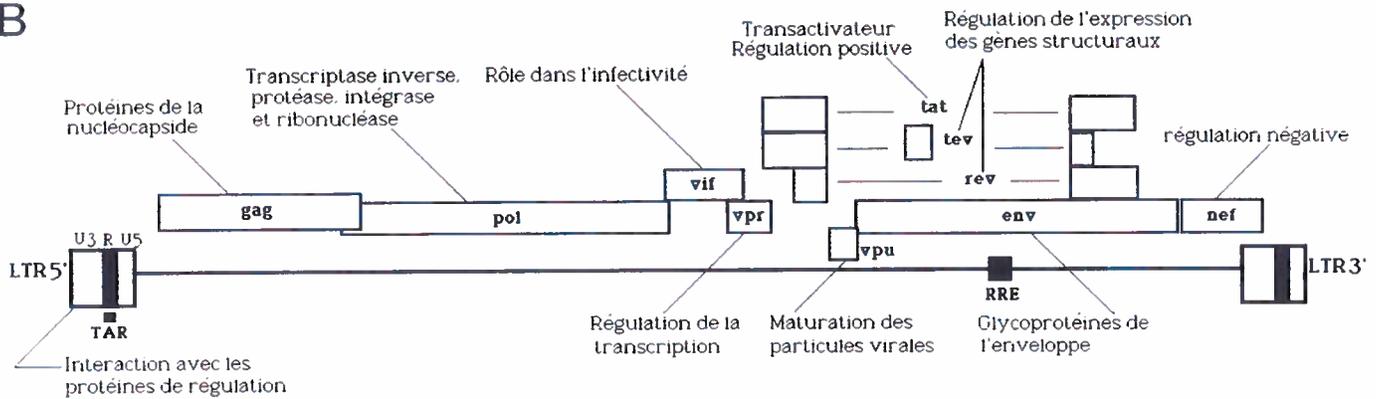
B: Représentation schématique du génome du VIH-1.

A



NIH Publication No. 94-1536

B



1-4 Récepteurs cellulaires du VIH-1

Le VIH-1 nécessite deux récepteurs pour entrer dans les cellules susceptibles, il s'agit du récepteur CD4 et des récepteurs de chimiokines qui agissent en fait comme co-récepteurs pour le VIH-1 (Doms et Peiper, 1997; Rucker et Doms, 1998). La protéine mature CD4 est une molécule de 55 kDa composée de 4 régions semblables aux régions extracellulaires d'immunoglobulines (V1 à V4), d'une région transmembranaire et d'un segment cytoplasmique (Maddon *et al.*, 1985). Les récepteurs de chimiokines sont une famille de 7 récepteurs hétérodimériques couplés aux protéines G transmembranaires (Premack et Schall, 1996). Deux principaux récepteurs de chimiokines sont impliqués dans l'infection au VIH, il s'agit des récepteurs : CCR5 et CXCR4. CCR5 est le récepteur de chimiokines majeur utilisé par les souches du VIH-1 M-tropiques (Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996). Les souches du VIH-1 M-tropiques également appelées R5, se répliquent dans les macrophages primaires et dans les cellules T, mais n'infectent pas les lignées de cellules T transformées. Ils se répliquent plus lentement et ils sont moins virulents que les virus T-tropiques. Les souches du VIH-1 T-tropiques ou X4 utilisent le récepteur de chémokine CXCR4 pour entrer dans les cellules hôtes, principalement dans les lymphocytes T (Feng *et al.*, 1996).

1-5 Tropisme cellulaire du VIH-1

Le VIH-1 infecte les cellules CD4⁺ incluant les lymphocytes T CD4⁺, les cellules de lignée monocyttaire et les cellules dendritiques immatures (Cameron *et al.*, 1992; Knight *et al.*, 1997). Les cellules dendritiques et les cellules de lignées monocyttaires sont les premières cellules infectées par le VIH-1 (Graziosi *et al.*, 1998). Ces cellules servent également de réservoirs qui assurent la perpétuité de la propagation virale (Phillips *et al.*, 1998). Le VIH-1 peut aussi infecter une grande variété de cellule exprimant des niveaux non détectables de CD4 comme les cellules B, les cellules NK, les cellules folliculaires dendritiques, les cellules endothéliales de la moelle osseuse, les cellules gliales, les

oligodendrocytes, les astrocytes, les fibroblastes, les cellules de Langerhans, les cellules coloréctales, les cellules tubulaires rénales, les hépatocytes, les cellules de la rétine, les cellules de la prostate et les cellules du système nerveux central (Levy *et al.*, 1985 ; Bagasra *et al.*, 1992; Cann *et al.*, 1990; Cheng-Mayer *et al.*, 1990; Chehimi *et al.*, 1991; Patterson et Knight, 1987; Tateno *et al.*, 1989 ; Gray., 1989).

1-6 Glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1

Les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 sont synthétisées sous forme d'une protéine précurseur de 861 acides aminés, la gp160. Le transcrit de la gp160 est un ARNm simplement épissé, bicistronique qui code pour la glycoprotéine de l'enveloppe Env et la protéine Vpu. Après la traduction, la protéine précurseur gp160 est dirigée vers le réticulum endoplasmique rugueux par une séquence signal N-terminale (Allan *et al.*, 1985; Robey *et al.*, 1985), où elle sera ancrée par une région transmembranaire (Berman *et al.*, 1988; Haffar *et al.*, 1988). Après sa translocation dans le réticulum endoplasmique (RE), la gp160 s'oligomérisse pour former des dimères, et probablement des trimères (Earl *et al.*, 1990, 1991). La gp160 est ensuite clivée lors de son transit à travers l'appareil de Golgi, par les protéases cellulaires, pour former les deux sous-unités, la gp120 et la gp41, qui restent associées de façon non covalente (Dewar *et al.*, 1989; Earl *et al.*, 1991; Stein et Engleman, 1990). Les tétramères des complexes gp120/gp41 forment les spicules observées sur les virions VIH-1 nouvellement synthétisés (Gelderblom *et al.*, 1987). La gp160 est hautement glycosylée. En effet, plus de la moitié du poids moléculaire final de la glycoprotéine de l'enveloppe provient de l'addition de chaînes de sucres en embranchements (Kozarsky *et al.*, 1989; Matthews *et al.*, 1987).

1-7 Cycle de vie du VIH-1

Le cycle viral du VIH peut être divisé en deux étapes : une étape regroupant l'ensemble des événements permettant l'établissement de l'infection et une étape caractérisant l'expression de l'infection.

1-7.1 Établissement de l'infection

1-7.1.1 Fixation de la gp120 du VIH-1 au récepteur CD4 et pénétration du virus

L'infection au VIH-1 commence lorsque le virus se lie au récepteur CD4 à la surface de la cellule cible par sa protéine de surface gp120. Le site de fixation de la gp120 au récepteur CD4 est formé de quatre régions non contiguës de la gp120 qui sont mises en continuité grâce à la structure secondaire et tertiaire de la protéine (fig. 3) (Lasky *et al.*, 1987, Olshevsky *et al.*, 1990; Sun *et al.*, 1989). La région de fixation du récepteur CD4 se trouve dans une structure en poche de la gp120 dont le fond hydrophobe interagit avec les acides aminés hydrophobes en saillies à la surface de la molécule CD4 (Olshevsky *et al.*, 1990).

Suite à la fixation de la gp120 au CD4, un changement conformationnel prend place permettant à la gp120 de se lier au co-récepteur chémokine approprié (Littman, 1998). Ce changement de conformation permet également à la région fusogénique de la gp41 d'interagir avec la membrane de la cellule cible, permettant ainsi la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte (Littman, 1998). Un autre événement impliquant le clivage de la boucle V3 de la gp120 par des protéases cellulaires, semble également influencer l'entrée du VIH-1 dans les cellules hôtes (Kido *et al.*, 1990, Murakami *et al.*, 1991). La troisième région variable V3 de la gp120 forme une boucle grâce à la présence des résidus cystéines aux positions 301 et 336. La plupart des acides aminés de la boucle V3 sont très variables entre les différentes souches du VIH-1 à l'exception des acides aminés

Gly-Pro-Gly-Arg (GPGR) hautement conservés au sommet de la boucle. Cette séquence pourrait contenir des sites de clivage pour les protéases cellulaires telles que la protéase TL-2 "trypsin-like" (Clements *et al.*, 1991 ; Kido *et al.*, 1991). Le clivage de la boucle V3 semble faciliter le changement conformationnel de l'enveloppe qui permet à la région fusogénique virale, au niveau de la gp41, de fusionner avec la membrane de la cellule (Sattentau et Moore, 1991).

1-7.1.2 Transcription inverse et intégration du génome viral

Après l'événement de fusion, la particule virale est internalisée puis décapsidée (Varmus, 1988), et l'ARN génomique viral est rapidement converti en ADN dans le cytoplasme. En effet, la réplication virale commence avec la génération du premier brin d'ADN, copie de l'ARN génomique viral, grâce à la transcriptase inverse virale. La ribonucléase H dégrade partiellement la matrice d'ARN original permettant au second brin d'ADN d'être synthétisé. L'ADN double brin est ainsi formé et il contient une séquence LTR à chaque extrémité. L'ADNc de l'ARN viral forme en présence de la protéine de la matrice virale et de l'intégrase, le complexe de préintégration. Le complexe de préintégration est transporté vers le noyau cellulaire où l'ADN viral peut soit s'intégrer dans le génome de la cellule hôte par l'intégrase virale, soit se circulariser (Varmus, 1988). L'intégration du VIH-1 se fait par des liaisons covalentes entre les extrémités de l'ADN hôte et de l'ADN viral (Bushman *et al.*, 1990). Les deux formes d'ADN, circulaire et intégré, sont stables dans les cellules infectées, alors que seul l'ADN intégré ou provirus peut se répliquer lors de la division cellulaire (Huang *et al.*, 1998).

Figure 3. Représentation schématique de la structure secondaire de la glycoprotéine de surface gp120, du VIH-1 HX10.

La figure montre les cinq régions variables (V1 à V5) de la gp120 séparées par les cinq régions conservées, ainsi que les domaines et les sites impliqués dans l'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4. Réf. Nara, 1991.

1-7.2 Expression du virus au cours de l'infection

Après son intégration dans le génome cellulaire, l'ADN proviral peut rester silencieux avec restriction du cycle de réplication, jusqu'à ce que la cellule infectée soit activée (Greene, 1991 ; Graziosi *et al.*, 1998; McCune, 1995)

1-7.2.1 Événements précoces de l'expression virale

Les ARNm précoces produits par les cellules infectées suite à l'intégration du virus, correspondent aux transcrits doublement épissés. Ces transcrits codent principalement pour les gènes régulateurs majeurs *tat*, *rev* et *nef* (Greene, 1991; Kim *et al.*, 1989). Bien que les ARNm *nef* représentent la majorité de ces transcrits précoces, la protéine Tat est la première produite en raison de sa capacité de transactiver les promoteurs influençant la transcription. Il semble que c'est la prédominance de l'un des produits de ces deux gènes viraux (*tat* et *nef*) qui détermine si l'infection au VIH-1 rentre dans un état productif ou latent. Ainsi, l'expression de la protéine Tat active la production du virus (Dayton *et al.*, 1986, Fisher *et al.*, 1986), alors que l'expression de la protéine Nef par certaines souches du virus peut induire la latence (Luciw *et al.*, 1987). La protéine Rev est responsable de l'équilibre entre l'expression des protéines Tat et Nef pour favoriser la production des ARNm non-épissés codant pour d'autres produits viraux essentiels à la production de virus infectieux (Feinberg *et al.*, 1986, Sodroski *et al.*, 1986).

L'ARN viral est produit par l'ARN polymérase II cellulaire à partir de l'ADN viral. Il s'agit d'une molécule d'ARN pleine-longueur qui s'étend de l'extrémité 5' de la région du LTR 5' jusqu'à l'extrémité 3' de la région R du LTR 3'. Les transcrits primaires contiennent les éléments TAR 5' et poly A 3' terminales. Le brin sens de l'ADN viral est le seul qui est transcrit puis traduit en protéines virales. Deux copies de transcrits primaires d'ARN pleine-longueur sont incorporées dans chaque particule virale bourgeonnante. Ces transcrits

primaires forment un dimère stable par leur extrémité 5' et constituent le génome du virion. Les transcrits primaires pleine-longueur contiennent de multiples sites d'épissage qui sont utilisés pour produire une large famille de transcrits épissés de façon simple ou multiple. Les transcrits non-épissés et épissés sont par la suite transportés vers le cytoplasme où ils servent à diriger la synthèse des protéines virales (Schwartz *et al.*, 1990a; Purcell et Martin, 1993).

1-7.2.1.1 Facteurs cellulaires impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes du VIH-1

Bien que le LTR du VIH-1 peut à lui seul remplir la fonction de promoteur de virus, la transcription des ARNm précoces par l'ARN polymérase II cellulaire semble compter sur la fixation au niveau du LTR de facteurs de transcription cellulaire. Le VIH-1 contient la TATA box qui est similaire à celle trouvée dans la plupart des promoteurs eucaryotiques. (Jones *et al.*, 1988). Trois sites de fixations pour le facteur de transcription cellulaire mammalien SP-1 ont été identifiés du côté 5' de la TATA box du VIH-1 (Jones *et al.*, 1986). SP-1 est un activateur transcriptionnel puissant qui est important pour la transcription basale du VIH-1 et également pour l'induction de la transcription par Tat (Harrich *et al.*, 1989; Berkhout et Jeang, 1992).

La transcription induite du VIH-1 est régulée principalement par la famille de facteurs de transcription NF- κ B. La stimulation de la transcription du VIH-1 par les mitogènes et le phorbol ester est médiée par deux sites identiques de fixation de NF- κ B situés dans la région du promoteur du VIH-1 (-80 à -105 pb) (Nabel et Baltimore, 1987). Lors de l'activation des cellules T, le NF- κ B va se dissocier de son inhibiteur I κ B, auquel il est normalement associé, après phosphorylation de ce dernier (I κ B) par la protéine kinase C (PKC), ce qui permet la translocation du NF- κ B vers le noyau pour se fixer à son site sur le LTR proviral (Nolan *et al.*, 1991; Qian *et al.*, 1994). D'autres facteurs cellulaires agissent en amont du promoteur. Il s'agit entre autres, du facteur nucléaire des cellules T activées (NF-AT) (Lu *et*

al., 1990; Gaynor, 1992), et de la protéine d'activation AP-1 (Franza *et al.*, 1988 ; Cooney *et al.*, 1991). Le site de fixation du NF-AT au niveau du LTR proviral serait localisé entre les deux sites de fixation de NF-κB (Montano *et al.*, 1996 ; Kinoshita *et al.*, 1998).

1-7.2.2 Événements tardifs de l'expression du virus

L'assemblage des virions prend place au niveau de la surface interne de la membrane plasmique (Bryant et Ratner, 1990; Pal *et al.*, 1990). Les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 nouvellement synthétisées sont insérées dans la membrane de la cellule hôte et s'assemblent aux particules virales durant le processus de bourgeonnement.

L'ARN génomique du virus est capturé par la polyprotéine précurseur de la capsidie Gag/pol (160) grâce à une séquence d'encapsidation appelée Psi. Cette séquence est localisée sur l'ARN viral près du site d'initiation du précurseur de la capsidie (Aldovini et Young, 1990; Lever *et al.*, 1989). Seulement deux copies de l'ARN viral sont incorporées par particule virale (Darlix *et al.*, 1990). Une fois assemblées, les nucléocapsides bourgeonnent à travers la membrane plasmique cellulaire où elles acquièrent une bicouche lipidique externe contenant les glycoprotéines de l'enveloppe. Après le bourgeonnement, la protéase du VIH-1 clive les protéines de structure et les enzymes virales, conduisant ainsi à la maturation des particules virales. La protéase virale, clivée durant ou immédiatement après le processus d'encapsidation à partir du précurseur Gag/Pol, en un monomère de 10 kDa (Debouck *et al.*, 1987), est active sous forme homodimérique (Nutt *et al.*, 1988). Le précurseur de la capsidie (Gag, p55) est clivé par la protéase en quatre polypeptides majeurs. Le polypeptide p17, qui reste associé à la surface de la membrane (Gelderblom *et al.*, 1987), forme la protéine de la matrice. La protéine majeure de la capsidie (p24) forme une structure tubulaire autour de la ribonucléoprotéine qui contient l'ARN viral (Gelderblom *et al.*, 1987). La protéine de 9 kDa ou protéine de la nucléocapsidie, qui se fixe à l'ARN viral (Darlix *et al.*, 1990, Gorelick *et al.*, 1990), et la protéine de 6 kDa dont les séquences sont requises pour la

libération des particules virales à la surface des cellules infectées (Gottlinger *et al.*, 1991). La protéase virale clive aussi le précurseur Gag/Pol en ADN polymérase sous forme d'homodimère de 66 kDa et en intégrase de 32 kDa (Lightfoote *et al.*, 1986; Mous *et al.*, 1988). Plus tard dans la maturation, l'homodimère de 66 kDa est clivé en une forme de l'enzyme virale ADN polymérase-ribonucléase H de 66/51 kDa.

1-8 Cytopathogénicité et effets cytopathogéniques du VIH-1

La pathogenèse du VIH-1 *in vivo* se traduit principalement par les effets cytopathiques du virus et/ou de ces protéines sur les cellules hôtes. La formation de cellules multinuclées (syncytia) en culture de cellules *in vitro*, et possiblement chez l'hôte *in vivo*, est la principale caractéristique de l'infection au VIH-1. En effet, l'interaction de la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH-1 exprimée à la surface des cellules infectées, avec la molécule CD4 présente à la surface d'autres cellules CD4⁺ non infectées, peut conduire à la fusion cellulaire et à la formation de syncytia (Lifson *et al.*, 1986). D'autres mécanismes qui interviennent dans la cytopathologie virale, et qui n'impliquent pas l'induction de syncytia, ont été déterminés. En effet, l'accumulation de hauts niveaux d'ADN du VIH-1 non intégré est capable d'altérer la perméabilité de la membrane cellulaire et peut conduire à la mort de la cellule (Leonard *et al.*, 1988). Le bourgeonnement massif de virions du VIH-1 peut conduire à la perte de l'intégrité de la cellule et par conséquent à la mort cellulaire (Pantaleo *et al.*, 1993a; Rosenberg et Fauci, 1991). L'accumulation des protéines virales incluant la gp160, gp41, Nef, et Tat, peut être toxique pour la cellule (Perez *et al.*, 1992; Sabatier *et al.*, 1991; Werner *et al.*, 1991). La gp160 semble être impliquée dans l'induction de la mort programmée des cellules ou apoptose (Lu *et al.*, 1994). En plus, les lymphocytes exprimant à leur surface les antigènes viraux sont tués par les mécanismes normaux de la défense immunitaire, notamment par l'action des cellules cytotoxiques (Koenig *et al.*, 1995; Cheynier *et al.*, 1994; Autran *et al.*, 1988; Jassoy *et al.*, 1992). Les cellules CD4⁺ normales ayant fixé la gp120 circulante, peuvent aussi être détruites par les CTL spécifiques au VIH-1

(Koenig *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1987, 1990), et par ADCC (cytotoxicité dépendante des anticorps) (Blumberg *et al.*, 1987; Ojo-Amaize *et al.*, 1987).

Le virus peut induire indirectement la suppression de la fonction immunitaire des cellules CD4⁺. Cette perte fonctionnelle peut résulter de l'action de facteurs solubles tels que les cytokines qui affectent la capacité des cellules non infectées d'élaborer une réponse immunitaire adéquate. En effet, des études *in vitro* ont montré que la gp120 induit un effet inhibiteur sur la prolifération des cellules CD4⁺ via l'induction de la production de l'IL-10 (Schols et DeClercq, 1996). D'autre part, la fixation au récepteur CD4, de la gp120 circulante libre seule ou sous forme de complexes gp120-anti-gp120, peut induire l'anergie des cellules T ou conduire à la dépression de la fonction des cellules monocytaires, inhibant ainsi les réponses immunes fonctionnelles (Pantaleo *et al.*, 1993a ; Pietrella *et al.*, 1998). L'augmentation de la fraction des cellules CD4⁺CD28⁻ dans l'infection au VIH *in vitro* est un autre facteur qui pourrait contribuer à l'anergie des cellules CD4⁺ par absence de co-stimulation *in vivo* (Caruso *et al.*, 1994).

2- Réponses immunitaires à l'infection au VIH-1

Le VIH-1 déclenche des réponses humorales et cellulaires spécifiques contre une large variété de produits de gènes viraux et ce chez la plupart des individus infectés. Cependant, la progression de l'infection vers le stade SIDA chez un nombre élevé d'individus infectés indique que ces réponses immunitaires au virus ne confèrent pas la protection adéquate pour contrôler l'infection de façon permanente. Ceci est dû d'une part au fait que les cellules CD4⁺ requises pour initier les réponses immunes protectrices sont tuées ou inactivées par le virus, et par conséquent les réponses immunes pour éliminer le virus sont compromises. D'autre part, le génome du VIH-1 présente un degré de variabilité génétique remarquable lui permettant d'échapper aux réponses immunitaires humorales et cellulaires.

2-1 Réponse humorale

Dans le cas de l'infection au VIH-1, la séroconversion peut avoir lieu quelques jours après l'infection. Chez certains individus, les anticorps anti-VIH-1 sont détectés six jours après l'infection (Cooper *et al.*, 1985, Gaines *et al.*, 1988), alors que chez d'autres, les anticorps de séroconversion n'apparaissent que plusieurs mois après l'infection (Gaines *et al.*, 1987, Horsburgh *et al.*, 1989, Tindall et Cooper, 1991). Les anticorps anti-p24 apparaissent dans les deux premières semaines de l'infection aiguë. Ces anticorps atteignent leur niveau le plus élevé durant le stade asymptomatique avant de chuter avec la progression de l'infection à des niveaux non-détectables (Clark *et al.*, 1991, ; Daar *et al.*, 1991) (fig. 1).

Les anticorps neutralisant anti-VIH-1 bloquent l'infection en inhibant i) l'interaction gp120-CD4, ii) la fusion des membranes virales et plasmiques et iii) l'entrée de la nucléocapside virale dans la cellule (Berman *et al.*, 1990; Emini *et al.*, 1990; Girard *et al.*, 1991). La glycoprotéine de l'enveloppe est la cible majeure des anticorps neutralisants anti-VIH (Matthews *et al.*, 1986). Au moins 5 régions de la glycoprotéine de l'enveloppe virale

semblent être impliquées dans la neutralisation du VIH-1, dont quatre au niveau de la gp120 et de la région immunodominante de la gp41 (Putney *et al.*, 1986, Palker *et al.*, 1988, Rusche *et al.*, 1988, Goudsmit *et al.*, 1988).

Bien que les anticorps neutralisants soient efficaces au début de l'infection, les changements génétiques du virus en réponse à la pression exercée par les réponses immunitaires humorales et cellulaires font que ces anticorps ont moins d'effet sur les variants du VIH-1 qui émergent durant les stades tardifs de l'infection (Arendrup *et al.*, 1992; McKeating *et al.*, 1989; Nara *et al.*, 1990).

La cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) semble être un autre mécanisme de défense contre l'infection au VIH-1. En effet, les anticorps ADCC sont parmi les premiers à apparaître chez les patients récemment séroconvertis (Bolognesi, 1988; Goudsmit *et al.*, 1988). Seules les cellules activées exprimant les antigènes de surface du VIH-1 peuvent servir de cibles pour l'ADCC (Koup *et al.*, 1989). De ce fait, les anticorps ADCC spécifiques au VIH-1, principalement des IgG1 (Ljunggren *et al.*, 1988), se fixent aux antigènes viraux (gp120/41) présents à la surface de cellules infectées qui sont alors éliminées par les cellules effectrices qui expriment le récepteur Fc (NK/K). Il a été suggéré que l'ADCC joue un rôle protecteur chez les individus séropositifs du fait que l'activité antivirale de la réponse ADCC est plus importante chez les patients asymptomatiques que chez les patients à des stades avancés de la maladie (Blumberg *et al.*, 1987, Ahmad *et al.*, 1994, Merzouki *et al.*, 1994; Rook *et al.*, 1987).

2-2 Réponse cellulaire

L'immunité cellulaire constitue le premier mécanisme de contrôle de la réplication du VIH-1 (Clerici *et al.*, 1992, 1994). En effet, des réponses prolifératives des cellules T auxiliaires spécifiques aux peptides du VIH-1, ont été détectées peu de temps après l'infection aiguë, et avant que la séroconversion ne prenne place. En plus des réponses des

lymphocytes T auxiliaires, des réponses importantes des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTL) au VIH-1 ont été observées chez les patients infectés avant la séroconversion (Koup, 1994). La réponse immunitaire anti-VIH-1 dirigée par les cellules non-T réside dans la capacité des cellules NK et autres cellules FcR(+) à éliminer les cellules infectées, directement ou par le mécanisme d'ADCC, dans un contexte non restreint aux molécules du CMH (Tyler *et al.*, 1989, Walker et Plata, 1990).

2-2.1 Réponse des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺

Les cellules T CD4⁺ humaines peuvent être divisées en deux sous-populations (Mosmann *et al.*, 1986), TH1 et TH2 qui se distinguent par la nature des cytokines qu'elles produisent. Les TH1 sécrètent l'IL-2, l'IL-10, l'INF- γ et le TNF β . Ces cytokines sont nécessaires pour l'immunité cellulaire. Elles permettent l'augmentation de l'activité cytolytique des cellules CD8⁺ cytotoxiques. Les cellules TH2 sécrètent l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10, qui permettent l'activation des cellules B à produire les anticorps. La perturbation de la fonction des cellules CD4⁺, soit quantitative ou qualitative, peut avoir des effets profonds sur le fonctionnement du système immunitaire (Fauci, 1988). Chez les individus infectés par le VIH-1, les cytokines comme immunorégulateurs, peuvent affecter la progression de l'infection vers le SIDA en modulant la réplication virale au niveau des cellules cibles (Sher *et al.*, 1992; Molina, 1993). La réponse de type TH1 est présente principalement chez les individus asymptomatiques, alors que la réponse de type TH2 est présente chez les patients symptomatiques (Clerici *et al.*, 1992; Clerici et Shaerer, 1993). Les épitopes reconnus par les cellules T auxiliaires se trouvent sur les protéines Env, Gag et Pol du VIH-1. Cependant peu de ces épitopes sont immunodominants.

L'activité cytotoxique des CTL CD4⁺ est dirigée contre les cellules infectées, ou les cellules exprimant les antigènes du VIH-1 en association avec les molécules du CMH de classe II (Hammond *et al.*, 1993; Orentas *et al.*, 1990). Cette réponse CTL est généralement

associée aux cellules CD4⁺ de type TH1 (DelPrete *et al.*, 1991) et elle est spécifique à la souche virale (Hammond *et al.*, 1993).

2-2.2 Réponses des lymphocytes T cytotoxiques au VIH-1

Bien que les réponses des cellules T CD4⁺ auxiliaires soient compromises, les individus infectés montent une forte réponse CTL CD8⁺ au VIH-1 (McMichael, 1998). Le maximum de la réponse CTL coïncide avec la chute de la virémie, et ce avant la détection des anticorps neutralisants (Koup et Ho, 1994) (fig. 1). Après la phase initiale, la réponse CTL se stabilise mais à un niveau inférieur (fig. 1). La fréquence des CTL anti-VIH-1 chez les patients asymptomatiques est de l'ordre de 10 à 20 précurseurs CTL pour 10⁴ cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et atteint des niveaux très bas, voire non-déTECTABLES, durant le stade SIDA (Hoffenbach *et al.*, 1989).

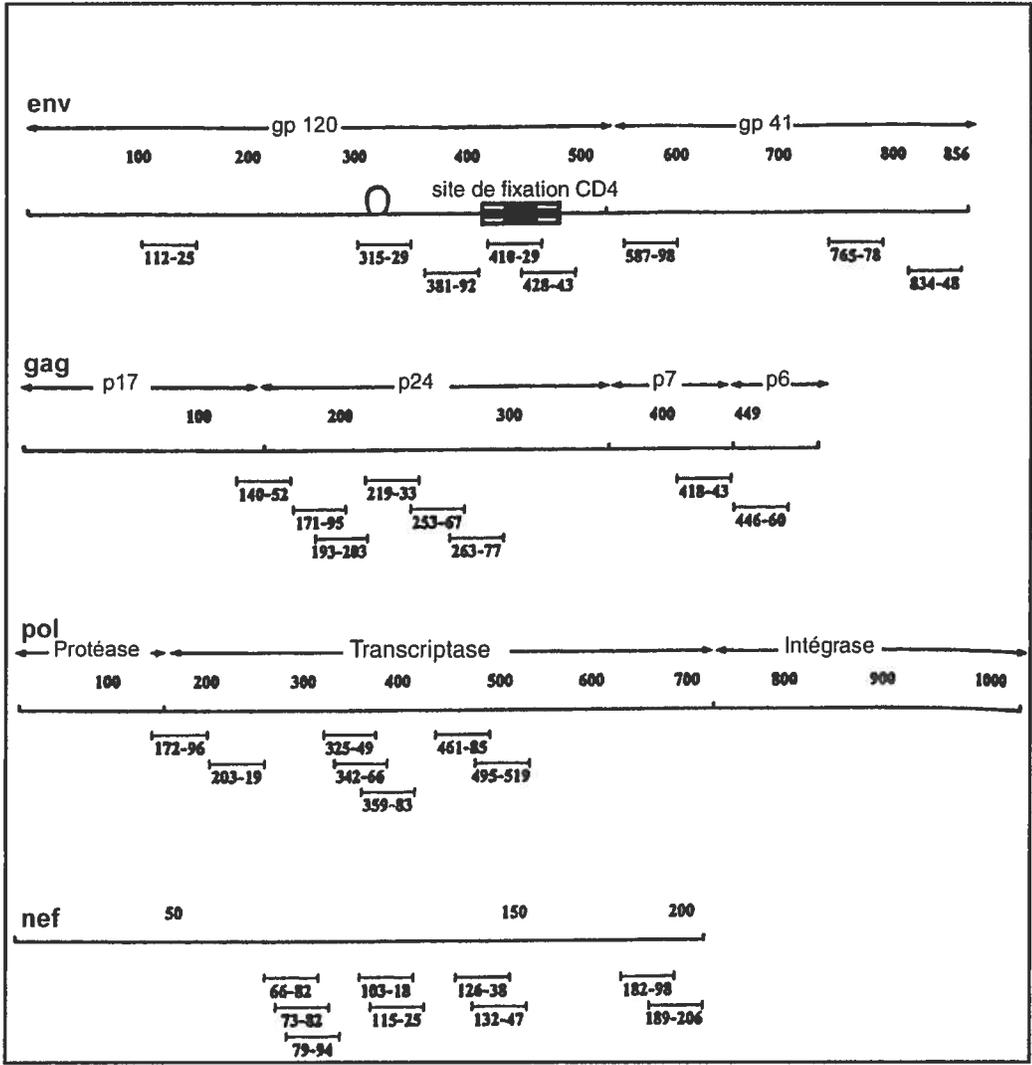
Les glycoprotéines de l'enveloppe virale sont les premières cibles des CTL anti-VIH-1 (Plata *et al.*, 1987; Walker *et al.*, 1987). Ces glycoprotéines servent d'antigènes cibles pour les CTL CD8⁺ en association avec une variété de produits des gènes du CMH classe I, incluant les molécules HLA-A2, -A3, -A30, -B8, -B14, -B27 (Shirai *et al.*, 1992; Rivière *et al.*, 1989; Plata *et al.*, 1987; Walker *et al.*, 1987). L'activité CTL restreinte aux molécules du CMH classe I a aussi été démontrée contre les protéines Gag, Pol, Vif et Nef du VIH-1 (Clerici *et al.*, 1991; Hosmalin *et al.*, 1990; Koenig *et al.*, 1990; Nixon *et al.*, 1988; Rivière *et al.*, 1989; Walker et Plata, 1990) (fig. 4). Les épitopes viraux restreints aux molécules du CMH classe II ont été aussi identifiés et une réponse CTL anti-VIH-1, par les lymphocytes de phénotype CD4⁺, a été décrite (Johnson *et al.*, 1994; Lekutis et Letvin, 1998; Siliciano *et al.*, 1988; McMichael et Phillips, 1997). En effet, les clones CTL CD4⁺ restreints aux molécules HLA-DR2 et HLA-DR4 du CMH classe II ont été dérivés par stimulation *in vitro*, des cellules T du sang périphérique d'un individu normal, avec la gp120 recombinante (Siliciano *et al.*, 1988). Les CTL CD4⁺ ont été également isolés du sang d'individus vaccinés

avec les protéines recombinantes de l'enveloppe du VIH-1 (Orentas *et al.*, 1990). De plus, d'autres groupes ont réussi à isoler des CTL CD4⁺ spécifiques aux protéines gp120 et Gag du VIH-1, d'une part chez des patients infectés par le VIH-1 (Curiel *et al.*, 1993; Littaua *et al.*, 1992), et d'autres part chez des individus infectés et immunisés avec la gp160 recombinante (Hammond *et al.*, 1992). Cependant, il reste à établir clairement, *in vivo*, le niveau de participation des CTL CD4⁺ dans la réponse cytotoxique au VIH-1.

Figure 4. Cartographie des épitopes reconnus par les CTL dans les produits des gènes du VIH-1.

Le VIH-1 induit des réponses CTL importantes dirigés contre une large série d'épitopes au niveau des produits des gènes *env*, *gag*, *pol* et *nef* du VIH-1.

Les peptides identifiés par leur positionnement des acides aminés, sont capables d'induire des réponses CTL.



3- Mécanismes d'échappement du VIH-1 à la réponse CTL

3-1 Variabilité génétique du VIH-1

Une des principales caractéristiques du VIH-1 est son extrême diversité génétique qui touche en particulier le gène de l'enveloppe (Hahn *et al.*, 1985.; Louwagie *et al.*, 1995). Il est estimé que 100 millions de virus mutants peuvent être produits chaque jour chez un individu infecté, résultat du taux de réplication élevé et de la faible précision de la transcriptase inverse virale (Roberts *et al.*, 1988; Saag *et al.*, 1988 ; Hu et Temin, 1990 ; Koup, 1994), exposant ainsi le système immunitaire du patient infecté à chaque mutation ponctuelle possible (McMichael et Phillips, 1997). L'émergence d'épitopes CTL mutés pourrait faciliter la persistance, et l'échappement d'une large rangée de variants du VIH-1.

3-1.1 Délétion de l'épitope CTL

La variabilité génétique du VIH-1 peut conduire à la délétion complète des épitopes CTL immunodominants. Au moins, deux exemples de délétions d'épitopes CTL ont été repertoriés (Tableau 1). En effet, Koenig et collaborateurs (1995) ont montré que suite à un transfert adoptif dans un donneur infecté, d'un clone CTL restreint à la molécule du CMH classe I HLA A3 et spécifique à un épitope de Nef (a.a. 69 à 78), plus de 20 % d'isolats viraux ont accumulé des délétions de cet épitope Nef. Alors que Price et collaborateurs (1997) ont montré, chez un patient avec une infection primaire aiguë, la présence d'une réponse CTL monospécifique et efficace à un épitope de Nef (a.a. 86 à 93) présenté par la molécule HLA B8. Quelques semaines plus tard, chez ce même patient, le virus original a été complètement remplacé par des mutants qui ne codent plus pour cet épitope CTL.

3-1.2 Perte de la capacité de présentation de l'épitope CTL par les molécules du CMH

La variation dans les épitopes CTL clefs peut aussi empêcher la fixation de ces épitopes viraux par les molécules du CMH et par conséquent, elle peut résulter dans la perte

de leur présentation à la surface de cellules infectées. Les exemples repertoriés d'épitopes variants qui échappent à la reconnaissance par les CTL par mutation des résidus d'ancrage aux molécules du CMH incluent deux variants d'un épitope Nef restreint à la molécule HLA A11 (Couillin *et al.*, 1994), et un variant de l'épitope de l'enveloppe restreint à la molécule HLA B44 (a.a. 30 à 38) (Borrow *et al.*, 1997) (Tableau 1).

3-1.3 Perte ou altération de la reconnaissance du complexe épitope/CMH par le TCR

Certaines mutations n'affectent pas la fixation du peptide variant à la molécule du CMH, mais plutôt la reconnaissance et l'activation subséquente de la fonction effectrice des CTL. Ces peptides variants sont appelés ligands peptidiques altérés (APL). Les APL peuvent perturber la réponse CTL de différentes façons : i) perte de reconnaissance par les CTL, ainsi l'APL, bien que potentiellement immunogénique, n'est pas reconnu par la réponse CTL dominante qui existe déjà dans le sang périphérique de l'individu infecté (Phillips *et al.*, 1991; McAdam *et al.*, 1995) ; ii) altération de la reconnaissance par les CTL, ainsi, la présence de substitutions d'acides aminés au niveau du site de liaison avec le TCR, peuvent altérer la reconnaissance de l'APL par le TCR sans pour autant affecter l'interaction du complexe CMH/APL avec le TCR (Reid *et al.*, 1996). Cette altération peut entraîner l'antagonisme des CTL.

L'antagonisme des CTL par les variants naturels du VIH-1 peut jouer un rôle important dans la persistance du virus. En effet, il a été démontré que les variations naturelles dans les épitopes CTL de la protéine Gag du VIH-1 généraient des APL capables d'antagoniser *in vitro*, l'activation des CTL par l'épitope spécifique (Jameson *et al.*, 1993; Klenerman *et al.*, 1994, 1995; Meier *et al.*, 1995; Sewell *et al.*, 1997; Purbhoo *et al.*, 1998) (Tableau 1). Ceci pourrait avoir pour résultat, l'inhibition de la capacité des CTL de reconnaître les cellules infectées par le virus sauvage permettant ainsi la persistance de ce dernier *in vivo*.

Des travaux utilisant des systèmes cellulaires restreints aux molécules HLA du CMH humain classe II, ont permis d'identifier des APL capables d'induire l'anergie dans les lymphocytes T CD4⁺ (Sloan-Lancaster *et al.*, 1993, 1994a). Ce sont les APL inducteurs d'anergies appelés également APL agonistes partiels. Bien que l'induction de l'anergie par les APL agonistes partiels ait été décrite presque exclusivement pour les cellules T auxiliaires CD4⁺ (TH1 et TH2) restreintes aux molécules HLA classe II, certains cas d'anergie des CTL restreints aux molécules HLA classe I ont été reportés (Otten et Germain, 1991; Bhandoola *et al.*, 1993; Hollsberg *et al.*, 1995). Jusqu'à présent, ce phénomène n'a pas encore été démontré dans les CTL CD8⁺ ou CD4⁺ spécifiques au VIH-1. Un tel mécanisme permettrait non seulement aux variants du VIH-1 de se soustraire à la réponse CTL, mais peut aussi faciliter la persistance de souches virales qui pourraient être reconnues et éliminées par les CTL CD8⁺ ou CD4⁺ spécifiques.

Tableau 1. Exemples documentés de variants naturels présentant des mutations dans les épitopes CTL.

Dans chaque cas, la première séquence indique la séquence consensus de l'épitope sauvage, et les séquences en dessous représentent les séquences mutées. Pour les mutants, seul le résidu altéré est montré. L'effet de chaque mutant est indiqué.

HLA	gène	Séquence	Effet	Référence
B8	gag p17	GGKKKYKL --R-----	Distortion de l'hélice α -1	Phillips et al., 1991 Reid et al., 1996
B8	gag p24	DIYKRWII E-----	N'est pas vu par certains CTL	Phillips et al., 1991
B8	gag p17	GGKKKYKL ----Q---	Ne se lie pas au CMH	Price et al., 1997
B8	nef	FLKEKGGL ----E---	Ne se lie pas au CMH	Price et al., 1997
		----N---	Ne se lie pas au CMH	
		----Q---	Ne se lie pas au CMH	
		Épitope délété	
B8	pol/RT	GPKVKQWPL --R----- --E-----	Antagonisme Ne se lie pas au CMH	Meier et al., 1995
B44	env	AENLWVTVYY -K-----	Dissociation rapide du CMH	Borrow et al., 1997
A11	nef	AVDLSHFLK -R----- -F-----	Ne se lie pas au CMH Ne se lie pas au CMH	Couillin et al., 1994
A3	nef	QVPLRPMTYK	Épitope délété	Koenig et al., 1995
B8	gag p17	GGKKKYKLLK -----Q-- ----R-R-- -----R--	Antagonisme Antagonisme Antagonisme	Klenerman et al., 1994
	gag p24	GEIYKRWII -D-----	Antagonisme	
B27	gag p24	KRWIIMGLNK -----L----	Antagonisme	Klenerman et al., 1994
A2	gag p17	SLYNTVATL --C----- --S----- --F--I-V- --F-A----	Antagonisme Antagonisme Antagonisme Antagonisme	Purbhoo et al., 1998

3-2 Autres mécanismes d'échappement du VIH-1 à la réponse CTL

Des mécanismes d'évasion du virus à la réponse CTL, autres que celui de la variabilité génétique, ont été démontrés. Le mécanisme le plus évident pour éviter la réponse immune est celui de la latence virale, où le provirus s'intègre mais ne s'exprime pas (Finzi et Siliciano, 1998). Un autre mécanisme serait la séquestration du VIH-1 dans des sites où l'accès des CTL est limité. En effet, les cellules gliales infectées doivent entraver le contrôle cellulaire de l'infection de façon à ce que l'élimination du virus soit impossible.

Une baisse du niveau d'expression des molécules HLA sur les cellules infectées est une autre stratégie bien établie qui permet au virus d'éviter la réponse CTL. La réduction de l'expression des molécules HLA classe I a été observée dans les lignées cellulaires infectées par le VIH-1 et également dans les cellules T de patients infectés (Collins *et al.*, 1998; Le Gall *et al.*, 1998). Kerkau *et al.*, (1997) ; Schwartz *et al.*, (1996), ont montré que les produits des gènes accessoires du VIH-1 tels que la protéine Vpu et Nef, sont capable de diminuer l'expression des molécules HLA classe I à la surface des cellules infectées, interférant ainsi avec la présentation et la reconnaissance des antigènes viraux par les CTL CD8⁺.

Le moyen le plus efficace qui permet au virus d'échapper à la réponse CTL reste le déclin des cellules T CD4⁺ (Rosenberg *et al.*, 1997). L'initiation et le maintien des réponses CTL de mémoire sont dépendants des cellules T auxiliaires. Il serait donc très difficile d'initier de nouvelles réponses CTL primaires chez les personnes infectées parce que les cellules T auxiliaires sont déficientes. Ainsi des nouvelles réponses CTL requises à cause des mutations des virus et à cause de l'augmentation progressive de la charge virale, ne seraient pas élaborées ce qui conduit à une augmentation de la charge virale et finalement à la défaillance de la réponse immune.

4- Activation des lymphocytes T

L'activation des lymphocytes T nécessite la génération d'au moins deux signaux. Le premier signal est généré à la suite de l'interaction de l'antigène (Ag) associé aux molécules du CMH classe I ou II des APC, avec le TCR. Cette interaction spécifique entre l'Ag et le TCR est accompagnée par des interactions entre les régions non-polymorphiques des molécules du CMH classe I et II et les co-récepteurs CD8 et CD4, respectivement. Le second signal est généré à la suite de l'interaction des molécules accessoires B7 (CD80/CD86) sur les APC avec les co-récepteurs CD28 ou CTLA4 présents à la surface des lymphocytes. Une fois initiés, ces signaux sont transduits de la membrane de la cellule au noyau à travers différentes cascades de signalisation qui agissent en synergie et qui aboutissent à l'activation de la transcription du gène de l'IL-2 et éventuellement à la prolifération cellulaire.

4-1 Le complexe TCR/CD3

Le TCR est un complexe composé de deux chaînes polypeptidiques glycosylées α et β qui sont membres de la superfamille des immunoglobulines (Ig), capables de réarrangement génétique au niveau des segments des gènes V/J de la chaîne α , et des segments des gènes V/D/J de la chaîne β (Weissman *et al.*, 1986). Cette capacité de recombinaison des chaînes α et β et la multiplicité des segments des gènes V, D et J contribuent à la diversité génétique du TCR, pour pouvoir accommoder la panoplie d'antigènes que le système immunitaire peut rencontrer (Ashwell et Klausner, 1990 ; Weiss, 1991). Plus de 95 % de cellules T expriment l'hétérodimère $\alpha\beta$, qui est responsable de l'association du TCR au complexe Ag/CMH (Dembic *et al.*, 1986), et le reste (2-5 %) expriment l'hétérodimère $\gamma\delta$. L'hétérodimère $\alpha\beta$ est associé de façon non covalente avec au moins six chaînes invariantes à la surface de la cellule. Il s'agit des chaînes γ , δ et ϵ du complexe CD3 exprimées sous forme d'hétérodimères $\gamma\epsilon$ et $\delta\epsilon$, et de l'homodimère $\zeta\zeta$ du TCR (Weissman *et al.*, 1988) (fig. 5).

Les chaînes γ , δ et ϵ du complexe CD3, membres de la superfamille des Ig, ont un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique de plus de 40 acides aminés. La chaîne ζ du TCR est une protéine transmembranaire non glycosylée de 16 kDa exprimée généralement sous forme d'homodimère $\zeta\zeta$, mais un petit pourcentage de récepteur TCR contient l'hétérodimère $\zeta\eta$. La chaîne η est une protéine de 21 kDa, dérivée d'un épissage alternatif de l'ARNm de ζ (Baniyash *et al.*, 1988; Orloff *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 1990 ; Orloff *et al.*, 1990). Les chaînes ζ et η ont une région extracellulaire de seulement 9 acides aminés, une région transmembranaire de 21 acides aminés, et une longue queue cytoplasmique de 113 et 115 acides aminés respectivement (Weissman *et al.*, 1988; Baniyash *et al.*, 1989).

L'assemblage de toutes ces sous-unités est nécessaire pour l'expression du TCR (Weiss *et al.*, 1986; Clevers *et al.*, 1988; Weiss, 1991; Ashwell et Klausner, 1990). Bien que le complexe TCR/CD3 ne possède pas d'activité kinase intrinsèque, les chaînes γ , δ et ϵ du complexe CD3 et les chaînes $\zeta\zeta$ et $\zeta\eta$ associées au TCR, sont responsables de l'initiation des cascades de signalisation contribuant à l'activation des lymphocytes T (Wegener *et al.*, 1992; Irving et Weiss, 1991).

4-1.1 Le motif ITAM ; structure de base pour la transduction du signal du TCR

Les analyses par mutagenèse dirigées ont confirmé la présence d'un motif fonctionnel cytoplasmique de 18 à 25 acides aminés, qui est responsable de presque toutes les activités biologiques des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 (Reth, 1989). Le motif ITAM (Immune receptor Tyrosine-based Activation Motif) comprend une paire de séquences consensus Y-x-x-(L/I) séparées par 6 ou 8 acides aminés variables [Y-x-x-(L/I)₆₋₈Y-x-x(L/I)], il est présent en une copie dans chaque sous unité du complexe CD3 (Letourner et Klausner, 1992), en trois copies dans la chaîne ζ (Irving *et al.*, 1993) (fig. 5), et en deux copies dans la chaîne η (Clayton *et al.*, 1991). Les sites ITAM interagissent avec les protéines tyrosine

kinases (PTK) impliquées dans l'activation cellulaire et jouent donc un rôle important dans la transduction des signaux d'activation cellulaire de la membrane au noyau.

4-1.2 Co-récepteurs CD4, CD8, et CD28

Les récepteurs CD4 et CD8 sont deux glycoprotéines qui appartiennent à la superfamille des Ig (Williams et Barclay, 1988). Ces récepteurs sont spécifiques aux cellules T et séparent la plupart des lymphocytes T matures en deux populations mutuellement exclusives, les lymphocytes T auxiliaires (TH), qui expriment généralement le récepteur CD4, et les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui expriment le récepteur CD8.

Le récepteur CD4 est protéine de 55-67 kDa, alors que le CD8 peut être exprimé sous forme d'un hétérodimère composé des sous-unités α (34-38 kDa) et β (28-30 kDa), ou sous forme d'un homodimère α/α (Littman, 1987; Parnes, 1989). Les co-récepteurs CD4 et CD8 agissent pour augmenter l'avidité de l'interaction du complexe Ag/CMH avec le TCR en s'attachant aux molécules du CMH classe II et classe I respectivement (Marrack *et al.*, 1983; Biddison *et al.*, 1984; Parnes, 1989; Swain, 1983). Les co-récepteurs CD4 et CD8 peuvent transmettre des signaux indépendants aux cellules T. En effet, ces molécules sont associées physiquement avec la PTK Lck de la famille Src, à travers une courte séquence d'acides aminés de la région C-terminale des domaines cytoplasmiques de CD4 et de CD8 (Rudd *et al.*, 1988; Veillette *et al.*, 1988; Yao *et al.*, 1990; Veillette *et al.*, 1990; Shaw *et al.*, 1989, 1990; Turner *et al.*, 1990). L'interaction du complexe TCR/CD3 avec le CD4 ou le CD8 lors de l'attachement des cellules T aux APC résulte dans la phosphorylation des résidus tyrosines des chaînes de signalisation du CD3 et du TCR par Lck.

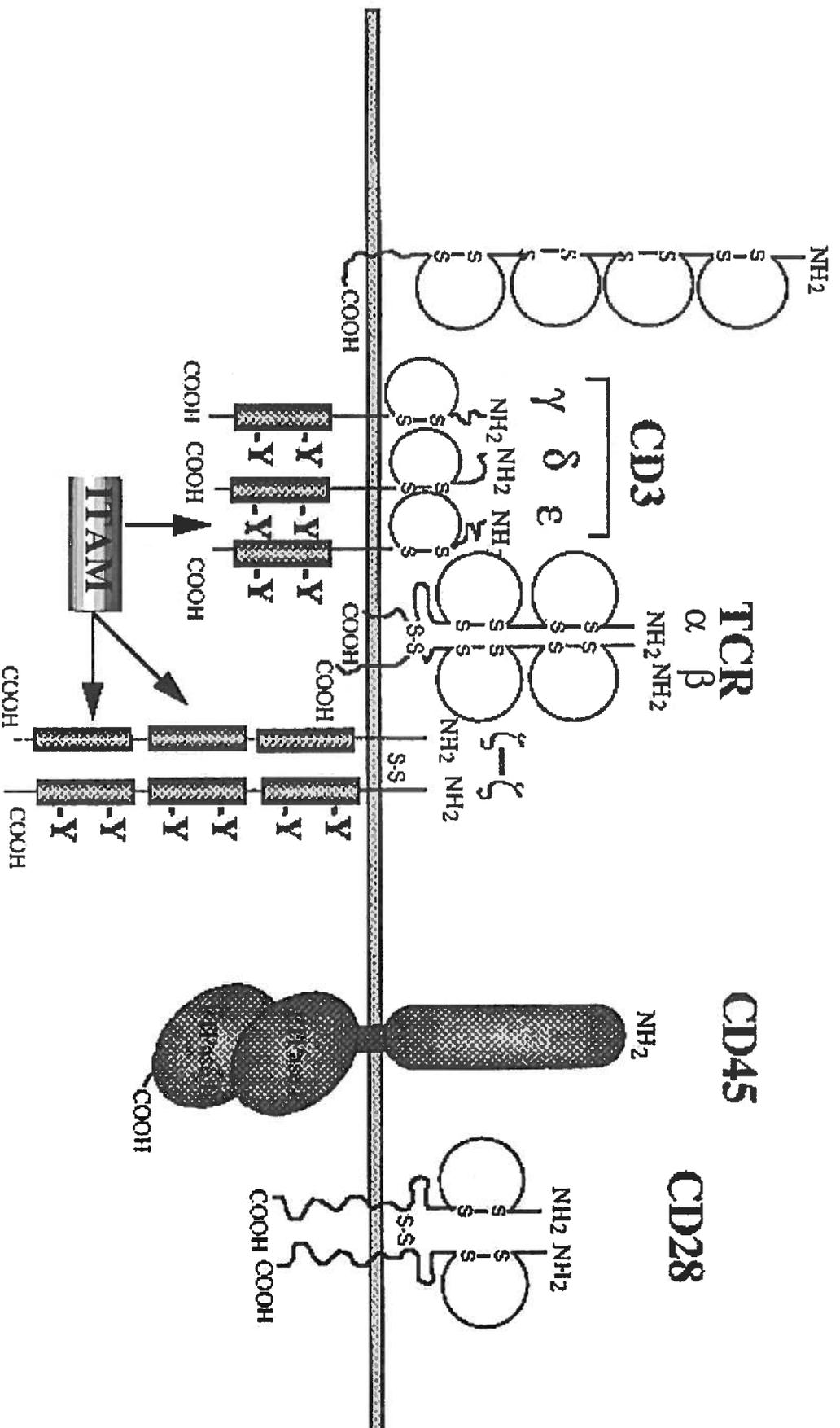
Le récepteur CD28 est une glycoprotéine homodimérique de la superfamille des Ig (fig. 5). Il est exprimé par 95 % des cellules T CD4⁺ et par 50 % des cellules CD8⁺ (June *et al.*, 1995). Le CD28 est le récepteur majeur de co-stimulation, qui suite à son interaction avec ses ligands CD80 (B7.1) et CD86 (B7.2) exprimés sur les APC génère des signaux qui

augmentent la transcription du gène de l'IL-2, contribuant ainsi à la prolifération des cellules T (June *et al.*, 1995; Ward, 1996; Rudd, 1996). Les molécules CD80 et CD86 sont des protéines homodimériques de la superfamille des Ig, elles sont exprimées exclusivement à la surface des APC telles les cellules dendritiques, les macrophages activés, et sur les cellules B activées (Thompson et Allison., 1997).

Figure 5. Structure du complexe TCR/CD3 et des molécules accessoires.

L'hétérodimère $\alpha\beta$ du TCR est associé de façon non covalente avec l'homodimère $\zeta\zeta$ du TCR et aux sous-unités du complexe CD3: γ , δ , et deux copies de ϵ . Les motifs ITAM sont présents en une copie dans chaque chaîne du CD3 et en triplicata dans les chaînes ζ du TCR. La figure montre également la structure du co-récepteur CD4, ainsi que la structure du récepteur CD28 et de la PTPase transmembranaire CD45.

CD4



4-2 Transduction des signaux à partir du TCR lors de l'activation des lymphocytes T

La stimulation du TCR par le peptide associé aux molécules du CMH déclenche une série d'événements de signalisation précoces conduisant à l'activation des PTK non associées au récepteur, et des protéines tyrosine phosphatases (PTPases). Ces événements conduisent au déclenchement d'une série d'événements biochimiques tardifs impliquant l'augmentation du calcium intracellulaire, l'activation de la PKC, et l'activation des MAP kinases. Ces événements conduisent à l'activation de la transcription des gènes des cytokines, et plus particulièrement le gène de l'IL-2 qui est indispensable pour la prolifération cellulaire.

4-2.1 PTK impliquées dans la signalisation du TCR

L'activation et/ou le recrutement des PTK est un des événements les plus précoces suite à la stimulation du TCR. Les lymphocytes T expriment les gènes d'au moins 15 PTK non associées au récepteur. Ces PTK cytoplasmiques appartiennent à 8 familles différentes. Src, Syk, Csk et Tec sont 4 familles de PTK cytoplasmiques impliquées dans la signalisation du TCR.

4-2.1.1 PTK de la famille Src et leur régulation

Les PTK de la famille Src comptent 9 membres, dont la structure comprend un domaine SH3 et un domaine SH2 hautement conservés (Bolen *et al.*, 1992; Mustelin et Burn, 1993). Ces domaines sont importants pour la régulation de la kinase et pour son interaction avec d'autres protéines cellulaires (Couture et Mustelin, 1996b). Le domaine catalytique ou domaine kinase (appelé également SH1) occupe la moitié de la région C-terminale de la molécule. Ce domaine est conservé parmi les membres de cette famille, et il est hautement homologue aux domaines catalytiques des autres PTK. En plus, tous les membres de cette famille contiennent un acide myristique attaché de façon covalente au résidu Gly-2 de leur extrémité N-terminale, ainsi qu'une queue C-terminale conservée

impliquée dans la régulation négative de leur activité kinase (Couture et Mustelin, 1996b). Les membres de cette famille diffèrent entre eux par leur région unique de 80-100 acide aminés localisée entre la Gly-2 et le domaine SH3 (fig. 6).

Dans les lymphocytes T, les PTK Lck, Fyn et peut être c-Yes, sont impliquées dans la signalisation du TCR. La protéine Lck de 56 kDa, est associée de façon non covalente aux domaines cytoplasmiques des co-récepteurs CD4 et CD8 (Rudd *et al.*, 1988; Veillette *et al.*, 1988), alors que la kinase Fyn de 59 kDa est associée constitutivement au complexe TCR/CD3 (Samelson *et al.*, 1986; Gassman *et al.*, 1992., Gauen *et al.*, 1992). La quantité de PTK Fyn associée au TCR/CD3 est cependant faible (Sarosi *et al.*, 1992). L'importance de Lck dans l'activation des cellules T a été bien démontré dans la lignée cellulaire JCaM1. La lignée cellulaire JCaM1 est une variante de la lignée cellulaire Jurkat qui n'exprime pas Lck (Strauss et Weiss, 1992). En effet, la stimulation du complexe TCR/CD3 exprimé à la surface des JCaM1, ne conduit pas à la phosphorylation des résidus tyrosines des protéines cellulaires telles que la chaîne ζ du TCR et la PLC γ , et ne conduit pas à l'expression du gène de l'IL-2 et à la prolifération cellulaire. Tous ces événements sont restaurés par la réexpression du gène *lck*. De plus, l'utilisation des souris transgéniques pour *lck* ainsi que des souris knock-out *lck*^{-/-} a démontré l'importance de Lck dans le développement thymique ainsi que dans la maturation et la fonction des cellules T (Cooke *et al.*, 1991; Molina *et al.*, 1992).

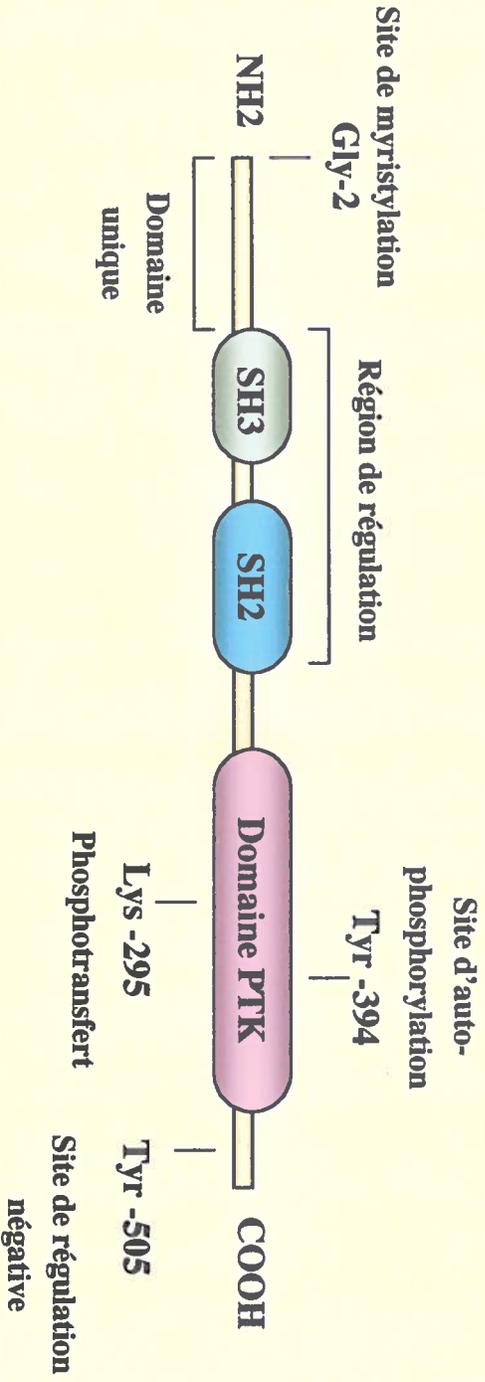
La régulation de l'activité enzymatique des PTK de la famille Src est achevée par la phosphorylation de résidus tyrosines conservés (fig. 6). Dans le cas de Lck, le résidu tyrosine Y394, localisé dans le domaine catalytique de l'enzyme, est phosphorylé lorsque Lck est active, un processus qui se produit par trans-auto phosphorylation. La queue C-terminale de Lck contient un autre site de régulation, Y505, qui est impliqué dans la répression de l'activité de l'enzyme. La PTK cytoplasmique Csk de 50 kDa, dont l'activité est aussi contrôlée par la stimulation du TCR (Oetken *et al.*, 1994), peut phosphoryler le résidu

Y505 *in vivo* et *in vitro* et maintien ainsi la PTK Lck dans une forme inactive. La PTK Csk est considérée comme un régulateur physiologique négatif des PTK de la famille Src (Nada *et al.*, 1991; Partanen *et al.*, 1991; Bergman *et al.*, 1992). D'autre part, CD45, une phosphatase transmembranaire hautement exprimée (fig. 5), peut déphosphoryler de façon efficace la queue C-terminale des PTK Lck et Fyn de la famille Src, et augmente ainsi leurs activités catalytiques suite à la stimulation du TCR (Mustelin *et al.*, 1989, 1992; Ostergaard *et al.*, 1989). L'ensemble des activités de Lck et Fyn dans une cellule T pourraient cependant être considéré comme le résultat des effets divergents des enzymes Csk et CD45 (Mustelin, 1994; Mustelin et Burn, 1993).

Figure 6. Structure de la PTK Lck de la famille Src.

La PTK Lck (pp56) de la famille Src contient un domaine SH3, un domaine SH2 ainsi qu'un domaine kinase PTK C-terminale (SH1). Les résidus tyrosine de régulation positive ou négative, et d'autres résidus ou régions fonctionnelles importantes sont indiqués.

Lck



4-2.1.2 Les PTK de la famille Syk

Contrairement à la famille des PTK Src, les PTK de la famille Syk contiennent deux domaines SH2 en tandem et un domaine kinase C-terminale SH1 (Taniguchi *et al.*, 1991; Chan *et al.*, 1992). Ces protéines ne sont pas myristilées, et ne contiennent pas de domaine SH3 ou des sites de régulation négatifs à leur extrémité C-terminale (fig. 8). Les PTK de la famille Syk incluent Zap-70 et Syk. La PTK Zap-70 est une protéine de 70 kDa qui est exprimée dans les cellules NK et dans cellules T où elle s'associe aux motifs ITAM phosphorylés des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 (Chan *et al.*, 1991, 1992).

La fonction de Zap-70 est cruciale pour l'activation et le développement des cellules T. En effet, les altérations génétiques du gène *zap* qui entraînent la perte de l'expression de la protéine Zap-70, empêchent toute activation antigénique des cellules T CD4⁺, inhibent la maturation des cellules CD8⁺ et conduisent à des immunodéficiences sévères (Arpaia *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1994b; Elder *et al.*, 1994). L'association et le recrutement de Zap-70 au complexe TCR/CD3 sont essentiels pour la transduction du signal d'activation cellulaire. En effet, les peptides capables d'empêcher l'association de la PTK Zap-70 avec la chaîne ζ du TCR, inhibent l'activation des cellules T via le TCR (Neumeister *et al.*, 1995; Wange *et al.*, 1995b).

4-2.1.2.1 Régulation de Zap-70 par les PTK de la famille Src

La fonction enzymatique de Zap-70 nécessite la présence de Lck (Chan *et al.*, 1992). Le recrutement de Zap-70 au complexe TCR/CD3 durant l'activation des cellules T se fait par l'intermédiaire de ses deux domaines SH2, qui reconnaissent et se lient aux deux résidus tyrosines phosphorylés adjacents localisés dans chaque motif ITAM des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3. La phosphorylation de ces résidus tyrosine se fait principalement par Lck (Van Oers *et al.*, 1996), bien que Fyn puisse jouer un rôle de phosphorylation dans certaines

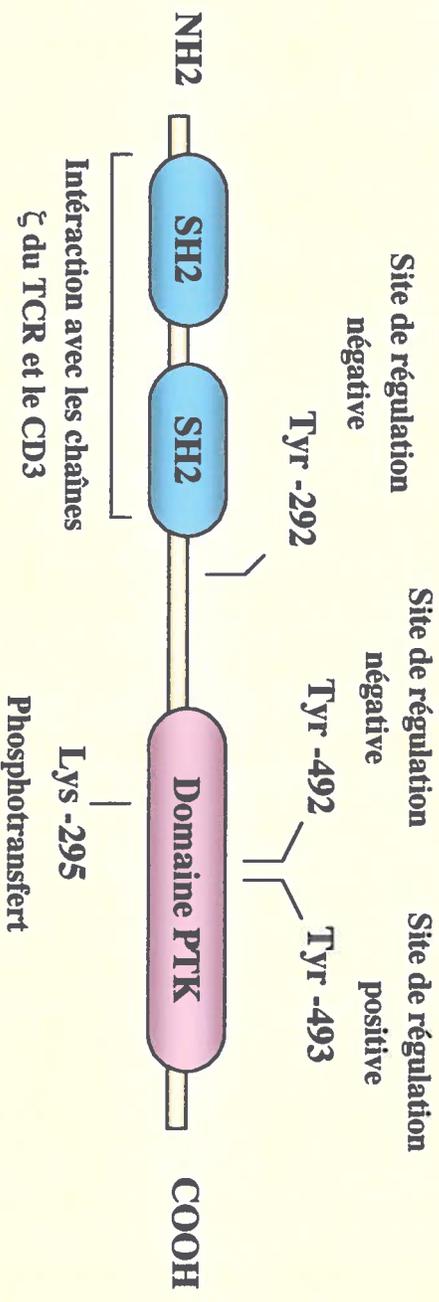
cellules. La phosphorylation différentielle des chaînes ζ du TCR résulte en la génération de deux formes phosphorylées de ζ , la p21 partiellement phosphorylée, et la p23 complètement phosphorylée. La p23 est présente seulement après l'activation productive de la cellule (Vignali et Strominger, 1994; Madrenas *et al.*, 1995; Sloan-Lancaster *et al.*, 1994).

Suite à la stimulation du TCR dans les cellules T, Zap-70 est recrutée au TCR où ses trois résidus tyrosines majeurs Y292, Y492, Y493 sont phosphorylés (Watts *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1995). Ces sites sont des sites de régulation positive ou négative pour la fonction de Zap-70 (Chan *et al.*, 1995; Wange *et al.*, 1995a; Kong *et al.*, 1996; Zhao et Weiss, 1996) (fig. 7). En effet, Zap-70 est incapable d'autophosphoryler son résidu tyrosine Y493 qui est le site de régulation positive correspondant au site d'autophosphorylation conservé des PTK (Chan *et al.*, 1995). Ce site est un bon substrat pour Lck *in vitro* (Watts *et al.*, 1994). Lorsque le site Y493 est phosphorylé par Lck, Zap-70 est activée et devient capable d'autophosphoryler d'autres résidus tyrosines, incluant Y492, un site qui diminue la régulation de l'activité enzymatique de Zap-70, ainsi que le site Y292 qui semble servir de site d'attachement pour une protéine inhibitrice (Wange *et al.*, 1995a; Chan *et al.*, 1995).

Figure 7. Structure de la PTK Zap-70 de la famille Syk.

La PTK Zap-70 de la famille Syk contient deux domaines SH2 et un domaine kinase (PTK) C-terminale. Les résidus tyrosine de régulation positive ou négative sont indiqués.

Zap-70



4-2.2 Cascades précoces de la transduction du signal à partir du TCR

Suite à la stimulation du TCR par le ligand spécifique, les résidus tyrosines des ITAM sont rapidement phosphorylés par les deux PTK Lck et /ou Fyn, qui sont associées de façon non covalente aux glycoprotéines de surface CD4/CD8 et au complexe TCR/CD3 respectivement (Rudd *et al.*, 1988; Veillette *et al.*, 1988; Iwashima *et al.*, 1994) (fig. 8). La phosphorylation de deux résidus tyrosine de chaque motif ITAM permet au module de servir de site de fixation pour les deux domaines SH2 de la PTK Zap-70 qui interagit de façon prédominante avec les ITAM phosphorylés des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 (Hatada *et al.*, 1995). Cette interaction permet à Lck d'interagir avec Zap-70 pour phosphoryler le résidu tyrosine 493 de régulation, et par conséquent l'activation catalytique de Zap-70 (Chan *et al.*, 1991, 1992; Kong *et al.*, 1996). Une fois ces événements précoces terminés, Zap-70 activée va permettre le recrutement et la phosphorylation de divers substrats cellulaires, incluant les protéines adaptateurs Lat (Zhang et Sloan-Lancaster, 1998), Vav, et SLP-76 (Jackman *et al.*, 1995; Raab *et al.*, 1997; Wardenburg *et al.*, 1996) (fig. 9). Ceci conduit à la formation de complexes multimoléculaires qui vont associer les PTK avec l'activation de la phospholipase $C\gamma 1$ (PLC $\gamma 1$) (Noh *et al.*, 1995), et avec l'activation de la protéine Ras et des MAP kinases Erk 1/2, JNK et p38 (Izquierdo *et al.*, 1993; Weiss et Littman, 1994; Rudd *et al.*, 1994; Franklin *et al.*, 1994).

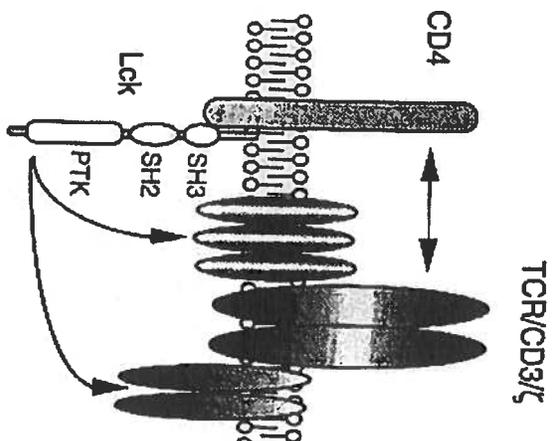
La phosphorylation des résidus tyrosine de la PLC $\gamma 1$ est un processus important pour l'augmentation de l'activité catalytique de cette enzyme (Weiss et Littman, 1994). La protéine tyrosine kinase spécifique qui active la PLC $\gamma 1$ n'est pas connue. Szamel et Resch (1995) ont rapporté que la PLC $\gamma 1$ s'associe directement avec le TCR pour être phosphorylée soit par Lck soit par Fyn. Alternativement, la PLC $\gamma 1$ peut être phosphorylée par Zap-70 via la protéine Lat (Isakov, 1993). Lat (pp36/38) est une protéine transmembranaire de type III, qui possède une petite région extracellulaire et une longue queue cytoplasmique (Weber *et*

al., 1998; Zhang *et al.*, 1998b). Lorsque Lat est phosphorylée par Zap-70, elle se lie directement aux protéines clefs telles la PLC γ 1 et Grb-2 (Izquierdo *et al.*, 1995). L'interaction de la protéine Lat avec la PLC γ 1 est importante pour le recrutement de la PLC γ 1 à la membrane plasmique où elle est phosphorylée par la PTK Zap-70. La PLC γ 1 phosphorylée devient active pour hydrolyser ses substrats, notamment les phospholipides inositols de la membrane plasmique (fig. 9). L'interaction de Lat avec Grb-2 est importante pour l'activation de la protéine Ras (Izquierdo *et al.*, 1995). Ras joue un rôle très important dans la régulation de la cascade des kinases sérine/thréonine qui activent les MAP kinases Erk 1 et Erk 2 (Cantrell, 1996). La protéine Lat recrute Grb-2 à la membrane cellulaire en interagissant avec le domaine SH2 de Grb-2 (McCormick, 1993). La protéine Grb-2 contient deux domaines SH3 qui peuvent se lier au facteur d'échange de guanine Sos (Izquierdo *et al.*, 1995). Ainsi, l'interaction de Grb-2 avec Lat permet de recruter le complexe Grb-2/Sos à Ras, pour l'activation de Ras après l'échange GDP/GTP catalysé par Sos, et du fait même permet l'initiation des événements de signalisation tardifs (fig. 9).

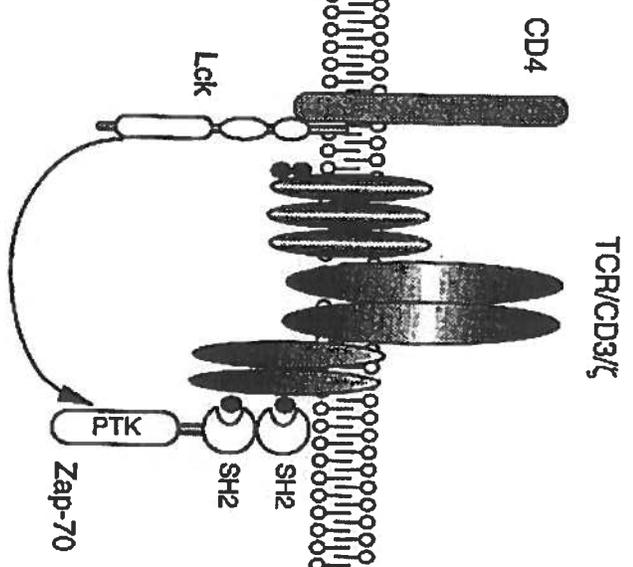
Figure 8. Représentation schématique des événements précoces de la transduction du signal du TCR.

- (1) La stimulation du TCR par l'Ag conduit à l'activation de Lck qui phosphoryle les ITAM du complexe TCR/CD3.
- (2) Les tyrosines phosphorylées des ITAM servent de site de fixation pour les domaines SH2 de Zap-70 résultant dans le recrutement de Zap-70 au TCR activé, facilitant ainsi sa phosphorylation et son activation par Lck et/ou Fyn.
- (3) Zap-70 activée recrute et phosphoryle d'autres substrats cellulaires (telle que Lat, Vav et la PLC γ 1) résultant dans l'activation des cascades de signalisation en aval.

1



2



3

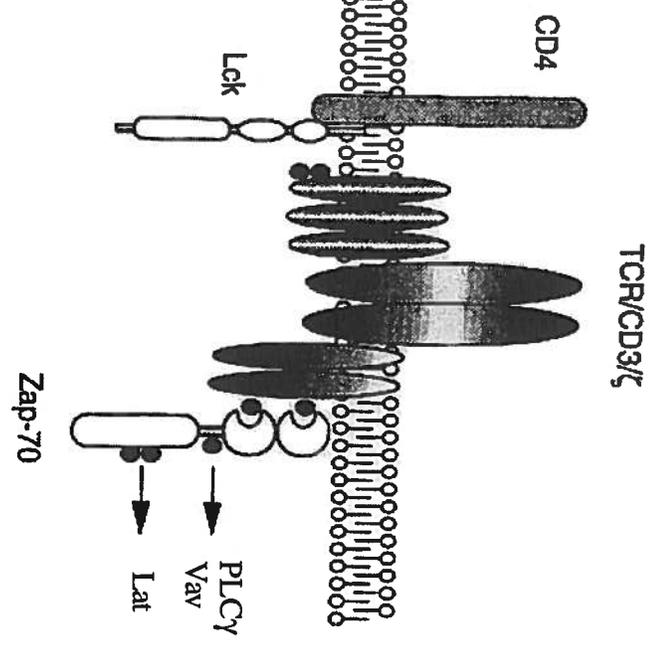
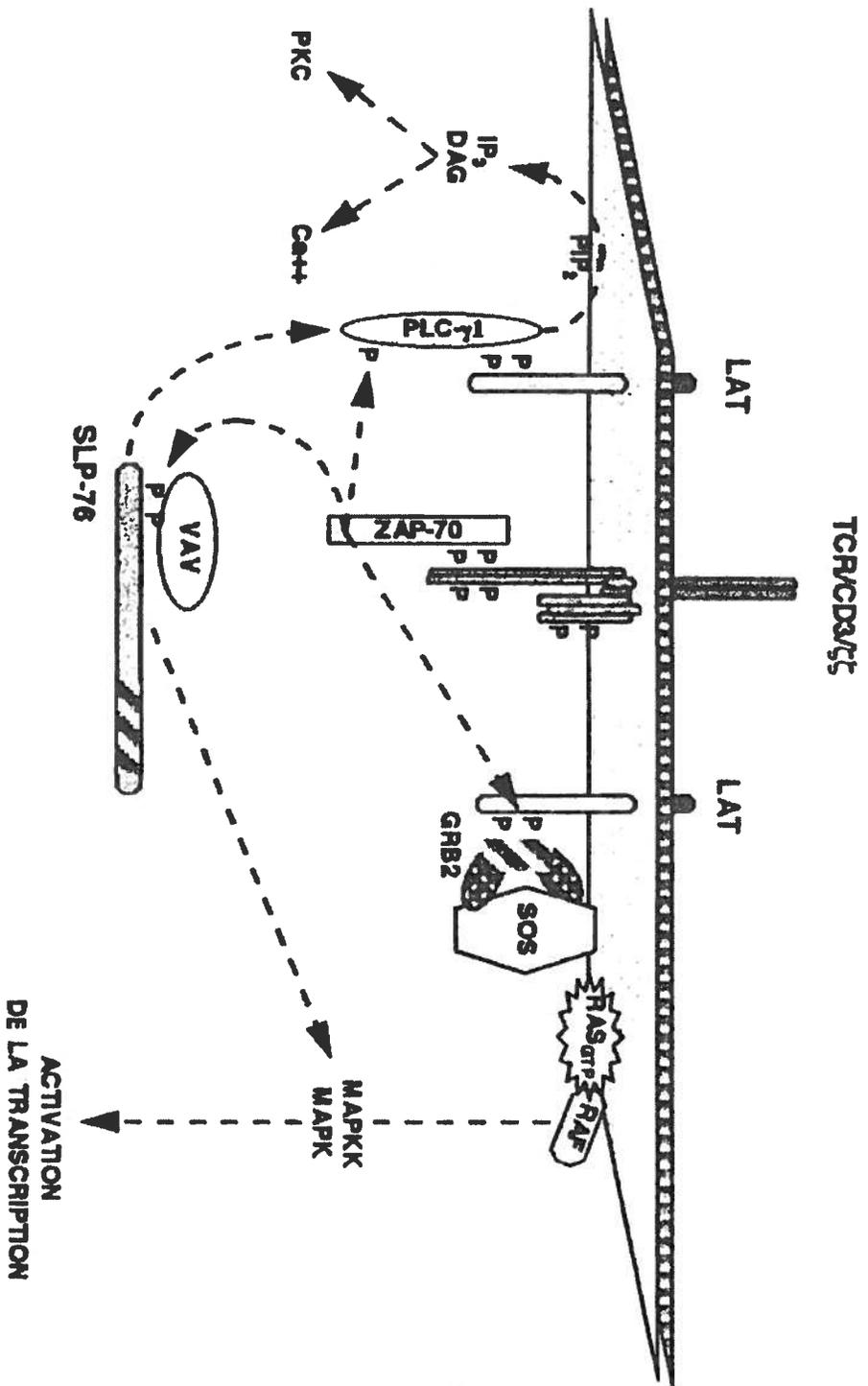


Figure 9. Représentation schématique des cascades d'activation de Ras et de la PLC γ 1.

Suite à la stimulation du TCR, Zap-70 est activée et phosphoryle un certain nombre de substrats, incluant Lat et SLP-76. Lorsque Lat est phosphorylée, elle recrute Grb-2 et la PLC γ 1 à la membrane de la cellule. Le recrutement de Grb-2 à Lat permet de localiser le complexe Grb-2/Sos à Ras, résultant dans l'activation de Ras. Le recrutement de la PLC γ 1 par Lat à la membrane plasmique résulte dans la phosphorylation et l'activation de la PLC γ 1 par la PTK Zap-70. L'activation de la PLC γ 1 et de Ras résulte dans le déclenchement des cascades tardives de signalisations essentielles pour l'activation de la transcription et la prolifération des cellules. **Réf. Clements *et al.*, 1999.**



4-2.3 Cascades tardives de la transduction du signal à partir du TCR

L'activation de la PLC γ 1 et de Ras entraîne le déclenchement d'autres cascades de signalisation en aval qui convergent vers le noyau, permettant l'activation des facteurs de transcription cellulaires tels le NF-AT, le NF- κ B et l'AP-1 responsables de l'activation du gène codant pour l'IL-2, qui en concert avec les cascades de co-signalisation conduisent à l'activation et la prolifération des cellules.

4-2.3.1 Cascades de signalisation dépendantes de la PLC γ 1

La phosphorylation et l'activation de la PLC γ 1 entraîne l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol 4,5 biphosphate (PIP₂), un phospholipide inositol membranaire, en deux produits important, le diacylglycerol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) (fig. 9). Une fois produit, le DAG et l'IP₃ initient deux cascades de signalisation nécessaires pour l'activation des facteurs de transcription cellulaires. La production de l'IP₃ déclenche l'augmentation rapide de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire dont un des effets est l'activation de la phosphatase calcineurine, calmodulin/calcium-dépendante. Cette phosphatase régule la transcription du gène de l'IL-2 en déphosphorylant la forme cytoplasmique inactive du NF-AT, permettant ainsi sa translocation vers le noyau (Jain *et al.*, 1995; Crabtree et Clipstone, 1994). La production du DAG active la protéine kinase C (PKC), capable de phosphoryler divers substrats cellulaires et de favoriser la dissociation du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) de son inhibiteur I κ B (Williams *et al.*, 1995). Les deux facteurs nucléaires entrent dans le noyau où ils participent à l'activation de différents gènes dont celui de l'IL-2.

4-2.3.2 Cascades d'activation des MAP kinases

Le terme cascades des MAP kinases (Mitogen-activated protein) inclut les cascades d'activation des kinases Erk (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal Kinase), et p38. La double phosphorylation est spécifique aux MAP Kinases (Mordret,

1993). La phosphorylation des MAP kinases est assurée par un groupe de protéines agissant comme MAP kinase kinases (MAPKK). Toutes les MAPKK sont activées par phosphorylation sur les résidus serine ou thréonine par un autre groupe de protéines agissant comme MAP kinase kinase kinases (MAPKKK). Les trois MAP kinases les mieux caractérisées sont Erk, JNK et la p38. Les MAP kinases Erk1/2 et JNK sont impliquées dans l'activation du facteur de transcription cellulaire AP-1, composé des protéines Fos et Jun. Le facteur AP-1 est indispensable pour l'activation du promoteur du gène de l'IL-2 (Su et Karin, 1996 ; Jain *et al.*, 1992b, 1993, 1995). La cascade de la MAP kinase p38 serait impliquée dans la fixation du facteur AP-1 et dans la synthèse de l'IL-2 (Raingeaud *et al.*, 1996).

4-2.3.2.1 Cascade d'activation des MAP kinases Erk

Le sous-groupe des kinases Erk (Erk 1 (p44), Erk 2 (p42) et Erk 5) se distingue des autres MAP kinases par le motif d'activation Thr-Glu-Tyr, qui peut être doublement phosphorylé (Derijard *et al.*, 1995). L'activation de Erk est assurée par l'oncogène Raf-1, une MAPKKK, dont l'activation dépend de la forme active de la protéine Ras liée à la GTP et de la PKC (Faris *et al.*, 1996; Pomerance *et al.*, 1992; Robbins *et al.*, 1992) (fig. 10). Ras est incapable elle-même de phosphoryler directement les MAPKKK Raf-1 ou MEKK, mais agit plutôt en recrutant Raf-1 et MEKK à la membrane où a lieu un autre événement d'activation encore inconnu qui permet la phosphorylation et l'activation de Raf-1 (Feig et Schaffhausen, 1994). Raf-1 active par la suite les MAPKK MAPK/Erk (MEK) 1 et 2, en les phosphorylant sur les résidus Ser-218 et Ser-222 (Dent *et al.*, 1992; Kyriakis *et al.*, 1992). Les MAPKK MEK 1 et 2, appelées aussi MKK 1 et 2, activent les MAP kinases Erk 1 et Erk 2 par phosphorylation directe des résidus thréonine et tyrosine du motif Thr-Glu-Tyr (Howe *et al.*, 1992; Ahn *et al.*, 1992). L'activation des kinases Erk 1 et Erk 2 permet leur translocation vers le noyau où elles vont phosphoryler et activer les facteurs de transcriptions nucléaires impliqués, entre autres, dans l'activation du promoteur du gène codant pour l'IL-2 (Pelech et Sanghera, 1992; Lenormand *et al.*, 1993). La MAP kinase Erk 2 phosphoryle et active le

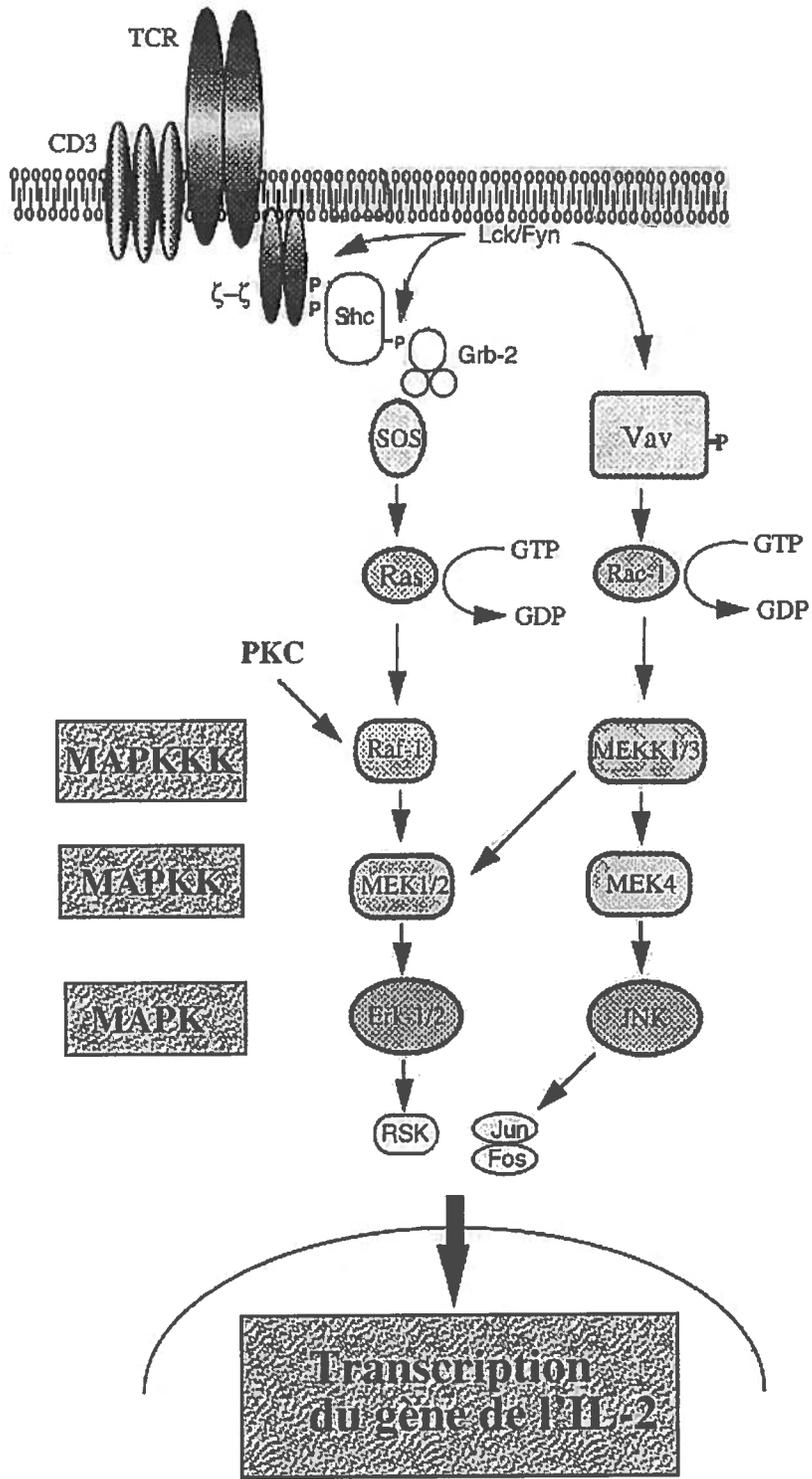
facteur de transcription nucléaire Elk-1 impliqué dans l'augmentation de la régulation de la transcription du gène *c-fos* (Frost *et al.*, 1994; Kortenjann *et al.*, 1994).

4-2.3.2.2 Cascade d'activation de la MAP kinase JNK

Le sous-groupe des MAP kinases JNK est caractérisé par une phosphorylation concomitante des résidus tyrosine et thréonine du motif Thr-Pro-Tyr (Derijard *et al.*, 1994). La MAP kinase JNK phosphoryle les résidus Ser/63 et Ser/73 de la région N-terminale c-Jun. Cette phosphorylation conduit à l'activation de c-Jun qui agira sur le facteur de transcription cellulaire AP-1 (Hibi *et al.*, 1993; Minden *et al.*, 1994b). L'activation de JNK dépend de l'activation de la protéine Ras, ainsi que des signaux provenant du récepteur de co-stimulation CD28 probablement via une autre kinase, la phosphatidylinositol 3'-hydroxyl kinase (PI-3) (Hibi *et al.*, 1993; Derijard *et al.*, 1994; Parker, 1995). Ces événements sont responsables de la mise en opération des petites protéines monomériques liées à la GTP telles que Rac1 et Cdc42 qui induisent probablement l'activation de la MAPKKK serine/thréonine MEKK1. La MAPKKK MEKK1 phosphoryle et active la MAPKK à double spécificité MKK4, appelée aussi MEK4, JNKK ou SEK 1. MKK4 phosphoryle et active par la suite JNK (Minden *et al.*, 1994a; Karin, 1995; Sanchez *et al.*, 1994) (fig. 10). Tournier *et al* (1997) ont cloné une autre MAPKK, MKK7, qui phosphoryle exclusivement la MAP kinase JNK.

Figure 10. Représentation schématique des cascades d'activation des MAP kinases Erk 1/2 et JNK.

L'engagement du TCR conduit à l'initiation des événements de signalisation précoces résultant dans l'activation des tyrosines kinases qui conduisent à l'activation de Ras via le complexe Grb-2/Sos. Ras et la PKC activent, en parallèle avec Rac-1, les MAP kinase kinase kinases (MAPKKK) qui phosphorylent les MAP kinase kinases (MAPKK) à double spécificité, ces dernières phosphorylent les MAP kinases (MAPK). Les MAP kinases activées phosphorylent d'autres substrats incluant les facteurs de transcription des gènes responsables de l'activation et de la prolifération cellulaire tel que le gène de l'IL-2.



4-3 Cascades de co-signalisation via le récepteur CD28

En plus des cascades de signalisation associées au TCR/CD3, des signaux co-stimulateurs sont requis pour l'activation et la prolifération des cellules T (June *et al.*, 1995; Lenschow *et al.*, 1996). En effet, la stimulation du TCR en absence du signal co-stimulateur généré par l'interaction du récepteur CD28 avec son ligand B7 (CD80/CD86), peut aboutir à l'inactivation fonctionnelle (Jenkins, 1994), à l'anergie (Harding *et al.*, 1992; Gimmi *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1993) ou à la mort cellulaire (Boise *et al.*, 1995; Colette *et al.*, 1997). La co-stimulation via le récepteur CD28 semble ainsi compléter les signaux dérivés du TCR en renforçant certaines cascades de signalisation et en induisant des signaux additionnels qui, ensemble, vont augmenter l'activation de la transcription du promoteur du gène codant pour l'IL-2, en particulier à travers JNK qui est requise pour la formation des complexes AP-1 (Jun-Fos) (Rudd, 1996).

Le récepteur CD28 ne dispose d'aucune activité enzymatique intrinsèque. Cependant, lorsque les cellules T sont stimulées par les ligands du TCR présentés par les APC fonctionnelles, le récepteur CD28 se lie à son ligand B7 et il est phosphorylé au niveau des résidus tyrosines de sa portion cytoplasmique. Ces résidus tyrosines phosphorylés vont servir de sites pour la liaison de différentes molécules impliquées dans l'activation cellulaire, comme la kinase PI-3 (Stephen *et al.*, 1993 ; Pages *et al.*, 1994). En effet, il a été démontré que les kinases Lck et Fyn de la famille Src s'associent physiquement avec le récepteur CD28. La kinase Lck montre une spécificité de phosphorylation particulière pour le motif pTyr173-Met-Asn-Met au niveau de la portion cytoplasmique du récepteur CD28. Lorsque le résidu Tyr173 est phosphorylé, le motif pTyr173-Met-Asn-Met se lie au domaine SH2 de la sous-unité régulatrice de la kinase PI-3 (Ward *et al.*, 1993; Prasad *et al.*, 1994 ; Pages *et al.*, 1994). Lorsque la kinase PI-3 est phosphorylée, elle active la protéine Rac-1, qui régule éventuellement la cascade d'activation de la kinase JNK (Parker, 1995; Coso *et al.*, 1995;

Minden *et al.*, 1995), qui en concert avec l'activation des MAP kinases à travers le TCR, augmente la transcription du gène codant pour l'IL-2 et ce, via la phosphorylation de la protéine c-Jun du facteur de transcription cellulaire AP-1 (Fraser *et al.*, 1991; Su *et al.*, 1994). L'activation de la MAP kinase JNK est un événement pivot entre les cascades de signalisation du TCR et la cascade de co-stimulation générée via le récepteur CD28, qui aboutissent toutes les deux à l'activation du promoteur du gène codant pour l'IL-2.

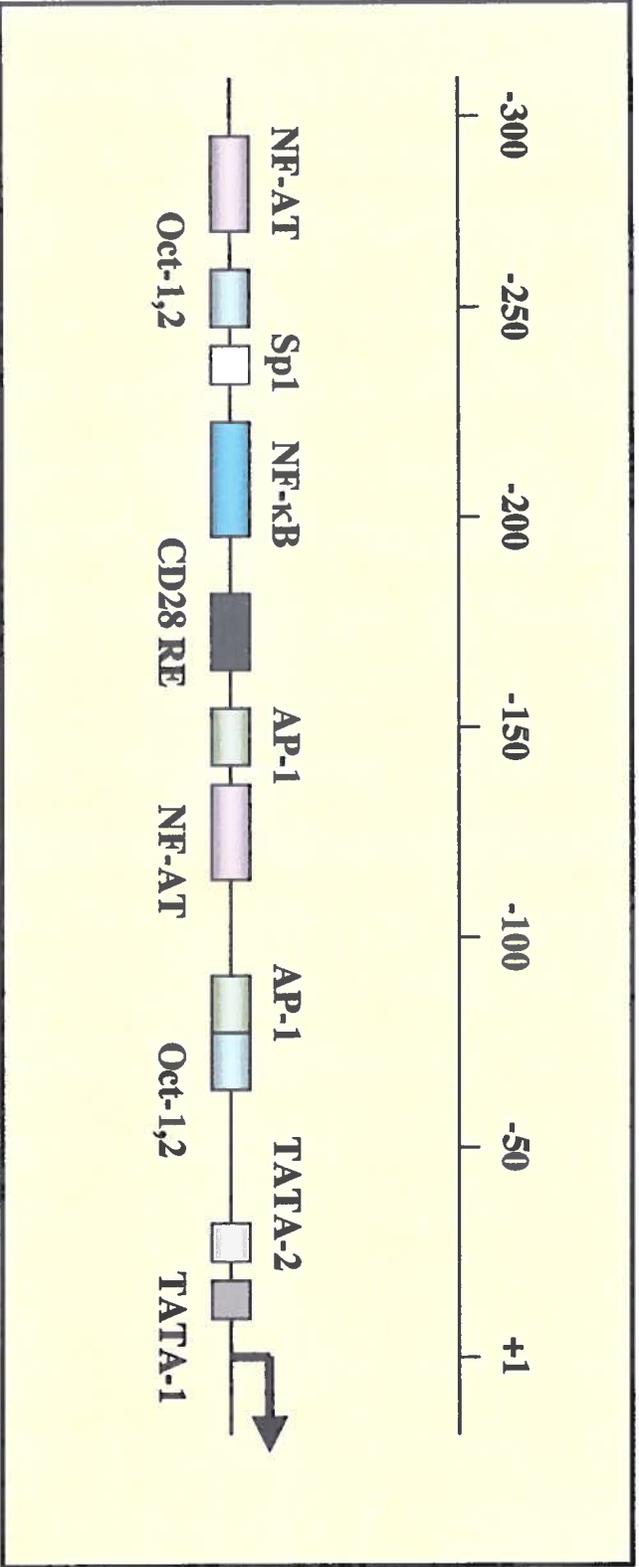
4-4 Activation du promoteur du gène codant pour l'IL-2

4-4.1 Facteurs de transcription cellulaire

La transcription du gène codant pour l'IL-2 est un événement clef dans l'activation et la prolifération des cellules T. L'activation du promoteur du gène de IL-2 est contrôlée par l'action coordonnée de plusieurs facteurs cellulaires incluant le NF-AT, l'AP-1, NF- κ B, Oct-1 et Oct-2 (protéines octamer-1 et 2) (Oct-1 et Oct-2), et SP-1 (Stimulatory protein-1) (Schreiber et Crabtree., 1992; Rao, 1994; Jain *et al.*, 1995). Le promoteur du gène de l'IL-2 comprend une région régulatrice d'environ 300 pb du côté 5' du site d'initiation de la transcription (fig. 11). Cette région renferme les séquences de fixation des facteurs nucléaires ubiquitaires constitutifs (Oct-1 et Oct-2). Certaines séquences fixent les facteurs ubiquitaires tels l'AP-1, NF- κ B et SP-1 induits dans les cellules T par la stimulation du TCR. D'autres séquences fixent les facteurs NF-AT et NFIL-2A exprimés uniquement dans les cellules T (Serfling *et al.*, 1995). Le NFIL-2A est composé de la protéine ubiquitaire Oct-1, et de la protéine inductible OAP (protéine activant Oct-1) spécifique aux cellules T (Crabtree et Clipstone, 1994). Le mécanisme d'activation de NFIL-2A n'est toujours pas élucidé. Il existe au moins deux sites de liaison riche en purine, capables de fixer les membres de la famille du NF-AT au niveau du promoteur du gène de l'IL-2 humain et murin (Brabletz *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1992); le site distal sur le promoteur du gène de l'IL-2 humain fixe, avec haute affinité, un complexe formé par les protéines NF-AT et un dimère AP-1 composé des protéines Jun et Fos. Une autre séquence dans le promoteur du gène de l'IL-2 est requise pour la co-stimulation de l'activité du promoteur IL-2 via le récepteur CD28 (Su *et al.*, 1994). Il s'agit de l'élément de réponse du CD28 (CD28RE), cependant, le ou les facteurs nucléaires qui se fixent à cette séquence ne sont toujours pas bien définis.

Figure 11. Structure du promoteur de l'IL-2.

Représentation schématique du promoteur de l'IL-2 de 300 pb montrant les différentes régions qui lient les facteurs de transcription cellulaire responsables de la régulation de la transcription du gène de l'IL-2. **Réf. Serfling *et al.*, 1995.**



4-4.2 Activation des facteurs de transcription cellulaire

L'activation des différents facteurs de transcription cellulaire impliqués dans l'activation du gène codant pour l'IL-2 est le résultat de l'activation de plusieurs cascades de signalisation synergiques suite à la stimulation du TCR. Une de ces cascades implique l'activation de la PLC γ 1, qui conduit à l'activation de la PKC et à l'augmentation de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire. Une telle augmentation de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire est responsable de l'activation de la phosphatase calcineurine qui contrôle la transcription du gène de l'IL-2, en déphosphorylant la forme cytoplasmique du facteur de transcription NF-AT permettant ainsi sa translocation vers le noyau pour s'associer à l'AP-1 et former un complexe transcriptionnel fonctionnel (Rao *et al.*, 1994; Bierer *et al.*, 1993; Bram *et al.*, 1993). Une autre cascade de signalisation nécessaire pour l'activation de la transcription du gène de l'IL-2 est celle impliquant la protéine Ras. L'implication de Ras a été démontré par l'utilisation du produit d'expression d'un mutant négatif dominant de Ras, capable d'inhiber la transcription du gène de l'IL-2, par rapport à l'utilisation de Ras active capable d'initier une cascade de signalisation qui rentre en synergie avec les signaux induits par la calcineurine pour l'activation de la transcription du gène de l'IL-2 (Izquierdo *et al.*, 1995; Baldari *et al.*, 1992; Rayter *et al.*, 1992; Woodrow *et al.*, 1993). La contribution de Ras dans l'activation du promoteur de l'IL-2 se traduit par son rôle dans l'activation des cascades des MAP kinase Erk et JNK qui jouent un rôle important pour l'activation du facteur AP-1 (Faris *et al.*, 1996 ; Parker, 1995).

Le groupe des facteurs de transcription AP-1 sont des dimères de type "leucine zipper" composés de protéines des familles Jun et Fos (Curran *et al.*, 1993). L'AP-1 est un facteur de transcription qui se fixe à des séquences du promoteur de l'IL-2 directement ou en complexe avec le facteur NF-AT (Jain *et al.*, 1992a, 1993, 1995). Les homodimères c-Jun ou les hétérodimères c-Jun/c-Fos stabilisent l'attachement du facteur NF-AT à l'ADN (Crabtree

et Clipstone, 1994). L'activité du facteur AP-1 peut être modulé positivement ou négativement par phosphorylation (Foletta *et al.*, 1998). Le niveau d'activité d'AP-1 est également dépendant de la quantité des protéines Jun et Fos présentes dans la cellule. En général, les cellules non stimulées contiennent des niveaux bas de la protéine c-Fos, mais aussi des niveaux substantiels de c-Jun et montrent donc une certaine activité basale AP-1 (due en particulier aux homodimères c-Jun) (Karin et Smeal., 1992). La phosphorylation par JNK de c-Jun sur les résidus Ser/63 et Ser/73 au niveau de son domaine N-terminale augmente son activité transcriptionnelle, sans pour autant augmenter son activité d'attachement à l'ADN (Jans, 1995 ; Hibi *et al.*, 1993 ; Karin et Smeal, 1992). La MAP kinase Erk 2 peut aussi phosphoryler c-Jun, mais seulement sur le résidu Ser/243 de la région C-terminale, près du domaine de liaison à l'ADN (Minden *et al.*, 1994; Minden *et al.*, 1995).

Le facteur de transcription NF- κ B appartient à la famille des protéines Rel/NF- κ B, et est composé de deux sous-unités, la p50 et la p65 (Gold et Matsuuchi, 1995). Dans les cellules au repos, le facteur de transcription NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par l'inhibiteur I κ B. Après la stimulation des cellules T, I κ B est hyperphosphorylée et par conséquent dégradée par le système ubiquitine-protéasome (Chen *et al.*, 1995 ; Hardy et Chaudhri, 1997). La phosphorylation d'I κ B permet au NF- κ B de se séparer de l'inhibiteur I κ B pour migrer dans le noyau et se fixer au promoteur de l'IL-2 afin d'activer la transcription du gène de l'IL-2 (Williams *et al.*, 1995).

5- Anergie des lymphocytes T

La stimulation productive des lymphocytes T nécessite non seulement l'engagement du TCR par le complexe CMH/peptide, mais dépend aussi de l'induction des signaux co-stimulateurs qui sont délivrés par les APC. Il a été démontré, dans une variété de systèmes expérimentaux, que la stimulation du TCR en absence de la stimulation du CD28 par son ligand conduit à un état d'anergie dans lequel les lymphocytes T sont vivants, mais ne répondent plus par prolifération ou par activation fonctionnelle, à la suite de la re-stimulation par l'antigène spécifique (Schwartz, 1996). À l'origine, l'induction de l'anergie clonale a été démontrée par stimulation des cellules CD4⁺ de clones TH1 humains avec les peptides antigéniques présentés par les APC fixées chimiquement (Jenkins et Schwartz, 1987), ou bien avec l'AcM anti-CD3 immobilisé (Jenkins *et al.*, 1990; Quill et Schwartz, 1987; Mueller *et al.*, 1989). L'anergie peut être induite, même en présence du signal co-stimulateur, à la suite de la stimulation du TCR par les agonistes faibles tels que les APL agonistes partiels présentés par les APC (Slon-Lancaster *et al.*, 1993) (fig. 12). L'anergie peut également être induite par l'IL-10 dans les cellules T CD4⁺ humaines fraîchement isolées (de Waal Malefyt *et al.*, 1993; Groux *et al.*, 1996), ou bien dans les clones de cellules T humaines en présence de très hautes concentrations de peptides antigéniques solubles (O'Hehir *et al.*, 1991; Lake *et al.*, 1993).

5-1 Anergie des cellules T par absence de co-stimulation

La stimulation du TCR par l'antigène spécifique en absence de la co-stimulation, conduit à l'anergie de la cellule T qui devient alors réfractaire à la re-stimulation par l'antigène spécifique, même si le signal co-stimulateur est fourni (Jenkins et Schwartz, 1987; Quill et Schwartz, 1987) (fig. 12). Les cellules rendues anergiques par absence de co-stimulation sont viables *in vitro* et continuent d'exprimer le récepteur de l'IL-2. Les cellules anergiques expriment également à leur surface le TCR et le récepteur CD4 (Quill et

Schwartz, 1987; Jenkins *et al.*, 1991). Dans les clones TH1 CD4⁺ et les clones CTL CD8⁺, l'état d'anergie est causé par une inhibition de la production de l'IL-2 (Schwartz 1996; Kang *et al.*, 1992; Otten et Germain, 1991). Ceci est dû probablement à l'inhibition de la synthèse de l'ARNm du gène de l'IL-2 puisque les cellules anergiques prolifèrent en présence de l'IL-2 exogène (Jenkins *et al.*; 1987 ; Beverly *et al.*, 1992). Par contre, la production des cytokines effectrices, telles que l'IL-4 et l'IFN- γ , nécessaires pour la différenciation des cellules TH1 et TH2, n'est pas affectée (Sloan-Lancaster *et al.*, 1994). Les cellules CD8⁺ anergiques, dont la production d'IL-2 est bloquée, maintiennent leur activité cytotoxique dépendante du TCR (Otten et Germain, 1991 ; Kuwano *et al.*, 1998).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de l'anergie ne sont pas bien connus, mais plusieurs événements biochimiques qui pourraient être responsable du maintien de l'état d'anergie ont été identifiés. L'analyse des événements de la transduction du signal induits dans les cellules rendues anergiques par absence du signal co-stimulateur révèle une augmentation de la concentration du phospholipide inositol 1,4,5-triphosphate, une augmentation précoce des niveaux du Ca²⁺ intracellulaire, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la PLC γ 1 (Jenkins *et al.*, 1987; Gajewski *et al.*, 1994). Des niveaux normaux de phosphorylation des chaînes ζ et γ du complexe TCR/CD3 ont aussi été observés (Beverly *et al.*, 1993). Par contre, ces cellules ne sont pas capables d'induire d'autres événements de transduction du signal du TCR, requis normalement pour l'induction de la sécrétion de l'IL-2. Faith *et al.*, (1997) ont en effet montré, après stimulation du TCR des cellules anergiques, l'absence d'augmentation du niveau de phosphorylation des PTK Lck et de Zap-70. De plus, l'activation de la protéine Ras est bloquée, ce qui conduit à une déficience dans l'activation des MAP kinases Erk et JNK dans ces cellules (Li *et al.*, 1996; Fields *et al.*, 1996; DeSilva *et al.*, 1996 ; Schwartz, 1997). Ceci a pour conséquence, l'inhibition de la formation et de la phosphorylation des complexes hétérodimériques AP-1 capables d'activer la transcription du promoteur du gène de l'IL-2 (Mondino *et al.*, 1996). La

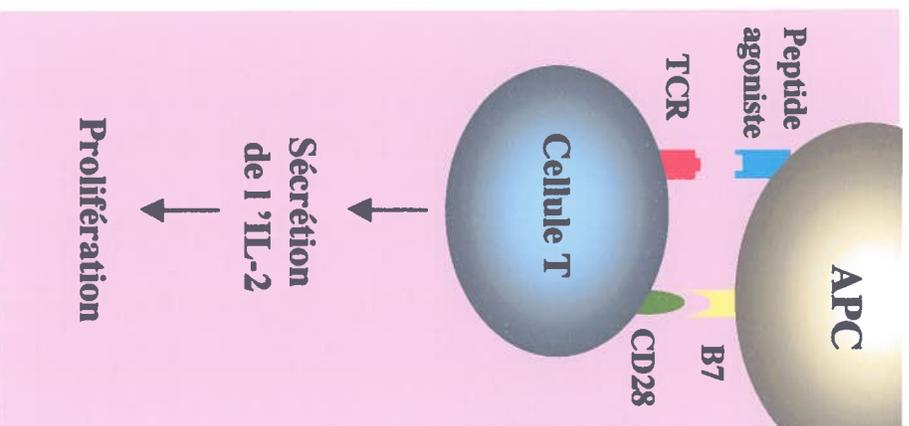
transactivation du gène de l'IL-2 par le facteur de transcription NF-AT est également inhibée dans ces cellules anergiques (Kang *et al.*, 1992). Une autre étude menée par Boussiotis et collaborateurs (1997) a montré que dans les cellules rendues anergiques par absence de co-stimulation, la PTK Fyn est phosphorylée et reste associée à la proto-oncoprotéine Cbl constitutivement phosphorylée. Cette association entre Fyn et Cbl serait responsable de l'élévation de l'activité de Rap-1, une petite GTPase qui antagonise l'activation de Ras et réprime activement la transcription du gène de l'IL-2 dans ces cellules anergiques, un processus qui peut être inhibé par la co-stimulation du CD28 (Reedquist et Bos, 1998).

En plus de l'inhibition de l'activation de Ras et de la diminution de la transactivation du promoteur du gène de l'IL-2 par les facteurs de transcription cellulaire AP-1 et NF-AT, trois autres facteurs régulateurs négatifs ont été décrits. Ces facteurs agissent en concert pour réprimer la transcription du gène de l'IL-2 dans les cellules rendues anergiques par absence de co-stimulation. Il s'agit d'une forme inactive du complexe AP-1, qui se lie à un site à la position -150 du promoteur de l'IL-2 et agit comme un inhibiteur négatif pour réprimer la transcription du gène de l'IL-2 dans les cellules anergiques (Kitagawa-Sakakida et Schwartz, 1996). Une autre protéine répressive se fixe à un site à la position -180 du promoteur de l'IL-2. La fixation de cette protéine est inhibée suite à l'activation normale des cellules T (Kitagawa-Sakakida et Schwartz, 1996; Serfling *et al.*, 1989; Garrity *et al.*, 1994). Finalement, la protéine répressive NII-2-a, membre de la famille des protéines répressives ZEB (zinc finger E box binding protein) (Genetta *et al.*, 1994), se lie à un élément de régulation négative (NRE-A) localisé à la position -105 du promoteur de l'IL-2 (Becker *et al.*, 1995). Dans les cellules T anergiques, le niveau de l'inhibiteur NIL-2-a augmente substantiellement, mais son action est antagonisée par le signal engendré par l'interaction du récepteur CD28 avec son ligand B7 (Schwartz, 1996; Becker *et al.*, 1995).

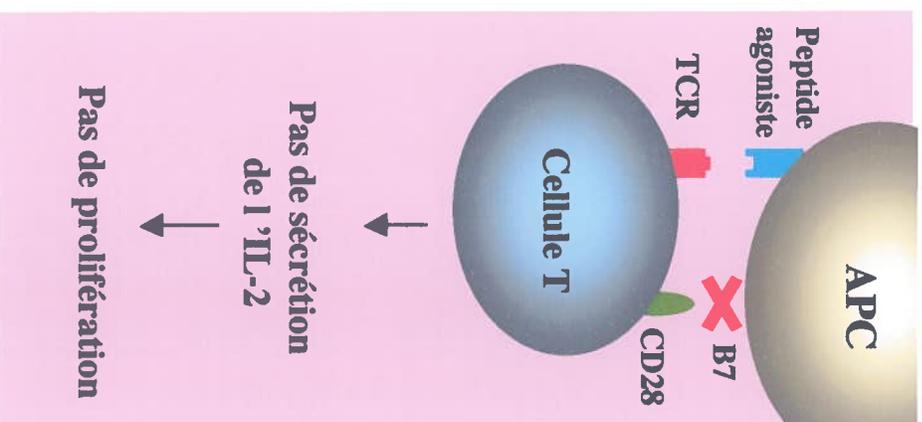
Figure 12. Règles d'activation des lymphocytes T et modèles d'anergie clonale.

Cette figure montre le modèle d'activation et de prolifération des cellules T après la stimulation avec le peptide agoniste en présence du signal co-stimulateur fourni par les APC (A). Sont également présentés deux modèles d'anergie clonale des lymphocytes T, par absence du signal co-stimulateur (B), ou par l'APL agoniste partiel en présence du signal co-stimulateur (C).

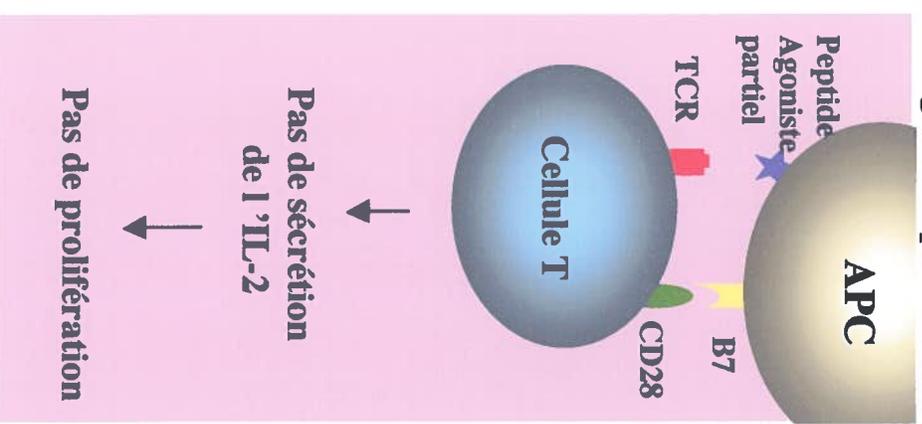
A) Stimulation productive



B) Anergie par absence de co-stimulation



C) Anergie par les APL agonistes partiels



5-2 Anergie des cellules T par les APL agonistes partiels

L'anergie des cellules T peut être induite par la présentation de ligands faibles tels que les APL agonistes partiels, et ce même en présence du signal co-stimulateur (Sloan-Lancaster *et al.*, 1994) (fig. 12). Un APL est un analogue du peptide antigénique (agoniste) dans lequel le site de contact avec le TCR a été altéré par au moins une substitution au niveau de sa séquence en acides aminés. L'altération de la reconnaissance de l'APL par le TCR, n'affecte ni son interaction avec la molécule du CMH, ni son interaction avec le TCR lui-même (Jameson et Bevan, 1995). Un APL antagoniste est un peptide qui n'induit aucune réponse cellulaire (Hoyer et Boddeke, 1993). Il peut inhiber compétitivement l'induction de la réponse cellulaire par le peptide agoniste en bloquant l'engagement de ce dernier avec le TCR (Jameson *et al.*, 1993; Racioppi *et al.*, 1993).

Un APL agoniste partiel est un peptide qui possède la capacité de se lier au TCR avec la même affinité que le peptide antagoniste, mais se distingue de ce dernier par sa capacité d'induire certaines activités cellulaires (Alexander *et al.*, 1993). Certains agonistes partiels peuvent induire la production de certaines cytokines et/ou l'activité cytotoxique, sans pour autant induire la prolifération des cellules T (Preckel *et al.*, 1998). Ce groupe inclut les APL agonistes partiels inducteurs d'anergie (Evavold et Allen, 1991; Evavold *et al.*, 1993 ; Jameson et Bevan, 1995).

Les APL agonistes partiels peuvent induire l'anergie clonale des cellules TH1 et TH2 (Sloan-Lancaster *et al.*, 1993, 1994a). En effet, il a été montré que la stimulation des cellules TH1 par les APL agonistes partiels anergiques présentés par les APC fonctionnelles peut stimuler l'activité cytotoxique et induire l'augmentation de l'expression de certaines molécules à la surface des cellules tel que le récepteur de l'IL-2 (Sloan-Lancaster et Allen, 1996; Jameson et Bevan, 1995). Cependant, ces cellules ne répondent plus par production de

cytokines ou par prolifération à la suite d'une restimulation par le ligand agoniste (Sloan-lancaster *et al.*, 1993).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'anergie induite par les APL anergiques ne sont pas bien caractérisés. Certaines études ont cependant montré que la stimulation des lymphocytes T avec les APL inducteurs d'anergie génère des événements de signalisation précoces modifiés. Ces événements sont caractérisés par la phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR (p21), par le recrutement de Zap-70 non phosphorylée et inactive aux chaînes ζ du TCR partiellement phosphorylées, et par la réduction significative de la phosphorylation des chaînes ϵ du complexe CD3 (Lancaster *et al.*, 1994; Madrenas *et al.*, 1995; Migita *et al.*, 1995 ; LaFace *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1998; Bouhdoud *et al.*, 2000). Des études plus poussées sont nécessaires pour mieux caractériser les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de l'anergie des cellules T par les APL anergiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- Clone cellulaire Een217

Les cellules Een217 sont des lymphocytes T cytotoxiques CD4⁺ humains non transformés, restreints à la molécule du CMH classe II HLA-DR4. Ce clone CTL est spécifique à un épitope délimité par les acides aminés 410-429 de la glycoprotéine de l'enveloppe, la gp120 de la souche PV22 du VIH-1.

1-1 Caractérisation du clone cellulaire Een217

À l'origine le clone cellulaire Een217 nous a été fourni par le laboratoire du Dr. R. Siliciano de l'université John Hopkins (Baltimore, MD, USA). Les cellules Een217 ont été établies en traitant les PBMC d'un donneur séronégatif, avec la gp120 recombinante de la souche PV22 du VIH-1 produite dans les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) (Muesing *et al.*, 1985; Lasky *et al.*, 1986, 1987). Les cellules T ayant répondu à la stimulation ont été récoltées puis stimulées avec les monocytes autologues irradiés pré-traités avec la gp120 recombinante avant d'être clonées sur un milieu semi-solide (two layer soft agar system) (Sredni *et al.*, 1980). Les colonies ont été par la suite repiquées et stimulées avec les monocytes autologues irradiés pré-traités avec la gp120 recombinante pour tester leur capacité de prolifération en réponse à l'antigène spécifique, gp120 recombinante. Les clones positifs ainsi sélectionnés sont re-stimulés toutes les semaines avec les monocytes autologues irradiés pré-traités avec la gp120 recombinante (Siliciano *et al.*, 1988).

La spécificité de restriction du clone cellulaire Een217 à la molécule du CMH classe II HLA-DR4 a été déterminée en utilisant comme cellules présentatrices de l'antigène (APC) une série de cellules L (fibroblastes) de souris exprimant différentes molécules du CMH classe II humain (Klohe *et al.*, 1988). Les réponses prolifératives des cellules Een217 ont été observées uniquement en présence des monocytes autologues ou en présence des fibroblastes exprimant la molécule HLA-DR4. L'activité cytotoxique des cellules Een217

dirigée contre des monocytes autologues pré-traités avec la gp120 recombinante de la souche PV22 du VIH-1 a été mesurée dans un test de cytotoxicité tel que décrit dans la section 5 de ce chapitre. L'utilisation, lors des tests de proliférations des monocytes autologues comme APC, et différents peptides synthétiques chevauchant la région délimitée par les a.a. 410-456 de la gp120 de la souche PV22 du VIH-1, ont permis de localiser l'épitope reconnu par les cellules Een217 à l'intérieur du segment de la gp120 délimité par les a.a. : 410-429 (fig. 13) (Siliciano *et al.*, 1988).

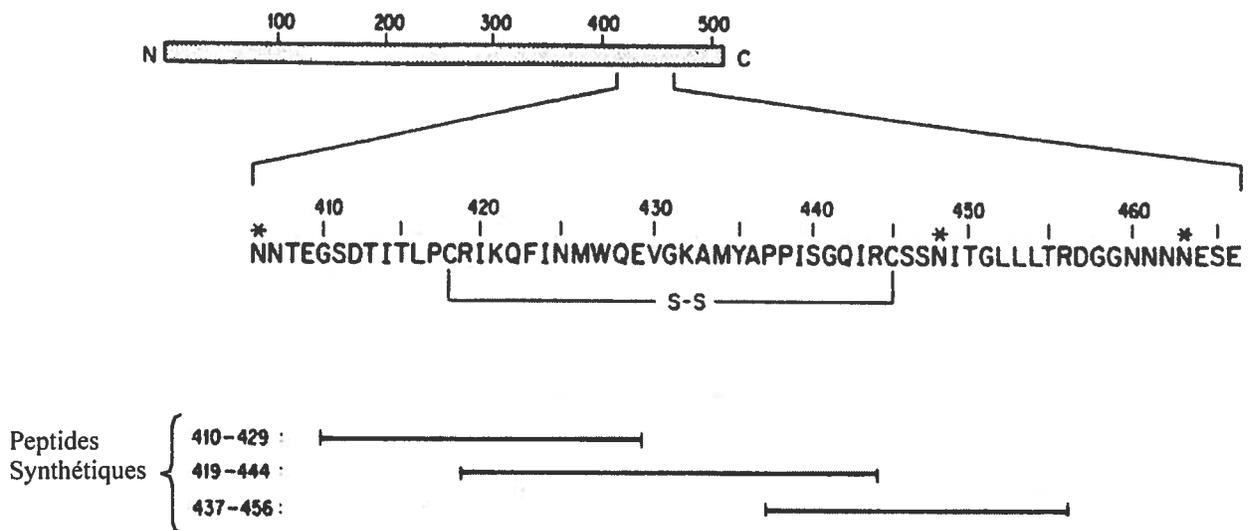


Figure 13. Séquence de l'épitope spécifique aux cellules Een217 au niveau de la gp120 du VIH-1 PV22.

Le fragment 410-456 de la gp120 contient un pont dissulfure interne et trois sites de N-glycosylation (*). L'épitope spécifique aux cellules Een217 est délimité par les a.a. 410-429 de la gp120. Réf. Siliciano *et al.*, 1988.

1-2 Propagation des cellules Een217

1-2.1 Conditions de culture

Les cellules Een217 ont été maintenues en culture à 37°C et 5 % de CO₂ dans du milieu RPMI 1640 (Gibco-BRL ; Montréal, Qc, Canada) contenant 10 % de sérum foetal de veau (SFV)(Gibco-BRL) décomplémenté, 50 µg/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine (Gibco-BRL), et 50 U/ml d'IL-2 humaine recombinante (IL-2hr) (Gibco-BRL). La croissance des cellules Een217 a été maintenue par des stimulations périodiques (2 à 3 semaines) avec le mitogène non spécifique, la phytohemagglutinine (PHA), et avec les PBMC allogéniques irradiées comme cellules nourricières.

1-2.1.1 Préparation des PBMC

Les PBMC ont été isolées à partir du sang de donneurs séronégatifs. Un volume de 20 ml de sang a été mélangé avec un volume égal de PBS 1 X (150 mM NaCl; 150 mM sodium phosphate [pH 7.4]) puis fractionnés par centrifugation à travers un gradient Ficoll Hypaque Plus (Pharmacia ; Qc, Canada) pendant 25 min à 800 x g. Les lymphocytes à la surface du gradient Ficoll ont été récoltés puis lavés 3 fois dans 10 ml du PBS 1 X. Les cellules ont été dispersées dans 5 ml de PBS 1 X puis irradiées (5000 Rads). Les lymphocytes irradiés ont été par la suite lavés 2 fois dans 10 ml de PBS 1 X contenant 2 % de SFV, 0.5 % de glucose et 12 mM Hepes [pH 7.2] avant d'être utilisées pour la stimulation des cellules Een217.

1-2.1.2 Procédure de stimulation et de propagation des cellules Een217

Les cellules Een217 ont été mises en culture dans des plateaux 24 puits à raison de 2.5x10⁵ cellules/puits, en présence de 0.5-1.0x10⁶ PBMC irradiées, dans du milieu de culture complet contenant 2 µg/ml de PHA (Sigma Bio.Science ; St. Louis, MO, USA). Deux jours après la stimulation, le milieu contenant la PHA a été remplacé par le milieu de culture frais

sans PHA. Cinq jours après la stimulation, les lymphocytes T ont été récoltés, lavés 2 fois dans 10 ml de milieu de culture complet, puis remises en culture dans des plateaux 24 puits mais cette fois à une densité de $2.5-5.0 \times 10^5$ cellules/ml, dans un volume final de 2 ml/puits. Les passages cellulaires ont été effectués de cette manière, par intervalle de 3 jours. Les cellules Ee217 se divisent une première fois 5 jours après la stimulation par la PHA, et une deuxième fois au bout de 7 à 10 jours après la stimulation. Après une période de repos de 2 à 3 semaines en absence de la PHA, les cellules sont utilisées dans nos expériences. Pour leur propagation, les cellules Ee217 ont été re-stimulées de cette manière toutes les 2 à 3 semaines.

2- Les fibroblastes L164.8 HLA-DR4⁺ utilisés comme APC

Lors des tests de prolifération et de cytotoxicité, nous avons utilisé comme APC les cellules L164.8 HLA-DR4⁺, des fibroblastes de souris exprimant de manière stable la molécule du CMH humain de classe II HLA-DR4 (DW10). Les fibroblastes L164.8 HLA-DR4⁺ nous ont été fournis par le laboratoire du Dr. R. Siliciano de l'université John Hopkins. À l'origine, c'est le groupe d'Okayama et Berg (1983), Klohe *et al.*, (1988) qui ont réussi à établir cette lignée cellulaire après co-transfection des fibroblastes exprimant les molécules accessoires B7 (CD80/CD86) avec les cDNA des chaînes α et β de la molécule du CMH humain classe II HLA-DR4 (DW10) et avec le plasmide pSV2 contenant le gène de résistance à la néomycine. L'expression de la molécule HLA-DR4 à la surface des fibroblastes est vérifiée par cytométrie de flux.

Les fibroblastes HLA-DR4⁺ ont été maintenus en culture à 37°C et 5 % de CO₂ dans le milieu Eagles MEM (Gibco-BRL) contenant 10 % de SFV, 50 µg/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, et 250 µg/ml de généticine (G418). Lors des passages cellulaires (tous les 5 jours), les fibroblastes sont trypsinés et remis en culture à une densité de 10^4 cellules/ml.

3- Peptides synthétiques ; synthèse et purification

Les séquences en acides aminés des peptides synthétiques utilisés dans cette étude sont dérivées de glycoprotéine de l'enveloppe, la gp120 de 5 souches différentes du VIH-1 ; il s'agit des souches PV22 (GSDTITLPCRILKQFINMWQE), HXB2 (GSDTITLPCRILKQIINMWQK), CDC42 (TGDIITLPCRILKQIINRWQV), EL1 (TNTNITLQCRILKQIIKMOVAG) et Z3 (CTGNITLPCRILKQIINMWQE). Les séquences de ces peptides correspondent aux séquences de l'épitope CTL 13 au niveau de la gp120 : a.a. 410-429. Ces peptides ont été synthétisés au Centre de Biotechnologie Sheldon de l'université McGill (Montréal, Qc, Canada). Les peptides bruts obtenus ont été purifiés par HPLC puis analysés pour leur homogénéité par chromatographie sur couche mince. La composition en acides aminés de ces peptides a été déterminée par hydrolyse acide alors que leur poids moléculaire a été déterminé par spectrométrie de masse. La pureté des peptides synthétisés a été vérifiée par HPLC.

4- Test de prolifération par incorporation de la thymidine tritiée ($[^3\text{H}]\text{TdR}$)

La prolifération des cellules Ee217 en réponse aux peptides synthétiques dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1 a été mesurée, en absence de l'IL-2hr, en utilisant comme APC les fibroblastes HLA-DR4⁺. Les fibroblastes ont été mis en culture dans les boîtes de pétris pendant 24 h à 37°C, puis récoltés et irradiés (5000 Rads). Après irradiation, les fibroblastes ont été lavés deux fois dans 10 ml de milieu de culture, puis distribués dans des plateaux 96 puits (3×10^4 cellules/puits) seuls ou avec des concentrations allant de 10^{-5} M à 10^{-12} M de chacun des peptides variants, dans un volume final de 100 μl /puits. Après une incubation de 16 h à 37°C, les cellules ont été lavées deux fois dans 10 ml de milieu de culture pour éliminer l'excédant des peptides. Les cellules Ee217 ont été par la suite ajoutées à raison de 5×10^4 cellules/puits, dans un volume final de 200 μl de milieu de culture. Après 24 h d'incubation à 37°C, 1 μCi de $[^3\text{H}]\text{TdR}$ (Mandel ; ON, Canada), dans 50 μl de milieu de culture, a été ajouté à chaque puits. Après 48 h d'incubation à 37°C, les cellules ont été récoltées sur filtres en fibres de verre et lavées en utilisant le récolteur de cellules automatique (Skatron Cell harvester ; Sterling, VA, USA). Les filtres ont été séchés à 50°C pendant 20 min, incubés pendant 3 h dans le liquide à scintillation, et la radioactivité incorporée par les cellules a été mesurée sur un compteur à scintillation beta (Beckman ; ON, Canada).

La radioactivité incorporée est directement proportionnelle à la prolifération des cellules Ee217 en réponse à la stimulation. Toutes les conditions ont été testées en triplicata. Puisque la prolifération maximale des cellules Ee217 a été obtenue lorsque les cellules ont été traitées avec 10^{-8} M du peptide dérivé de la souche sauvage PV22 du VIH-1 (peptide agoniste PV22), toutes les expériences de stimulation productive par ce peptide ont été performés en utilisant cette concentration.

5- Test de cytotoxicité

L'activité cytotoxique dirigée par les cellules Ee217 contre les cellules cibles présentant les peptides synthétiques dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1 a été mesurée, en absence de l'IL-2hr, dans un test de relargage du ^{51}Cr . Les fibroblastes HLA-DR4⁺ ont été utilisés comme cellules cibles. Les fibroblastes (2×10^6 cellules/ml) ont été pré-incubés, pendant 16 h à 37°C dans le milieu de culture en absence des peptides ou avec des concentrations allant de 10^{-5} M à 10^{-11} M de chacun des peptides variants. Les fibroblastes ont été par la suite lavés dans 10 ml de milieu de culture, puis incubés pendant 90 min à 37°C, en présence de 100 μCi du $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Mandel) dans 1 ml de milieu de culture. Les cellules ainsi marquées au ^{51}Cr ont été lavées 3 fois dans 10 ml de milieu de culture et distribuées dans les plateaux 96 puits à raison de 10^4 cellules/puits, dans un volume final de 100 μl de milieu de culture. Les cellules Ee217 ont été ajoutées à raison de 2×10^5 cellules/puits dans un volume final de 200 μl /puits de façon à avoir un ratio cellules effectrices: cellules cibles de 20:1. Les plateaux ont été centrifugés à 800 x g pendant 1 min pour favoriser le contact cellulaire. Après une incubation de 6 h à 37°C, les plateaux ont été centrifugés à 800 x g pendant 5 min à 4°C et 100 μl de surnageant a été récolté de chaque puits. La radioactivité relâchée a été mesurée sur compteur à scintillation gamma (Beckman ;) et le pourcentage de lyse spécifique a été calculé selon la formule suivante: $[(E - C)/(M - C)] \times 100$, avec E qui correspond à la valeur de la radioactivité relâchée expérimentale, C qui correspond à la valeur de la radioactivité relâchée spontanée et M qui correspond à la valeur de la radioactivité relâchée maximale. La valeur C est déterminée en calculant la moyenne de la radioactivité relâchée dans les puits contenant 100 μl de milieu de culture à la place des cellules effectrices, et la valeur M est déterminée en calculant la moyenne de la radioactivité relâchée dans les puits où les cellules cibles ont été lysées avec 100 μl de Triton X-100 à 0.5 %. Toutes les conditions ont été testées en triplicata.

6- Test d'induction d'anergie des cellules Een217 par les peptides synthétiques dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1

Nous avons testé l'induction de l'anergie des cellules Een217 par les peptides variants, en absence de l'IL-2hr, selon le protocole décrit par Sloan-Lancaster *et al.*, 1993. Ainsi, les fibroblastes HLA-DR4⁺ irradiés (5000 rads) ont été lavés deux fois dans 10 ml de milieu de culture puis distribués dans des plateaux de culture 24 puits (5×10^5 cellules/puits) en absence de peptides ou en présence de 10^{-8} M de chacun des peptides variants dans un volume final de 700 μ l. Après 16 h d'incubation à 37°C, les cellules ont été lavées deux fois dans 10 ml de milieu de culture pour éliminer l'excédant des peptides. Les cellules Een217 ont été par la suite ajoutées à raison de 5×10^5 cellules/puits, dans un volume final de 1 ml de milieu de culture. Après 48 h de co-incubation pour favoriser l'induction de l'anergie, les cellules Een217 ont été séparées des fibroblastes par centrifugation sur gradients de Ficoll Hypaque Plus à 400 x g pendant 25 min. Les cellules Een217 récoltées ont été lavées 3 fois dans 10 ml de milieu de culture et ensuite distribuées dans des plateaux 24 puits à raison de 5×10^5 cellules/puits, dans un volume final de 1ml de milieu de culture. Après 48 h de repos à 37°C, les cellules Een217 ont été testées pour leur capacité de prolifération en réponse à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 à 10^{-8} M tel que décrit dans la section 4 de ce chapitre. Ces expériences ont toutes été effectuées en triplicata.

7- Test de stimulation des cellules Ee217 avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28

Nous avons testé la prolifération des cellules Ee217 en réponse à la stimulation par les anticorps monoclonaux (AcM) anti-CD3 ⊕ anti-CD28, en absence de l'IL-2hr, selon le protocole décrit par Jenkins *et al.*, 1990. Afin d'immobiliser l'AcM anti-CD3, 1 µg d'antisérum de chèvre dirigé contre les immunoglobulines murines (GAM Ig) IgG, IgA et IgM (chaînes lourdes et chaînes légères) (Zymed Laboratories Inc ; San Francisco, CA, USA) a été étalé dans chacun des puits d'un plateau de 96 puits. Après 2 h d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés deux fois avec du PBS 1X, et ensuite des doses croissantes de l'AcM anti-CD3 (0.15 à 5 ng) (Clone UCHT-1, Immunotech, Coulter ; Marseille, France) ont été ajoutées dans chaque puits, dans un volume de 200 µl de PBS 1X. Après 16 h d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés deux fois avec du PBS 1X. Les sites n'ayant pas fixé d'anticorps ont été bloqués avec du RPMI 1640 contenant 10 % de SFV (100 µl/puits). Après 1 h d'incubation à 37°C, l'AcM anti-CD28 (Clone CD28.2, Immunotech, Coulter) a été ajouté (0.1 µg/puits) en même temps que les cellules Ee217 (5×10^4 cellules/puits), dans un volume final de 200 µl de milieu de culture. Les plateaux ont été incubés 24 h à 37°C avant l'ajout de 1 µCi de [³H]TdR dans chaque puits. La prolifération des cellules Ee217 a été déterminée, après 48 h d'incubation à 37°C, en mesurant la radioactivité incorporée par les cellules tel que décrit dans la section 4 de ce chapitre. Ces expériences ont toutes été effectuées en triplicata.

Puisque la prolifération maximale des cellules Ee217 est obtenue lorsque les cellules sont traitées avec 2.4 ng d'AcM anti-CD3 plus 0.1 µg d'AcM anti-CD28, les expériences de stimulations productives par les AcM ont été réalisées en utilisant ces concentrations.

8- Test d'induction d'anergie des cellules Ee217 par l'AcM anti-CD3 immobilisé

L'anergie par l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAMIg a été induite, en absence de l'IL-2hr, selon le protocole décrit par Jenkins *et al.*, 1990. Afin d'immobiliser l'AcM anti-CD3, 1 µg de GAMIg a été étalé dans chacun des puits d'un plateau 24 puits. Après 2 h d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés deux fois avec du PBS 1X et par la suite, des doses croissantes de l'AcM anti-CD3 (0.15 à 5 ng) ont été ajoutées dans chaque puits, dans un volume de 200 µl de PBS 1X. Après 16 h d'incubation à 37°C, les puits ont été lavés deux fois avec du PBS 1X, et les cellules Ee217 (5×10^5 cellules/puits) ont été ajoutées dans un volume final de 1 ml de milieu de culture. Après 48 h d'incubation des cellules Ee217 en présence de l'AcM anti-CD3 pour favoriser l'induction de l'anergie, les cellules Ee217 ont été récoltées, lavées 3 fois avec 10 ml de milieu de culture puis distribuées dans des plateaux 24 puits (5×10^5 cellules/puits) dans un volume final de 1 ml de milieu de culture. Après 48 h de repos à 37°C, les cellules Ee217 ont été testées pour leur capacité de prolifération en réponse à la stimulation avec les AcM anti-CD3 (2.4 ng) ⊕ anti-CD28 (0.1 µg) tel que décrit dans la section 7 de ce chapitre. La capacité de prolifération des cellules Ee217 a également été évaluée en réponse à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 à des concentrations allant de 10^{-6} M à 10^{-10} M tel que décrit dans la section 4 de ce chapitre.

9- Tests de réversion et de prévention de l'état d'anergie par l'IL-2hr exogène

Nous avons testé la capacité de l'IL-2hr exogène à reverser ou à prévenir l'état d'anergie des cellules Ee217 induite par le ou les peptides anergiques et par l'AcM anti-CD3.

9-1 Réversion de l'état d'anergie

Les cellules Ee217 ont été pré-traitées avec les peptides variants anergiques (concentration inductrice d'anergie) telle que décrit dans la section 6, ou avec l'AcM anti-CD3 (dose inductrice d'anergie) telle que décrit dans la section 8 de ce chapitre. Les cellules Ee217 rendues ainsi anergiques ont été lavées 3 fois dans 10 ml de milieu de culture et resuspendues en présence de l'IL-2hr à 50 U/ml, puis distribuées dans des plateaux 24 puits (5×10^5 cellules/puits) dans un volume final de 1 ml. Après 48 h de culture à 37°C en présence de l'IL-2hr pour reverser l'anergie, les cellules ont été récoltées et lavées deux fois dans 10 ml de milieu de culture sans IL-2hr et ensuite testées pour leur capacité de prolifération en réponse à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 à 10^{-8} M tel que décrit dans la section 4 de ce chapitre, et avec les AcM anti-CD3 (2.4 ng) \oplus anti-CD28 (0.1 μ g), tel que décrit dans la section 7 de ce chapitre. Toutes les conditions ont été testées en triplicata.

9-2 Prévention de l'état d'anergie

Pour prévenir l'état d'anergie des cellules Ee217, l'IL-2hr exogène (50 U/ml) a été ajoutée pendant les premières 48 h du pré-traitement des cellules Ee217 avec les peptides anergiques ou avec l'AcM anti-CD3. Les cellules ont été par la suite lavées 3 fois dans le milieu de culture et resuspendues en absence de l'IL-2hr, puis distribuées dans des plateaux 24 puits (5×10^5 cellules/puits) dans un volume final de 1 ml. Après 48 h de culture à 37°C, les cellules Ee217 ont été récoltées et lavées deux fois dans 10 ml de milieu de culture sans

IL-2hr et ensuite testées pour leur capacité de prolifération en réponse à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 à 10^{-8} M tel que décrit dans la section 4 de ce chapitre, et à la stimulation avec les AcM anti-CD3 (2.4 ng) \oplus anti-CD28 (0.1 μ g) tel que décrit dans la section 7 de ce chapitre.

10- Niveau de production de l'IL-2 par les cellules Een217

Le niveau de production de l'IL-2 par les cellules Een217 a été dosé à l'aide d'un test biologique utilisant la lignée cellulaire CTLL-2. CTLL-2 est un clone de lymphocytes T cytotoxiques de souris C57BL/6 dont la croissance dépend de l'IL-2 (Gearing *et al.*, 1985). Le niveau de production de l'IL-2 dans les surnageants de culture des cellules Een217 a été évalué de façon relative et ce, par rapport à la capacité de prolifération des cellules CTLL-2 en présence de ces surnageants (Oth *et al.*, 1987). Ainsi, les surnageants de culture des cellules Een217 (5×10^5 cellules/test) pré-traitées avec l'AcM anti-CD3 (dose inductrice d'anergie) ou avec le ou les peptides anergiques, puis stimulées avec 10^{-8} M du peptide agoniste PV22 (section 4 de ce chapitre) ou bien avec les AcM anti-CD3 (2.44 ng) \oplus anti-CD28 (0.1 μ g) (section 7 de ce chapitre), ont été dilués et distribués dans des plateaux 96 puits (50 μ l/puits) en présence des cellules CTLL-2 (4×10^4 cellules/puits), dans un volume final de 100 μ l de milieu de culture sans IL-2hr. Les plateaux ont été incubés pendant 16 h à 37°C avant l'ajout de 1 μ Ci de [3 H]TdR dans chaque puits. Le niveau de prolifération des cellules CTLL-2 a été déterminé après 16 h d'incubation à 37°C en mesurant la radioactivité incorporée par ces cellules (section 4 de ce chapitre). Toutes les conditions ont été testées en triplicata. La quantité d'IL-2 présente dans les surnageants de culture des cellules Een217 a été déterminée après extrapolation des valeurs des taux de la radioactivité incorporée (niveau de prolifération des CTLL-2) sur une courbe étalon, qui a été générée en utilisant une solution standard d'IL-2hr (100 U/ml) dans un autre test de prolifération des CTLL-2. Les résultats sont présentés sous forme d'unités d'IL-2 secrétée/ml.

11- Analyse du niveau d'expression des récepteurs cellulaires de surface par cytométrie de flux

L'expression des récepteurs CD4, CD3, et CD25 à la surface des cellules Ee217 a été déterminée par cytométrie de flux. Ainsi, les cellules Ee217 en culture ont été lavées avec 10 ml de PBS 1X (10^6 cellules/test), puis resuspendues dans 100 μ l de PBS 1X. Les cellules Ee217 ont été ensuite incubées en présence de 20 μ l de l'AcM anti-CD4 (Cloné SFC112T4D11, [2 mg/ml] ; Beckman, Coulter ; ON, Canada) conjugué à la rhodamine (RD1), ou en présence de 20 μ l de l'AcM anti-CD3 (Cloné UCHT1, [2 mg/ml] ; Beckman, Coulter) conjugué à la fluoresceine isothiocyanate (FITC), ou en présence de 20 μ l de l'AcM anti-CD25 (Cloné B1.49.9, [2 mg/ml] ; Beckman, Coulter) conjugué à la FITC. L'AcM anti-CD25 reconnaît le récepteur CD25 qui correspond à la sous-unité α (55 kDa) du récepteur de l'IL-2. Après 1 h d'incubation à la température de la pièce, les cellules ont été lavées dans du PBS 1X froid pour éliminer l'excédant d'anticorps, puis elles ont été resuspendues dans 100 μ l de PBS 1X et ensuite analysées pour l'expression des récepteurs CD4, CD3 ou CD25 à leurs surfaces à l'aide d'un cytomètre EPICS (Coulter ; Miami, Fla, USA).

Pour chaque analyse, 10^6 cellules Ee217 ont été incubées en présence d'un AcM non spécifique (contrôle isotypique) conjugué à la FITC ou à la RD1 pour mesurer le bruit de fond de la fluorescence due à sa fixation. La fluorescence qui constitue le bruit de fond est soustraite de la fluorescence due à la fixation des AcM spécifiques (conjugués à la FITC ou à la RD1) aux récepteurs cellulaires.

12- Immunoprécipitation de la PTK Zap-70 des cellules Een217 et analyse par immunobuvardage de type Western (Western blot)

La PTK Zap-70 a été immunoprécipitée à partir des lysats des cellules Een217 stimulées avec les peptides synthétiques dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1 ou stimulées avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28.

12-1 Stimulation et lyse des cellules Een217

Pour la stimulation des cellules Een217 par les peptides synthétiques, les fibroblastes HLA-DR4⁺ ont été mises en culture sans IL-2hr dans des plateaux de culture 24 puits (10⁶ cellules /puits), en présence de concentrations allant de 10⁻³ M à 10⁻⁸ M du peptide agoniste PV22 ou des peptides variants. Après 16 h d'incubation à 37°C, les cellules ont été lavées pour éliminer l'excédant des peptides, et les cellules Een217 ont été ajoutées à raison de 12x10⁶ cellules/puits, dans un volume final de 500 µl de milieu de culture sans IL-2hr. Les plateaux ont été centrifugés pendant 1 min à 800 x g pour favoriser le contact cellulaire, et ensuite incubés à 37°C pendant 5 min. La stimulation a été arrêtée en ajoutant 500 µl de PBS 1X froid dans chaque puits. Les plateaux ont été transférés immédiatement sur glace, et les cellules ont été récoltées et transférées dans les tubes eppendorfs. Après une centrifugation à 14 000 x g pendant 30 sec à 4°C, les cellules en culot ont été lysées avec 500 µl de tampon de lyse contenant le Triton X-100 à 1 %, 20 mM Tris-HCL [pH 8], 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 5 mM EDTA, inhibiteurs de protéases (1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin), et l'inhibiteur de phosphotyrosine phosphatase (1 mM sodium orthovanadate). Les lysats cellulaires ont été incubés pendant 30 min sur la glace puis centrifugés à 14 000 x g pendant 30 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires.

Pour la stimulation des cellules Een217 avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28, les cellules ont été lavées dans le milieu RPMI, puis transférées dans des tubes eppendorfs à raison de 12x10⁶cellules/ml en présence de l'AcM anti-CD3 (12 ng/ml) et de l'AcM anti-

CD28 (0.5 µg/ml). Après 30 min d'incubation à 4°C, les cellules ont été lavées dans le milieu RPMI pour éliminer l'excédent des AcM et ensuite resuspendues dans 1 ml de milieu RPMI. Le GAMiG à 4 µg/ml a été ajouté dans chaque tube pour servir de pont afin d'interrelier l'AcM anti-CD3 et l'AcM anti-CD28. Après une incubation de 5 min à 37°C, la stimulation des cellules a été arrêtée par addition de 500 µl de PBS 1X froid dans chaque tube. Les tubes ont été centrifugés à 14 000 x g pendant 30 sec à 4°C et les cellules en culots ont été lysées dans 500 µl de tampon de lyse froid telle que décrit précédemment.

12-2 Immunoprécipitation et analyse par Western blot

Pour immunoprécipiter la PTK Zap-70, les lysats cellulaires ont été incubés en présence de 2 µl de l'anticorps polyclonal anti-Zap-70 (Couture *et al.*, 1994a,b) et 25 µl de billes d'agarose conjuguées aux anticorps anti-IgG de lapin (Sigma Bio.Science), pendant 2 h à 37°C. Les complexes immuns ont été lavés deux fois dans le tampon de lyse, deux fois dans le tampon de lyse contenant 0.5 M NaCl, et une dernière fois dans le tampon de lyse. Les protéines immunoprécipitées ont été dissociées et dénaturées par ébullition pendant 5 min dans 25 µl de tampon d'électrophorèse RED 2X (100 mM Tris-HCL [pH 6.8], 20 % de glycérol, 4 % de SDS, 0.2 % de bleu de bromophénol, 10 % du 2-β-mercaptoéthanol). Les protéines ont été par la suite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 13 % (SDS-PAGE), en conditions réductrices. Après l'électrophorèse, les protéines ont été transférées sur membranes de nitrocellulose pour être analysées par "Western blot". Pour la détection des protéines phosphorylées, les membranes de nitrocelluloses ont été d'abord bloquées dans une solution de BSA 4 % pendant 2 h à 4°C, et ensuite incubées pendant 16 h à 4°C en présence de l'AcM anti-phosphotyrosine (4G10, Upstate Biotechnology ; Lake Placid, NY, USA) dilué 1/5000 dans du BSA 4 %. Pour s'assurer de la présence de quantités égales de la PTK Zap-70 dans les produits d'immunoprécipitation, les membranes ont été bloquées dans du lait 5 % (P/V) pendant 2 h à 4°C, et ensuite incubées pendant 16 h à 4°C en présence de l'AcM anti-Zap-70 (2F3.2, Upstate Biotechnology) dilué 1/2000 dans du lait

5 %. Les membranes ont été lavées trois fois avec du PBS 1X, et ensuite incubées pendant 1 h à la température de la pièce en présence de l'anticorps de chèvre dirigé contre les Ig de souris conjugué à la peroxydase (Gibco-BRL), dilué 1/4000. Les protéines ont été visualisées en utilisant un système de détection par chemiluminescence (ECL, Amersham ; Qc, Canada) selon les instructions du manufacturier.

La présence des MAP kinases actives Erk 1 et Erk 2 dans les lysats cellulaires Een217 a été vérifiée par analyse Western blot en utilisant un anticorps polyclonal anti-MAP kinase (dilué 1/10000) dirigé contre les formes actives phosphorylées Erk 1 (p44) et Erk 2 (p42) (pTEpY, Promega ; Madison, WI, USA). Afin de s'assurer de la présence de quantités égales de la protéine Erk 2 dans les échantillons analysés, les membranes ont été analysées par Western blot en utilisant l'anticorps polyclonal anti-Erk 2 (C-14, Santa Cruz Biotechnology, Inc ; Santa Cruz, CA, USA) dilué 1/2000.

13- Précipitation, à partir des cellules Een217, des chaînes ζ tyrosine phosphorylées du TCR en présence de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂

La protéine de fusion Glutathione S-Transférase (GST)-Zap(SH2)₂, contenant les deux domaines SH2 de la PTK Zap-70, a été utilisée pour précipiter les chaînes ζ phosphorylées du TCR à partir des lysats des cellules Een217. Les domaines SH2 de la PTK interagissent avec les résidus tyrosines phosphorylées des motifs ITAM des chaînes ζ du TCR.

13-1 Préparation de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂

Le cDNA codant pour les deux domaines SH2 correspondant aux acides aminés 1 à 260 de la PTK Zap-70 humaine, a été amplifié par PCR et cloné dans le vecteur d'expression pGEX-3T tel que décrit par Chan *et al.*, 1992. Le vecteur d'expression exprimant la protéine GST-Zap(SH2)₂ nous a été fournie par le laboratoire du Dr A.Chan de l'université Washington (St.Louis, MO, USA). Brièvement la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂ a été purifiée à partir d'une culture bactérienne de bactéries recombinants DH5 α mises en culture dans le milieu Luria Broth pendant 16 h à 37°C sous agitation. Les bactéries en culture ont été par la suite induites avec 1mM d'isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG, Pharmacia) pendant 4 h, afin de favoriser l'expression de la protéine recombinante GST-Zap(SH2)₂. Les bactéries ont été lavées avec du PBS 1X puis resuspendues dans 10 % de Triton X-100 avant d'être brisées aux ultrasons. La protéine de fusion a été par la suite purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de sépharose-glutathione (Pharmacia Biotechnology ; Qc, Canada). La pureté de la protéine recombinante a été confirmée par SDS-PAGE.

13-2 Précipitation des chaînes ζ tyrosine phosphorylées

Les lysats dérivés des cellules Een217 ont été incubés en présence de 5 μ g de protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂ liée aux billes de sépharose-glutathione (Sigma Bio.Sciences)

pendant 1 h à 4°C. Les produits de co-précipitation GST-Zap(SH2)₂-ζ tyrosine phosphorylées ont été lavées deux fois dans le tampon de lyse, par la suite deux autres fois dans le tampon de lyse contenant 0.5 M NaCl, et une dernière fois dans le tampon de lyse avant d'être analysés par Western blot en utilisant l'AcM anti-phosphotyrosine (4G10, Upstate Biotechnology) pour la détection des chaînes ζ phosphorylées, tel que décrit dans la section 12.2 de ce chapitre.

14- Activité kinase de JNK

L'activité kinase de la MAP kinase JNK a été évaluée par sa capacité de phosphoryler la protéine recombinante c-Jun. La MAP kinase JNK a été précipité à partir des lysats des cellules E217 en présence de la protéine de fusion GST-c-Jun (a.a. 1 à 79). Pour la préparation de la protéine de fusion, le cDNA codant pour les acides aminés 1 à 79 de la protéine c-Jun a été cloné dans le vecteur d'expression pGEX-3T tel que décrit par Jacinto *et al.*, 1998. Le vecteur d'expression exprimant la protéine de fusion GST-c-Jun (a.a. 1 à 79) nous a été fourni par le laboratoire du Dr A. Koromilas de l'université McGill (Montréal, Qc, Canada), et la protéine de fusion a été purifiée tel que décrit dans la section 13.1 de ce chapitre. Ainsi, les lysats dérivés des cellules E217 (12x10⁶ cellules/test) pré-traitées avec l'AcM anti-CD3 (dose inductrice d'anergie) et stimulées avec 10 μM du peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 (12 ng/ml) ⊕ anti-CD28 (0.5 μg/ml) (tel que décrit dans la section 11.1 de ce chapitre), ont été incubés en présence de 5 μg de la protéine de fusion GST-c-Jun (a.a. 1 à 79) purifiée liée aux billes d'agarose-glutathione (Pharmacia Biotechnology) pour précipiter la MAP Kinase JNK. Après 2 d'incubation à 4°C, les complexes GST-c-Jun/JNK co-précipités ont été lavés 4 fois avec le tampon HBB pH 7.7 (20 mM hepes, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, 0.05 % Triton X-100), et deux fois avec le tampon kinase pH 7.5 sans ATP (20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂). Après les lavages, 1 μM d'ATP contenant 10 μCi [³²P]-γATP a été ajouté à chaque échantillon pour permettre la phosphorylation de c-Jun par JNK. Après une incubation de 30

min à 30 °C, les complexes GST-c-Jun/JNK ont été lavés 3 fois dans le tampon HBB froid. Les protéines ont été par la suite dissociées et dénaturées par ébullition dans le tampon d'électrophorèse RED 2X. et séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 10 % (SDS-PAGE). Les protéines ainsi séparées ont été transférées sur membrane de nitrocellulose et la présence de la protéine c-Jun phosphorylée par JNK (c-Jun-[³²P]) a été révélée par autoradiographie de la membrane. Afin de s'assurer de la présence de quantités égales de la protéine de fusion GST-c-Jun(1-79) dans tous les produits de co-précipitation, les membranes ont été analysées par Western blot en utilisant l'AcM anti-GST (B-14, 1/4000; Santa Cruz Biotechnology, Inc) dilué 1/4000 dans du lait 5% tel que décrit dans la section 12.2 de ce chapitre.

RÉSULTATS

1- Peptides dérivés de la gp120 de variants du VIH-1 capables d'induire l'anergie de CTL spécifiques

Le premier objectif de ce projet consistait à déterminer si des variants du VIH-1 ont la capacité d'induire l'anergie des cellules T cytotoxiques spécifiques au virus sauvage. Ceci justifie l'utilisation des lymphocytes T CD4⁺cytotoxiques Een217. Ces cellules, restreintes aux molécules du CMH classe II HLA-DR4, sont spécifiques à l'épitope CTL13 de la gp120 de la souche PV22 du VIH-1. À l'aide de cet outil, nous avons évalué l'effet des peptides variants de la gp120 du VIH-1 PV22 sur la prolifération et l'activation cytotoxique des cellules CTL spécifiques Een217.

1-1 Réponses fonctionnelles des cellules Een217 à la stimulation avec les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1

1-1.1 Prolifération

Les expériences mesurant la capacité de prolifération des cellules Een217 en réponse à la stimulation avec les peptides dérivés de différentes souches du VIH-1, en utilisant les fibroblastes HLA-DR4⁺ comme cellules présentatrices de l'antigène (APC DR4⁺), ont montré qu'à la concentration 10⁻⁸ M, le peptide dérivé de la souche sauvage PV22 induit un maximum de prolifération des cellules Een217 (fig. 14), alors que les peptides variants dérivés des souches virales CDC42, EL1 et Z3 sont incapables d'induire la prolifération des cellules Een217. Cependant dans les mêmes tests, le peptide variant dérivé de la souche virale HXB2, dont la séquence ne diffère que de deux acides aminés (F23I et E29K) de celle du peptide dérivé de la souche sauvage PV22 (Tableau 2), est capable d'induire la prolifération des cellules Een217, mais de façon moins efficace que le peptide agoniste PV22 (fig. 14).

Tableau 2. Séquences en acides aminés des peptides utilisés dans cette étude et leur capacité relative d'induire la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules Eén217.

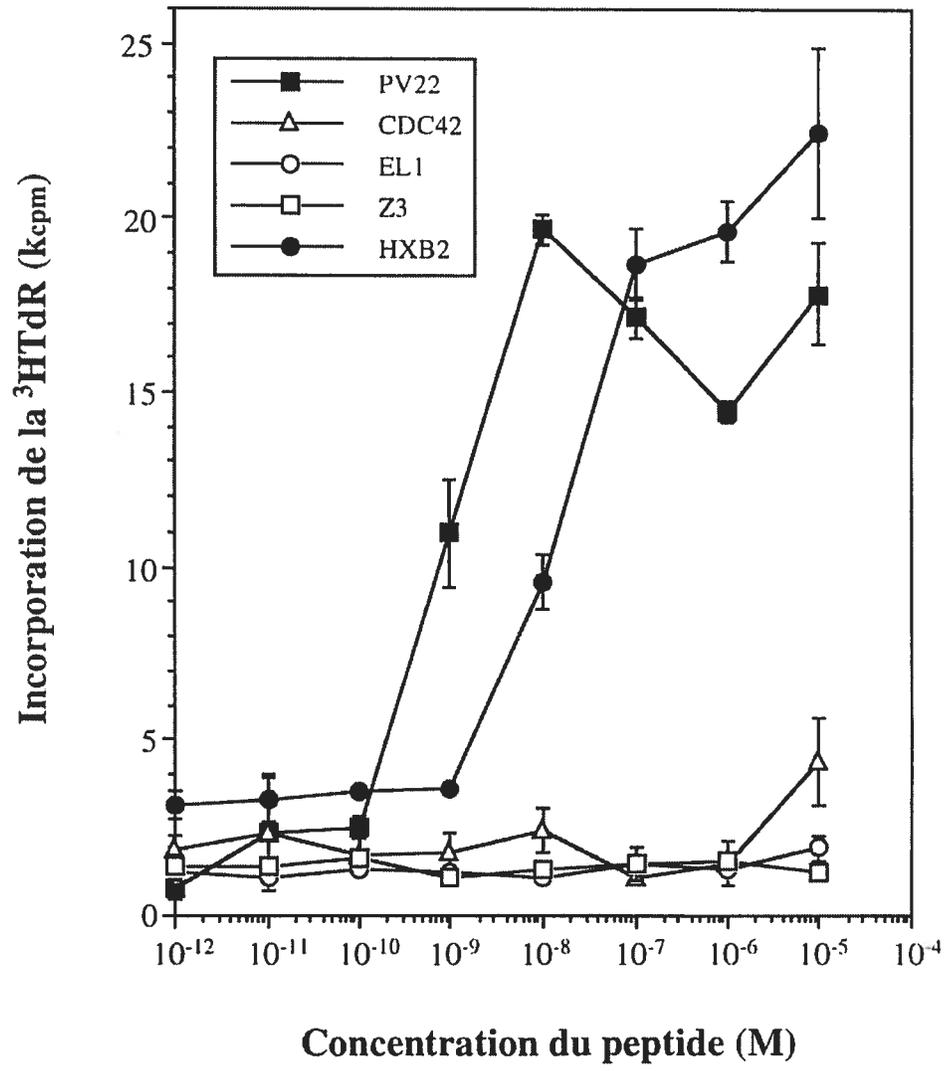
Séquence en acides aminés de la région 410-429 de la gp120 dérivée des souches PV22, CDC42, EL1, Z3 et HXB2 du VIH-1. L'efficacité relative de chaque peptide d'induire la prolifération ou la cytotoxicité des cellules Eén217 a été calculée sous forme du ratio de la concentration du peptide natif dérivé du PV22 nécessaire pour induire 50 % de la réponse maximale sur la concentration du peptide variant nécessaire pour induire 50 % de la réponse maximale, sous les mêmes conditions. Dans les deux cas, la valeur arbitraire de 1.0 a été attribuée à la concentration du peptide agoniste PV22 nécessaire pour induire 50 % de l'activation maximale.

Efficacité Relative

Peptide	Séquence	Prolifération	Cytotoxicité
PV22	GSDTITLLPCRIKQFINMMQE	1.000	1.000
CDC42	TG-I-----I--R--V	<0.0005	<0.0005
EL1	TNTN---Q-----I-K-VAG	<0.0005	<0.0005
Z3	CTGN-----I-----	<0.0005	<0.0005
HXB2	-----I-----K	0.043	0.015

Figure 14. Prolifération des cellules Ee217 en réponse aux peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1.

Prolifération des cellules Ee217 en réponse aux fibroblastes HLA-DR4⁺ (APC DR4⁺) présentant différentes concentrations du peptide agoniste dérivé de la souche PV22 et des peptides variants dérivés des souches CDC42, EL1, Z3 et HXB2. Le peptide agoniste induit un maximum de prolifération des cellules Ee217 à la concentration de 10⁻⁸ M. Le peptide variant HXB2 est capable d'induire la prolifération des cellules Ee217, mais de façon moins efficace que le peptide agoniste PV22.

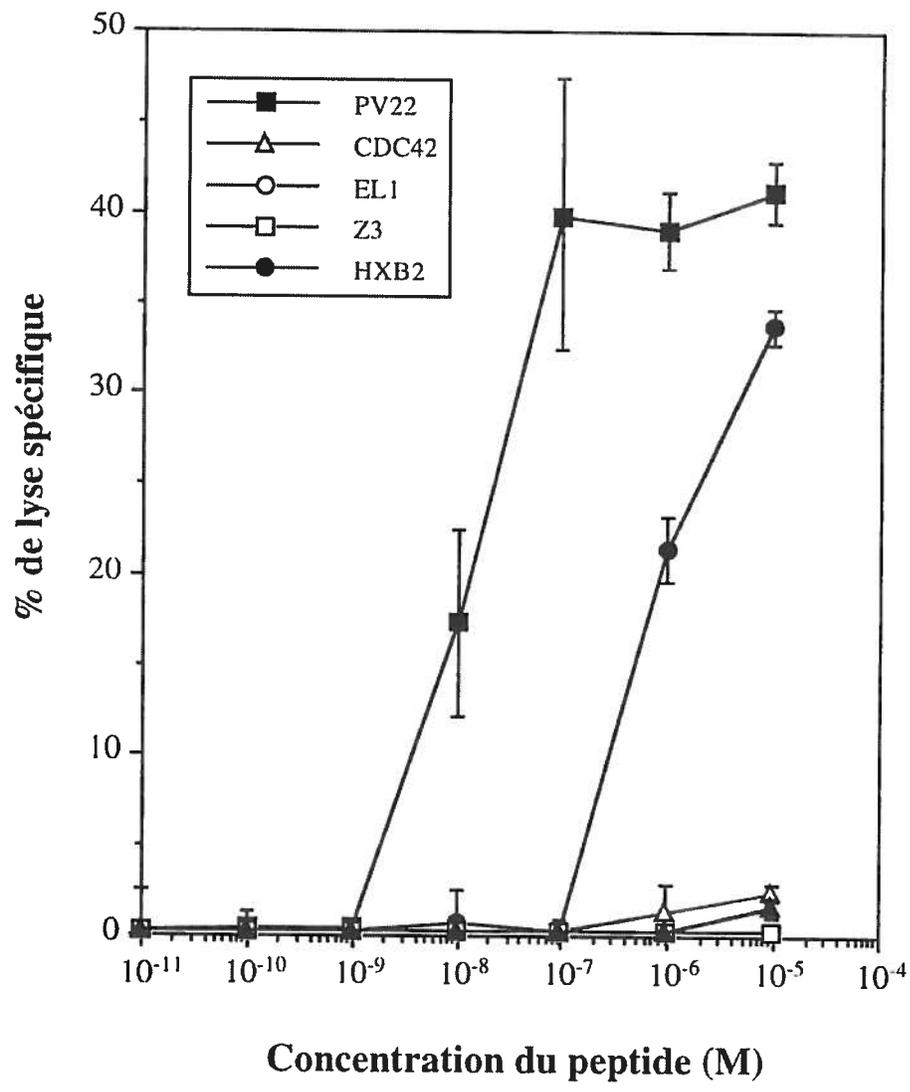


1-1.2 Activité cytotoxique des cellules Ee217

Lors de ce test, nous avons évalué le niveau de l'activité cytotoxique des cellules Ee217 dirigée contre les cellules cibles, soit les fibroblastes HLA-DR4⁺, présentant les peptides synthétiques dérivés des différentes souches du VIH-1. Ainsi, et tel qu'attendu, l'activité cytotoxique dirigée par les cellules Ee217 était maximale contre les cellules cibles présentant le peptide agoniste dérivé de la souche virale PV22 du VIH-1 avec un pourcentage de lyse spécifique de 40 % (fig.15). Seul le peptide variant dérivé de la souche virale HXB2 est capable d'induire la fonction cytotoxique des cellules Ee217 avec un pourcentage de lyse spécifique de 35 %, il en demeure pas moins que cette lyse a été obtenue avec une concentration du peptide variant HXB2 100 fois supérieure à celle du peptide agoniste PV22. La concentration du peptide agoniste PV22 était de 10⁻⁷ M (associée à une lyse spécifique de 40 %) comparé à celle du peptide variant HXB2 qui était de 10⁻⁵ M (associée à une lyse spécifique de 35 %). Les peptides dérivés des souches CDC42, EL1 et Z3, lorsque présentés par les cellules cibles HLA-DR4⁺, se sont avérés incapables d'induire l'activité cytotoxique des cellules Ee217. Ensemble, ces résultats indiquent que les cellules Ee217 peuvent répondre au peptide variant dérivé de la souche virale HXB2 *in vitro* mais seulement lorsque des concentrations élevées du peptide sont utilisées.

Figure 15. Activité cytotoxique des cellules Een217 dirigée contre les cellules cibles présentant les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1

Susceptibilité de lyse des fibroblastes HLA-DR4⁺ présentant différentes concentrations du peptide agoniste PV22 et des peptides variant CDC42, EL1, Z3 et HXB2, par les cellules Een217. Dans cette expérience, les cellules ont été co-cultivées pendant 6 h avec un ratio effecteurs:cibles de 20:1 et les pourcentages de lyse spécifique sont présentés. Le peptide agoniste PV22 induit 40 % de lyse spécifique à la concentration 10⁻⁷ M. Le peptide variant HXB2 est 100 fois moins efficace que le peptide agoniste PV22 dans ce test.

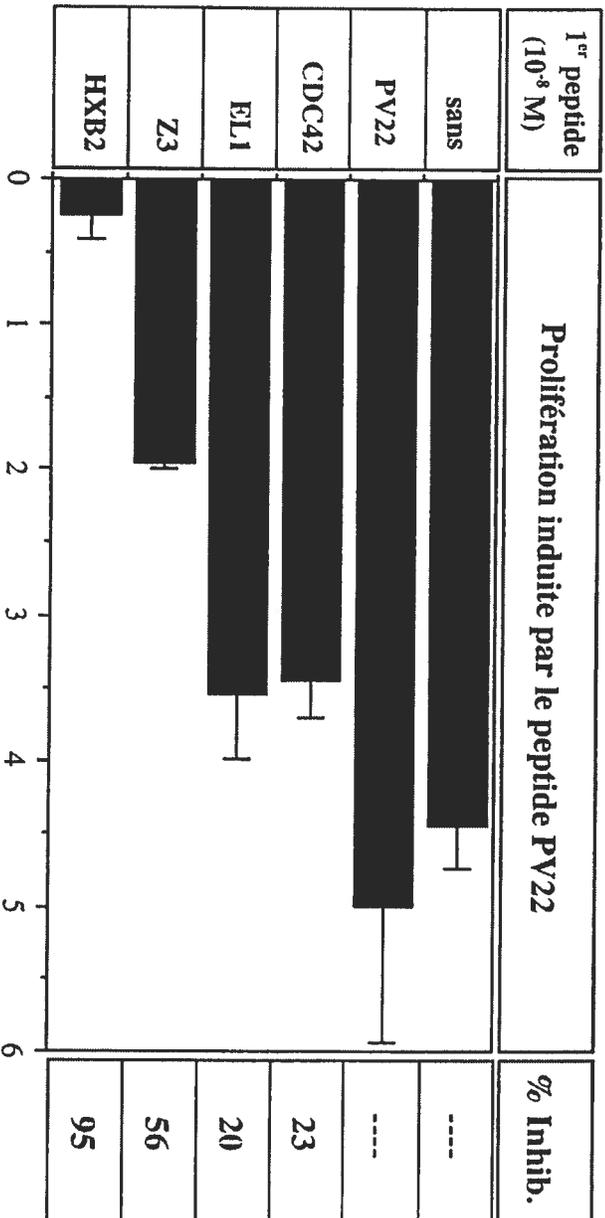


1-2 Anergie des cellules Een217 induite par le peptide variant HXB2

La possibilité que les peptides dérivés de variants du VIH-1 pourraient induire l'anergie dépendante du TCR des CTL n'a jamais été explorée. Ainsi et afin de déterminer si les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1 sont capables d'induire l'anergie des cellules T, les cellules Een217 ont été pré-traitées avec 10^{-8} M de chacun des peptides variants (voir tableau 2) présentés par les APC DR4⁺ pendant 48 h, puis maintenues au repos pendant 48 h et stimulées ensuite par la concentration mitogénique du peptide agoniste PV22 (10^{-8} M) pour évaluer leur capacité de prolifération. Ceci nous a permis de montrer qu'à une concentration où le peptide agoniste PV22 induit la prolifération et la fonction cytotoxique des cellules T (10^{-8} M), le peptide variant HXB2 inhibe de 95 % la prolifération des cellules Een217 en réponse au peptide agoniste PV22 (fig. 16). Sous les mêmes conditions, les peptides variants CDC42 et EL1 montrent un effet d'inhibition marginal sur la prolifération des cellules Een217 en réponse au peptide agoniste PV22, avec une inhibition de 23 % et de 20 % respectivement (fig. 16). Le peptide variant Z3 est, par contre, capable de réduire la prolifération de 56 % suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22. Ces résultats montrent très bien que le peptide variant HXB2 est capable d'induire l'anergie via le TCR des CTL Een217 en réponse au peptide agoniste dérivé de la souche sauvage PV22 du VIH-1, *in vitro*.

Figure 16. Induction de l'anergie des cellules Ee217 par le peptide variant dérivé de la souche HXB2 du VIH-1.

Prolifération des cellules Ee217 pré-traitées, pendant 48 h, avec les APC-DR4⁺ seules, ou avec les APC-DR4⁺ présentant le peptide agoniste (10^{-8} M) ou présentant les peptides variants (10^{-8} M), puis maintenues repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec 10^{-8} M du peptide agoniste PV22. Le pourcentage d'inhibition de la prolifération obtenu avec chaque peptide est indiqué. Le peptide variant HXB2 bloque complètement la prolifération des cellules Ee217 avec 95 % d'inhibition.



Incorporation de la ³HTdR (Kcpm)

1-3 Inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Ee217 rendues anergiques par le peptide variant HXB2 en réponse au peptide agoniste PV22

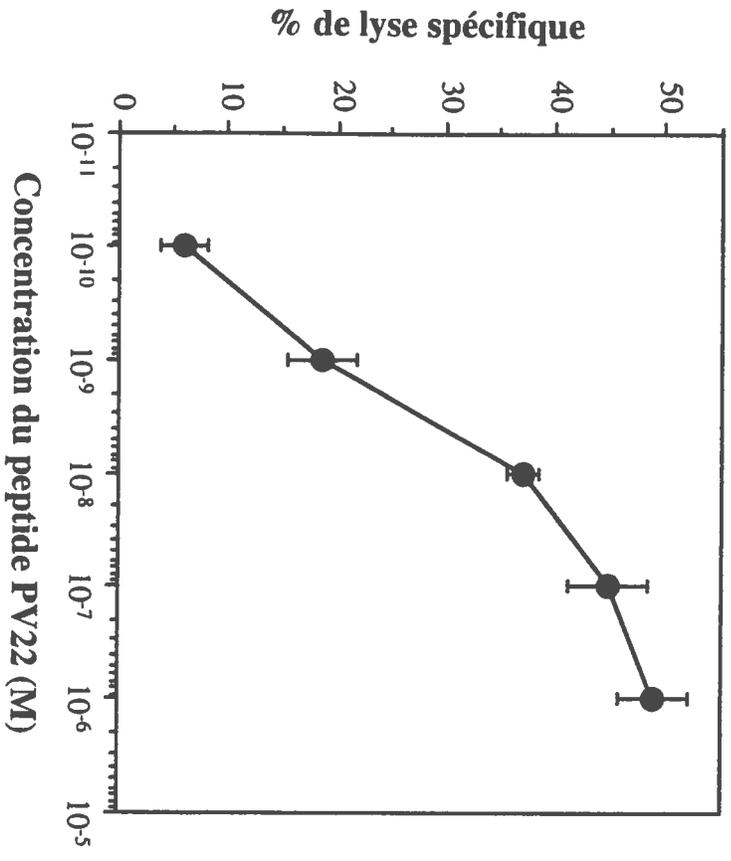
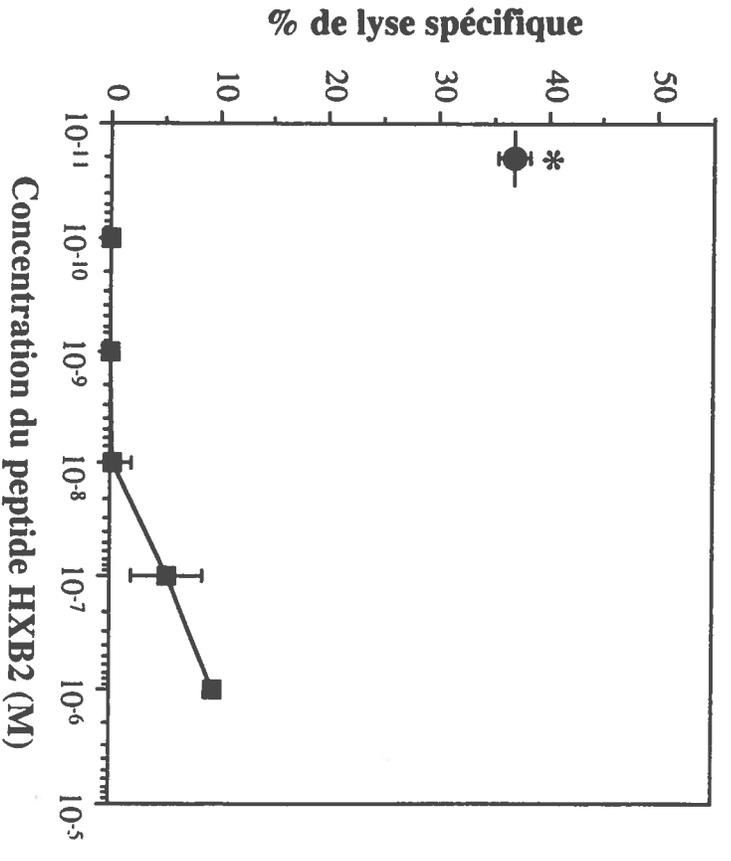
Nous avons testé la capacité du peptide variant anergique HXB2 à prévenir l'induction de l'activité CTL observée après la stimulation des cellules Ee217 par le peptide agoniste PV22. Pour ce faire, les cellules T ont été d'abord pré-traitées avec des concentrations croissantes du peptide variant HXB2 présenté par les APC DR4⁺, puis maintenues au repos pendant 48 h et leur activité cytotoxique dirigée contre le peptide agoniste PV22 (10⁻⁸ M) a été évaluée. Le peptide agoniste PV22 est présenté par les fibroblastes HLA-DR4⁺ marqués au ⁵¹Cr. Tel qu'illustré dans la figure 17-B, le peptide variant HXB2, à des concentrations allant de 10⁻¹⁰ M à 10⁻⁸ M bloque complètement l'induction de l'activité cytotoxique des cellules Ee217 contre les fibroblastes présentant le peptide agoniste PV22 (lyse spécifique inférieure à 1 %). Généralement et à une concentration de 10⁻⁸ M, le peptide agoniste PV22 induit 37 % de l'activité CTL maximale (fig. 17-A). Lorsque des concentrations élevées du peptide variant HXB2 (10⁻⁷ M et 10⁻⁶ M) ont été utilisées pour le pré-traitement des cellules Ee217, des niveaux très bas de cytotoxicité ont été observés avec une lyse spécifique inférieure à 10 % (fig. 17-B). Ces résultats montrent que le pré-traitement des cellules Ee217 avec le peptide variant anergique HXB2 inhibe l'activité cytotoxique des cellules Ee217 en réponse à la stimulation avec le peptide agoniste PV22.

Figure 17. Inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Ee217 rendues anergiques par le peptide variant HXB2 en réponse au peptide agoniste PV22.

A: Activité cytotoxique dirigée par les cellules Ee217 non traitées, contre les APC-DR4⁺ présentant le peptide agoniste PV22 (10^{-10} M à 10^{-6} M) en utilisant un ratio effecteurs: cibles de 20:1 (contrôle positif).

B: Activité cytotoxique dirigée par les cellules Ee217 pré-traitées, pendant 48 h, avec différentes concentrations du peptide variant anergique HXB2 (10^{-10} M à 10^{-6} M) contre les APC-DR4⁺ présentant le peptide agoniste PV22 (10^{-8} M) avec un ratio effecteurs: cibles de 20:1.

Les valeurs de lyse spécifique obtenues avec 10^{-8} M du peptide agoniste PV22 dans la figure A (contrôle positif) sont représentées par l'astérisque dans la figure B. Le peptide variant anergique HXB2 inhibe complètement l'activité cytotoxique des cellules Ee217 en réponse à 10^{-8} M du peptide agoniste PV22.

A**B**

1-4 Analyse phénotypique par cytométrie de flux, des cellules Een217 stimulées avec le peptide agoniste et les peptides variants

1-4.1 Expression du récepteur TCR/CD3 et du récepteur CD4

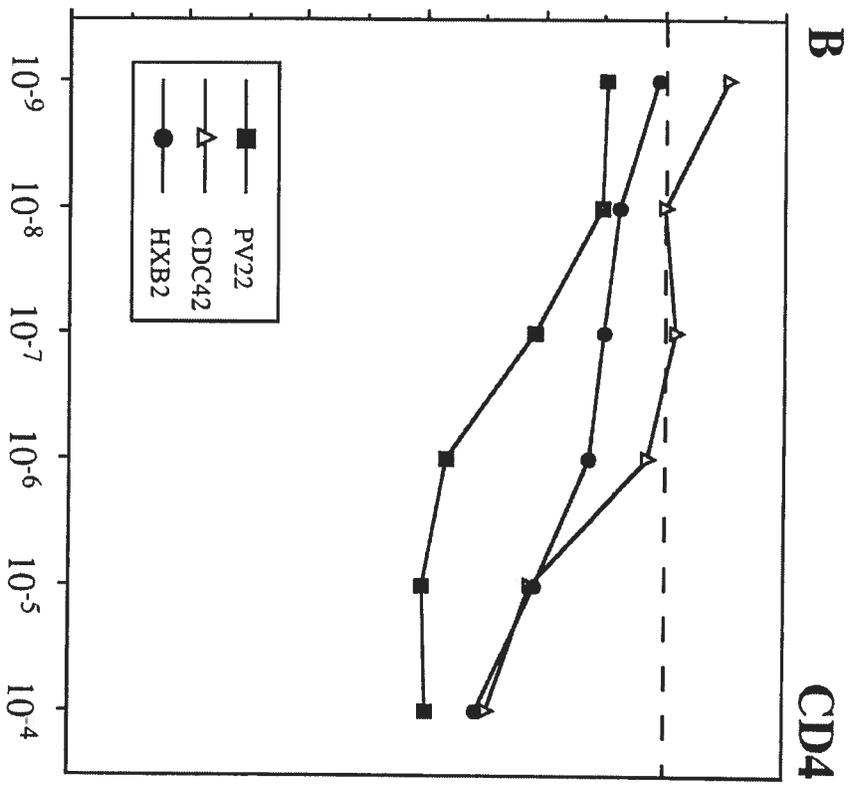
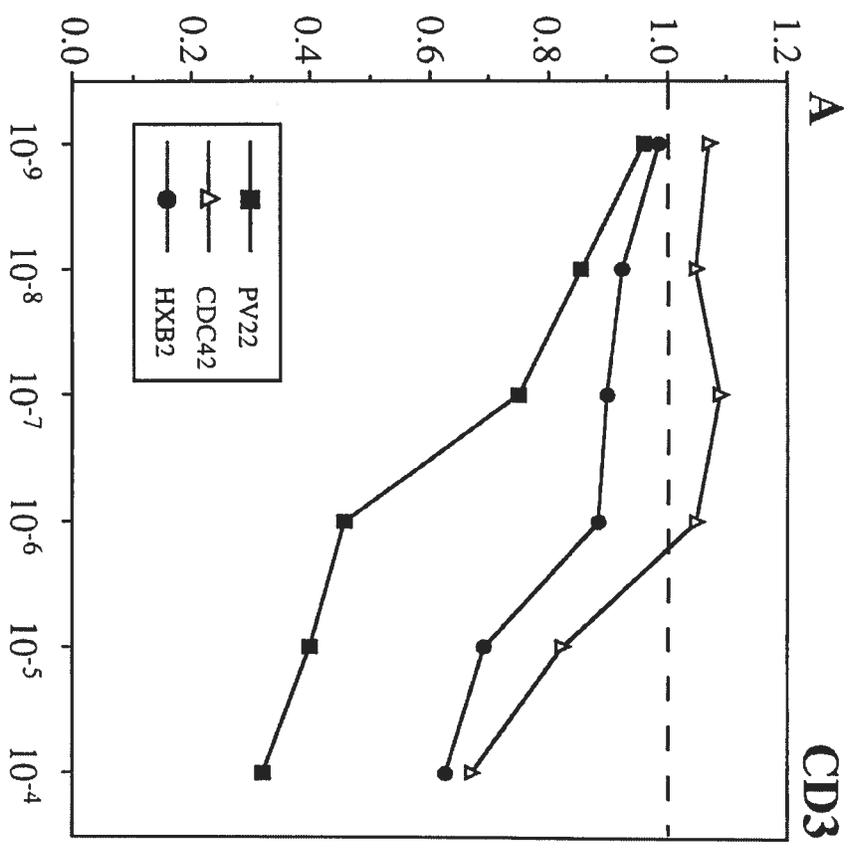
L'incubation des lymphocytes T en présence de concentrations mitogéniques d'un peptide agoniste, présenté par les APC en association avec la molécule du CMH, peut induire l'internalisation du complexe TCR/CD3. L'internalisation du complexe TCR/CD3 implique des interactions en série du récepteur avec un petit nombre de complexes peptide/CMH conduisant à la diminution de l'expression du TCR stimulé (Valiutti *et al.*, 1995). Ce phénomène est médié probablement par l'activation des kinases Lck et Fyn de la famille Src, mais ne se produit pas lors de la stimulation des lymphocytes T avec des concentrations élevées des peptides agonistes partiels ou antagonistes du TCR (LaFace *et al.*, 1997 ; Bachmann *et al.*, 1998). Cependant, puisque des concentrations élevées du peptide variant HXB2 induisent la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules Een217 (figures 14 et 15), nous avons examiné la possibilité selon laquelle l'exposition des cellules Een217 au peptide HXB2 pourrait moduler l'expression du complexe TCR/CD3 et empêcher ainsi leur stimulation ultérieure avec le peptide agoniste PV22 via le TCR. Les cellules Een217 ont été ainsi stimulées avec des concentrations allant de 10^{-9} M à 10^{-4} M du peptide agoniste PV22, et des peptides variants HXB2 et CDC42, pendant 48 heures, et l'expression de surface du complexe TCR/CD3 a été déterminé par cytométrie de flux, en utilisant l'AcM dirigé contre la chaîne ϵ du CD3. Cette analyse a révélé que le traitement des cellules Een217 avec les trois peptides n'altère pas significativement la proportion des cellules Een217 exprimant les antigènes de surface, qui restent ≥ 97 %. Par contre, les niveaux de densité du complexe TCR/CD3 à la surface des cellules, déterminés à partir de la moyenne de l'intensité de fluorescence, variaient de façon importante dépendamment de la concentration du peptide utilisé (fig. 18-A). En effet, le peptide agoniste PV22 induit l'internalisation du complexe TCR/CD3 de façon dose-dépendante, qui se traduit par une

réduction de la densité de cette molécule à la surface des cellules. Cette réduction peut atteindre 70 % à la plus haute concentration utilisée du peptide agoniste PV22 (10^{-4} M) (fig. 18-A). Cependant, les peptides variants HXB2 et CDC42 induisent des niveaux très bas d'internalisation du TCR par rapport au peptide agoniste PV22. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'analyse de l'expression de surface du récepteur CD4 à l'aide d'un AcM anti-CD4, après stimulation des cellules Een217 avec les peptides PV22, HXB2 et CDC42 (fig. 18-B). Ces résultats indiquent que la stimulation des cellules Een217 avec 10^{-8} M des peptides variants HXB2 et CDC42 n'entraîne pas des réductions significatives des niveaux d'expression de surface du complexe TCR/CD3 et du récepteur CD4 qui demeurent supérieurs à 90 %. Il est cependant extrêmement improbable que la réduction de 95 % dans la prolifération des cellules Een217 et l'inhibition totale de leur fonction cytotoxique, observées en réponse au peptide agoniste PV22 (figures 16 et 17) après le pré-traitement des cellules Een217 avec le peptide variant HXB2 à 10^{-8} M, soient le résultat d'une réduction dramatique des niveaux d'expression du complexe TCR/CD3 et/ou du récepteur CD4 à la surface des cellules.

Figure 18. Niveaux d'expression des récepteurs TCR/CD3 et CD4 à la surface des cellules Een217 stimulées avec les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1.

Analyse, par cytométrie de flux, du niveau d'expression des récepteurs TCR-CD3 (A) et CD4 (B) à la surface des cellules Een217 stimulées pendant 48 h avec différentes concentrations du peptide agoniste PV22 et des peptides variants HXB2 et CDC42 (10^{-9} M à 10^{-4} M). Un million de cellules ont été marquées soit par l'AcM anti-CD3 conjugué à la FITC soit par l'AcM anti-CD4 conjugué à la RD1. Les résultats sont présentés sous forme d'indice d'expression relatif à l'antigène de surface, qui représente le ratio de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de chaque antigène de surface des cellules Een217 stimulées par rapport à celle des cellules Een217 au repos (contrôle positif). Les indices de l'expression des antigènes de surface indiquent la densité de ces molécules à la surface des cellules. Le peptide agoniste PV22 induit une internalisation importante et dose-dépendante du complexe TCR/CD3, alors que le peptide variant anergique HXB2 et le peptide variant CDC42 induisent des niveaux très bas d'internalisation du complexe TCR/CD3 et du récepteur CD4.

Indice d'expression de surface



Concentration du Peptide (M)

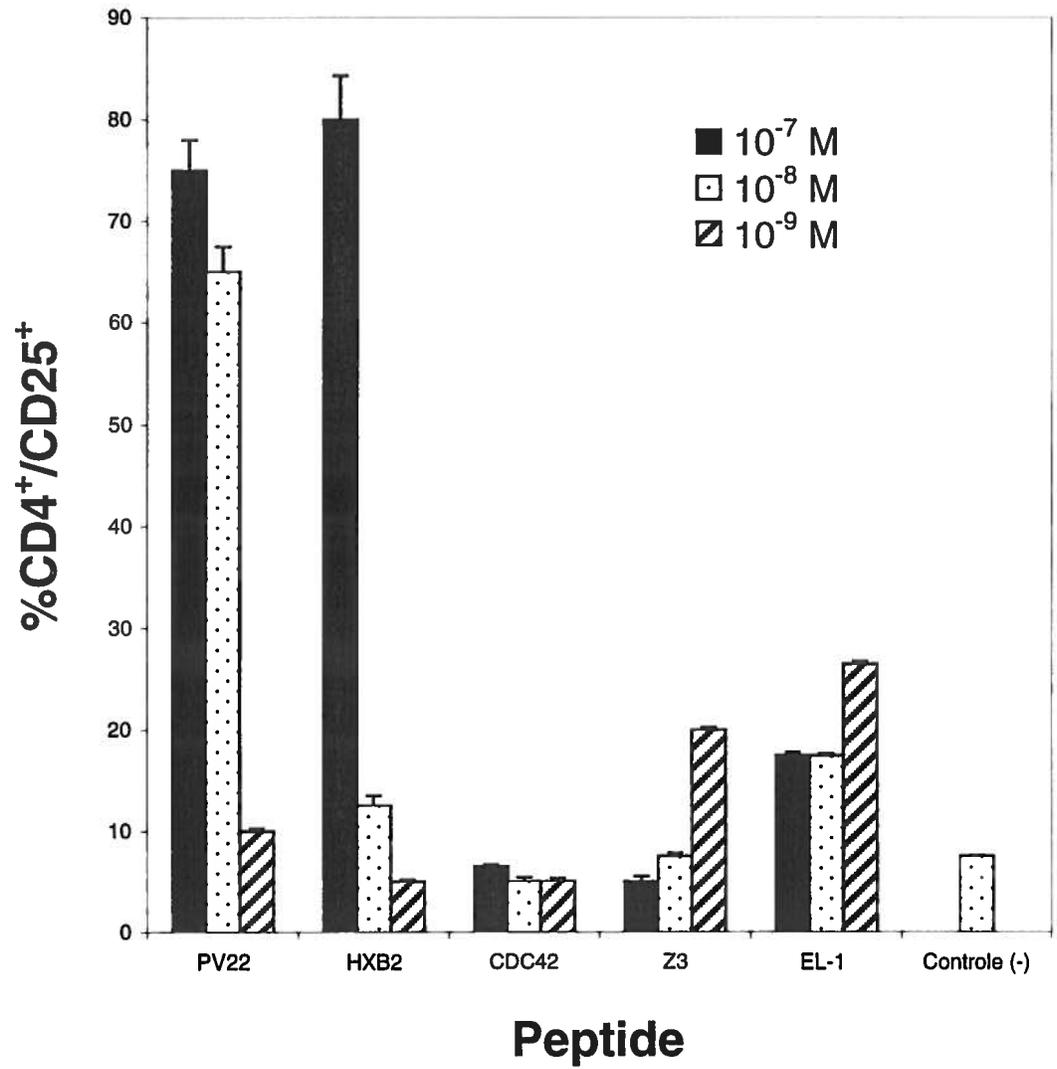
1-4.2 Induction de l'expression du récepteur CD25 de l'IL-2

Dans le cas où l'anergie est due à une inhibition de la transcription du gène IL-2, la simple addition de l'IL-2 exogène devrait contourner cette inhibition et permettre la prolifération des cellules T (Madrenas *et al.*, 1996). En effet, les cellules rendues anergiques par un APL agoniste partiel expriment toujours le récepteur CD25 de l'IL-2. Le niveau d'expression du récepteur CD25 à la surface des cellules traitées avec les peptides a été évalué par cytométrie de flux en utilisant l'AcM anti-CD25 dirigé contre la sous-unité α du récepteur de l'IL-2. Cette analyse a montré que 6 % de la population des cellules Ee217 au repos expriment le récepteur CD25. Ce pourcentage passe à 75 et 78 respectivement lorsque les cellules Ee217 sont stimulées avec le peptide agoniste PV22 (10^{-7} M) ou avec le peptide variant HXB2 (10^{-7} M) (fig. 19).

La stimulation avec 10^{-8} M du peptide variant HXB2 est capable d'induire l'expression du récepteur CD25 de l'IL-2 dans 13 % de la population cellulaire Ee217. Cette expression est significative relativement au niveau d'induction par les autres peptides variants (6 % pour le peptide variant Z3 et 5 % pour le peptide variant CDC42). Cependant, cette expression induite par le peptide variant HXB2 demeure faible par rapport à celle induite par le peptide agoniste PV22. En effet, 63 % de la population cellulaire Ee217 sont CD25⁺ suite à la stimulation avec 10^{-8} M du peptide agoniste PV22 (fig. 19). Ces résultats montrent que la stimulation des cellules Ee217 avec la concentration physiologique du peptide variant HXB2 (10^{-8} M) capable d'induire l'anergie (fig. 16) est également capable d'induire l'expression du récepteur CD25 (fig. 19). Ce niveau d'expression du récepteur CD25 de l'IL-2 par les cellules anergiques est suffisant pour permettre la prolifération cellulaire par l'IL-2 exogène.

Figure 19. Induction de l'expression du récepteur CD25 par les cellules Een217 stimulées avec les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1.

Analyse par cytométrie de flux du niveau d'expression du récepteur CD25 de l'IL-2 par les cellules Een217 stimulées pendant 48 h avec différentes concentrations des peptides PV22, HXB2, EL1, Z3 et du CDC42 (10^{-7} M, 10^{-8} M et 10^{-9} M). Un million de cellules ont été marquées à la fois par l'AcM anti-CD25 conjugué à la FITC et dirigé contre la sous-unité α de 55 kDa du récepteur de l'IL-2, et par l'AcM anti-CD4 conjugué à la RD1. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules double positives CD25⁺/CD4⁺. Le contrôle négatif montre qu'environ 6% des cellules non stimulées expriment le récepteur CD25. Ce pourcentage atteint 63 lorsque les cellules sont stimulées avec 10^{-8} M du peptide agoniste PV22. Seulement 13 % des cellules stimulées avec 10^{-8} M du peptide variant HXB2 expriment le récepteur CD25, ce pourcentage ne dépassait pas les 6 % en présence des peptides variants Z3 et CDC42.



2- Événements précoces de transduction du signal induits par les peptides dérivés de la gp120 de différentes souches du VIH-1

Il a été établi que les APL, lorsqu'ils sont présentés par les molécules appropriées du CMH, se lient au TCR et initient des événements de signalisation précoces modifiés qui diffèrent de ceux qui sont initiés par le peptide agoniste antigénique (Madrenas et Germain, 1996), résultant soit en l'activation partielle ou en l'anergie fonctionnelle des cellules T (Evavold *et al.*, 1993; Sloan-Lancaster *et al.*, 1993). Certains de ces événements intracellulaires déclenchés par les APL inducteurs d'anergie incluent la phosphorylation incomplète des chaînes ζ associées au TCR et le recrutement de la PTK Zap-70 non phosphorylée et non active au complexe TCR/CD3 (Sloan-Lancaster *et al.*, 1994). Dans le cas de la stimulation du TCR avec le peptide agoniste, Zap-70 est recrutée au TCR par son association aux chaînes ζ du TCR via ses domaines SH2, puis activé par la PTK Lck. Vu que nous avons montré que le peptide variant HXB2 est capable d'induire l'anergie des CTL Een217, nous nous sommes alors intéressés à caractériser les événements de signalisation intracellulaires induits par ce peptide variant du VIH-1. Ainsi, nous avons donc examiné les événements précoces de transduction du signal induits dans les cellules Een217 en réponse à la stimulation du TCR avec le peptide agoniste PV22 et avec le peptide variant anergique HXB2.

2-1 Profil de phosphorylation des chaînes ζ du TCR et de la PTK Zap-70 dans les cellules Een217 stimulées avec le peptide agoniste PV22 et avec le peptide variant anergique HXB2

2-1.1 Co-précipitation de la PTK Zap-70 et des chaînes ζ du TCR

Pour déterminer si la stimulation des cellules Een217 avec le peptide anergique HXB2, est capable de générer des événements biochimiques modifiés, similaires à ceux induits par les APL anergiques, les cellules Een217 ont été stimulées avec différentes concentrations du peptide agoniste PV22 ou du peptide variant HXB2 (de 0.01 μ M à 1000 μ M) pendant 5

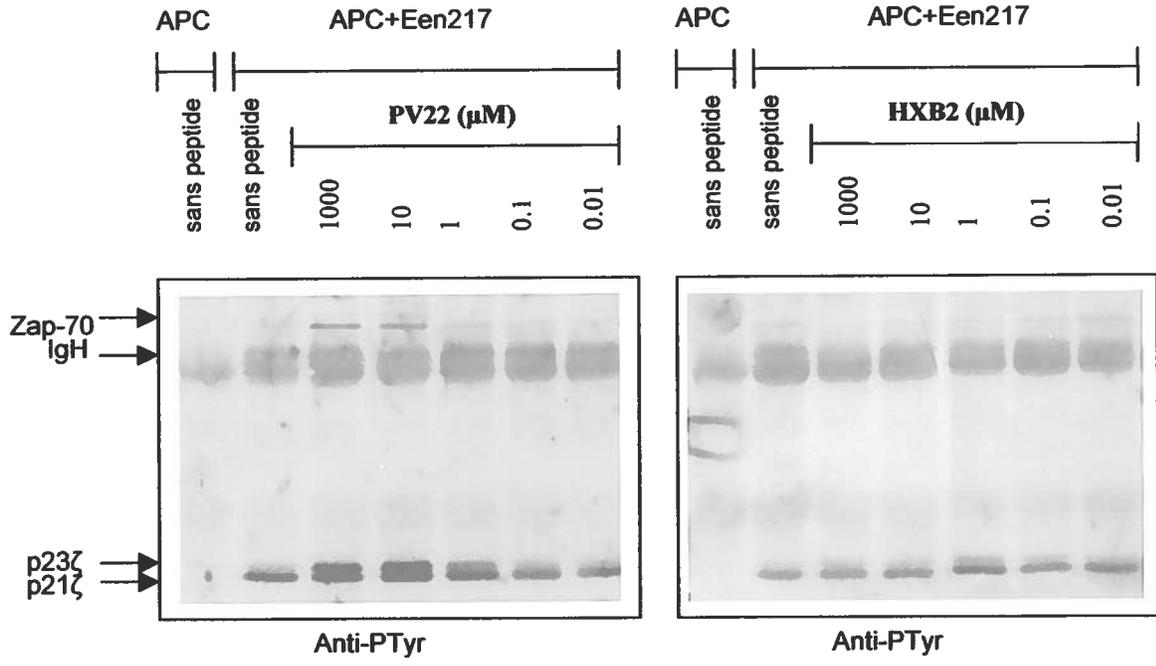
minutes (fig. 20), et la PTK Zap-70 a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires par un anticorps polyclonal anti-Zap-70 (Couture *et al.*, 1994a). Les protéines immunoprécipitées ont été analysées par Western blot en utilisant l'AcM anti-phosphotyrosine et l'AcM anti-Zap-70 pour vérifier respectivement les niveaux de phosphorylation et de l'expression de Zap-70. Cette analyse a montré que Zap-70 est phosphorylée sur ses résidus tyrosines en réponse au peptide agoniste PV22 (fig. 20-A; concentrations 1000 μ M et 10 μ M). Par contre, Zap-70 n'est pas phosphorylée en réponse au peptide variant anergique HXB2 (fig. 20-A ; concentrations 1000 μ M et 10 μ M).

Le peptide agoniste PV22 est capable d'induire la phosphorylation complète des chaînes ζ du TCR qui sont associées à la PTK Zap-70. Les chaînes ζ du TCR sont détectées sous forme de doublet tyrosine phosphorylé correspondant aux protéines p21, partiellement phosphorylée et p23, complètement phosphorylée (fig. 20-A, concentrations 1000 μ M et 10 μ M). Le peptide variant anergique HXB2 induit une phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR caractérisée par l'apparition de la forme p21 partiellement phosphorylée (fig. 20-A ; concentrations 1000 μ M à 0.01 μ M), qui demeure associée à la PTK Zap-70 non phosphorylée.

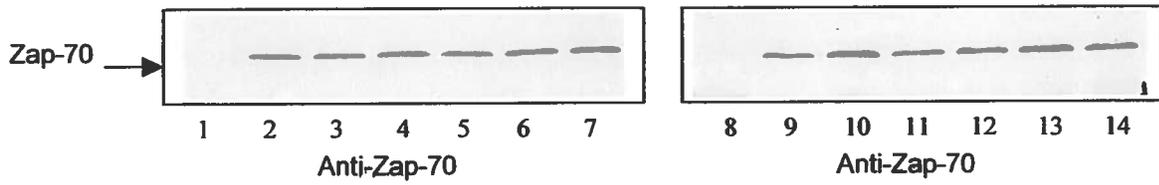
Figure 20. Niveau de phosphorylation de la PTK Zap-70 et son association avec les chaînes ζ du TCR dans les cellules Ee217 stimulées avec les peptides dérivés des souches virales PV22 et HXB2 du VIH-1.

La PTK Zap-70 a été immunoprécipitée à partir des lysats des cellules Ee217 (12×10^6 cellules/tests) stimulées avec les APC DR4⁺ seules (puits 1), ou avec les APC DR4⁺ présentant différentes concentrations du peptide agoniste PV22 (puits 3 à 7) ou présentant différentes concentrations du peptide variant HXB2 (puits 10 à 14), à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-Zap-70. Les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par Western blot en utilisant un AcM anti-phosphotyrosine (anti-Ptyr) (A). Le peptide agoniste PV22 induit la phosphorylation de la PTK Zap-70 aux concentrations 1000 μ M et 10 μ M, qui reste associée avec les chaînes ζ phosphorylées du TCR. Ces dernières apparaissent sous forme d'un doublet p21/p23 (puits 3 et 4). Le peptide variant anergique HXB2 n'induit pas la phosphorylation de la PTK Zap-70 qui demeure associée à la forme partiellement phosphorylée (p21) des chaînes ζ du TCR (puits 10 à 14). L'analyse par Western blot en utilisant un AcM anti-Zap-70 nous a permis de s'assurer de la présence de quantités équivalentes de Zap-70 dans tous les produits d'immunoprécipitation (B). Zap-70 est absente dans les lysats des APC seules (puits 1). La bande IgH apparaissant dans tous les puits correspond à la chaîne lourde de l'immunoglobuline anti-Zap-70.

A



B



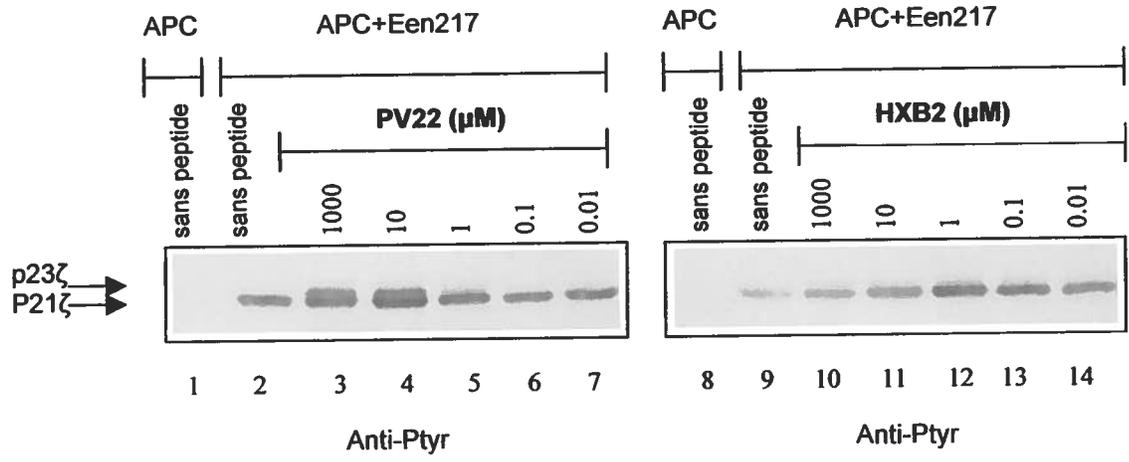
2-1.2 Précipitations des chaînes ζ phosphorylées du TCR en présence de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂

La phosphorylation différentielle des chaînes ζ du TCR en réponse au peptide agoniste PV22 et au peptide variant anergique HXB2 a également été observée lorsque les chaînes ζ du TCR ont été précipitées en présence de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂ contenant les deux domaines SH2 de la protéine Zap-70 (acides aminés 1 à 260). En effet, l'analyse par Western blot des produits de co-précipitation en utilisant l'AcM anti-phosphotyrosine, montre un profil de phosphorylation des chaînes ζ du TCR (le doublet p21/p23) identique à celui des chaînes ζ du TCR co-précipitées avec Zap-70 (fig. 21). En effet, le peptide variant HXB2 induit une phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR (fig. 21, concentrations 1000 μ M à 0.01 μ M), contrairement au peptide agoniste PV22 qui lui induit la phosphorylation complète des chaînes ζ du TCR (fig. 21; concentrations 1000 μ M et 10 μ M). Ceci confirme que les protéines phosphorylées de 21/23 kDa co-précipitées avec Zap-70 (fig. 20) dérivent effectivement des chaînes ζ du TCR.

Ensemble, ces résultats montrent que le peptide variant anergique HXB2 induit des événements précoces modifiés de transduction de signal, soit la phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR et leurs associations avec la PTK Zap-70 non phosphorylée. Ces événements modifiés sont caractéristiques des APL inducteurs d'anergie (agonistes partiels).

Figure 21. Précipitation des chaînes ζ phosphorylées du TCR en présence de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂, dans les cellules Een217 stimulées avec les peptides dérivés des souches virales PV22 et HXB2 du VIH-1.

Les chaînes ζ du TCR ont été précipitées en présence de 5 μg de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂, à partir des lysats des cellules Een217 (12×10^6 cellules/tests) stimulées pendant 5 min avec les APC DR4⁺ seules (puits 1), ou avec les APC DR4⁺ présentant différentes concentrations du peptide agoniste PV22 (puits 3 à 7) ou présentant différentes concentrations du peptide variant HXB2 (puits 10 à 14). Les produits de co-précipitation ont été analysés par Western blot en utilisant un AcM anti-phosphotyrosine (anti-Ptyr). Cette analyse nous a permis de montrer que le profil de phosphorylation des chaînes ζ du TCR précipitées avec les domaines SH2 de Zap-70 est identique à celui des chaînes ζ du TCR co-précipitées avec Zap-70 (fig. 20). Le peptide agoniste PV22 induit la phosphorylation complète des chaînes ζ du TCR (doublet p21/p23) aux concentrations 1000 μM et 10 μM (puits 3 et 4). Le peptide variant anergique HXB2 induit la phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR (p21) (puits 10 à 14).

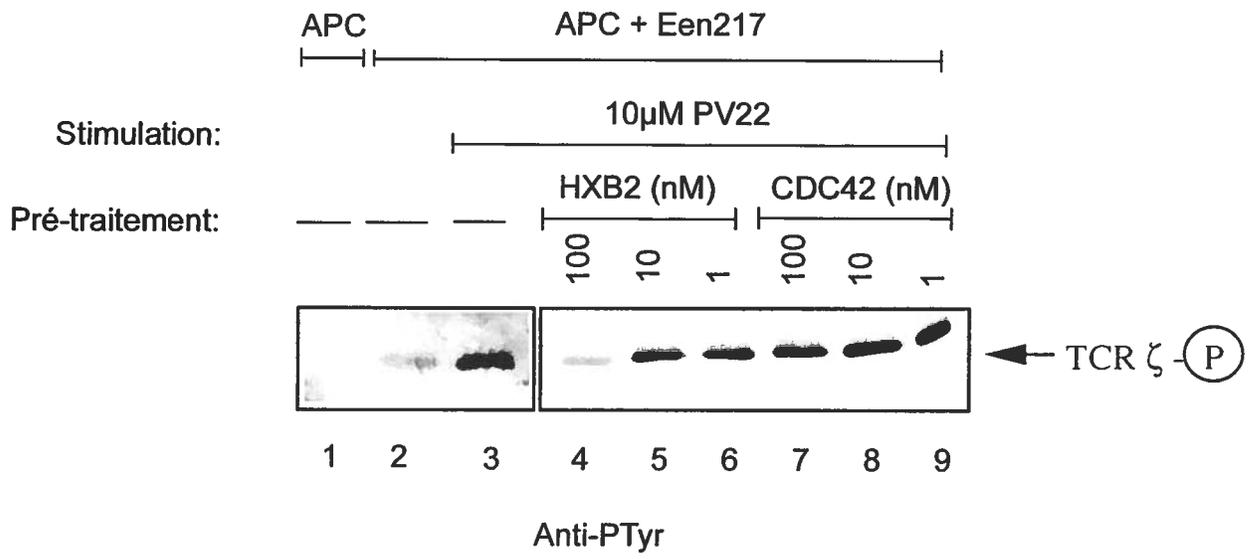


2-2 Réduction de la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 dans les cellules Ee217 pré-traitées avec le peptide variant anergique HXB2

Nous avons montré que le pré-traitement des cellules Ee217 avec le peptide variant HXB2 réduit la capacité des cellules Ee217 à répondre à leur peptide antigénique, d'où l'idée de vérifier si la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22, peut être diminuée ou modifiée par le pré-traitement des cellules Ee217 avec le peptide variant anergique HXB2. Ainsi, les cellules Ee217 ont été pré-traitées pendant 48 h avec les APC DR4⁺ seules ou bien avec les APC DR4⁺ présentant les peptides variants HXB2 et CDC42 (1 nM, 10 nM et 100 nM). Les cellules Ee217 ont été maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées pendant 5 min avec les APC DR4⁺ présentant 10 μ M du peptide agoniste PV22. Les chaînes ζ du TCR ont été précipitées à partir des lysats cellulaires en présence de la protéine de fusion GST-Zap (SH2)₂. Les produits de co-précipitation ont été analysés par Western blot en utilisant l'AcM anti-phosphotyrosine. Tel qu'attendu, la stimulation avec le peptide agoniste PV22 (10 μ M) des cellules non pré-traitées augmente la phosphorylation des chaînes ζ du TCR au moins par 5 fois, comparé au niveau de phosphorylation des chaînes ζ du TCR dans les cellules au repos non stimulées (fig. 22, puits 3). Le pré-traitement des cellules Ee217 avec 100 nM du peptide variant anergique HXB2 réduit de façon importante le niveau de phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 (fig. 22, puits 4). Un traitement similaire des cellules T avec 100 nM du peptide variant CDC42 n'inhibe pas la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 (fig. 22, puits 7), ce qui est cohérent avec l'incapacité du peptide variant CDC42 à induire l'anergie des cellules T. Ces résultats montrent que le pré-traitement des cellules Ee217 avec le peptide variant anergique HXB2 inhibe la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22.

Figure 22. Réduction de la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 dans les cellules Ee217 rendues anergiques avec le peptide variant HXB2.

Les chaînes ζ du TCR ont été précipitées en présence de 5 μg de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂, à partir des lysats des cellules Ee217 (12×10^6 cellules/tests) pré-traitées pendant 48 h avec les APC DR4⁺ seules (puits 3), ou avec les APC DR4⁺ présentant différentes concentrations du peptide variant HXB2 (puits 4 à 6) ou présentant différentes concentrations du peptide variant CDC42 (puits 7 à 9), puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées pendant 5 min avec 10 μM du peptide agoniste PV22. Les produits de co-précipitation ont été analysés par Western blot en utilisant un AcM anti-phosphotyrosine (anti-Ptyr). Le pré-traitement avec le peptide variant anergique HXB2 réduit le niveau de la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 (puits 4). Le pré-traitement avec le peptide variant CDC42 (non anergique) n'inhibe pas la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 (puits 7 à 9).



3- Prévention et réversion, par l'IL-2 exogène, de l'état d'anergie des cellules Ee217 induite par le peptide variant HXB2

Dans plusieurs systèmes expérimentaux, l'état d'anergie des cellules T, induite par les APL via le TCR ou par l'absence du signal co-stimulateur, est le résultat d'une répression active de l'activation transcriptionnelle du gène codant pour l'IL-2 (Boussiotis *et al.*, 1997; Telander *et al.*, 1999). Cette répression de l'activité transcriptionnelle et par conséquent de la production de l'IL-2 empêche les cellules T stimulées avec le peptide agoniste d'entamer le cycle cellulaire. En effet, Madrenas et Germain (1996) ont montré que l'addition de l'IL-2 exogène au moment de la stimulation des cellules T avec un APL anergique, ou durant la période de récupération avant la stimulation avec le peptide agoniste est suffisante pour prévenir ou renverser l'induction de l'état d'anergie. Pour faire suite à ces travaux, nous avons évalué la capacité de l'IL-2 exogène à prévenir ou à reverser l'induction de l'anergie des cellules Ee217 par le peptide variant HXB2.

3-1 Prévention de l'anergie des cellules Ee217 par l'IL-2 exogène

Les cellules Ee217 ont été pré-traitées pendant 48 h, avec les APC DR4⁺ seules, ou avec les APC DR4⁺ présentant le peptide variant anergique HXB2 (10⁻⁸ M) ou présentant le peptide variant CDC42 (10⁻⁸ M), en présence de l'IL-2 humaine recombinante (IL-2hr) à 50 U/ml. Les cellules ont été par la suite maintenues au repos pendant 48 h en absence de l'IL-2hr, avant d'être stimulées avec la concentration mitogénique du peptide agoniste PV22 (10⁻⁸ M) pour évaluer leur capacité de prolifération. Les résultats présentés dans la figure 23-A montrent clairement qu'en absence de l'IL-2hr exogène pour induire l'anergie, le pré-traitement des cellules Ee217 avec le peptide variant anergique HXB2 réduit de 90 % la capacité de prolifération en réponse au peptide agoniste PV22, comparé au peptide variant non anergique CDC42, qui a un effet minime sur la capacité de prolifération des cellules Ee217 (fig. 23-A).

L'addition de l'IL-2hr exogène (50 U/ml) au moment du pré-traitement avec le peptide variant HXB2 préserve 70 % de la capacité maximale de prolifération des cellules Ee217 en réponse au peptide agoniste PV22 (fig. 23-B).

Dans leur ensemble, ces résultats montrent que l'addition de l'IL-2hr exogène au moment du pré-traitement prévient l'induction de l'anergie des cellules Ee217 par le peptide variant HXB2.

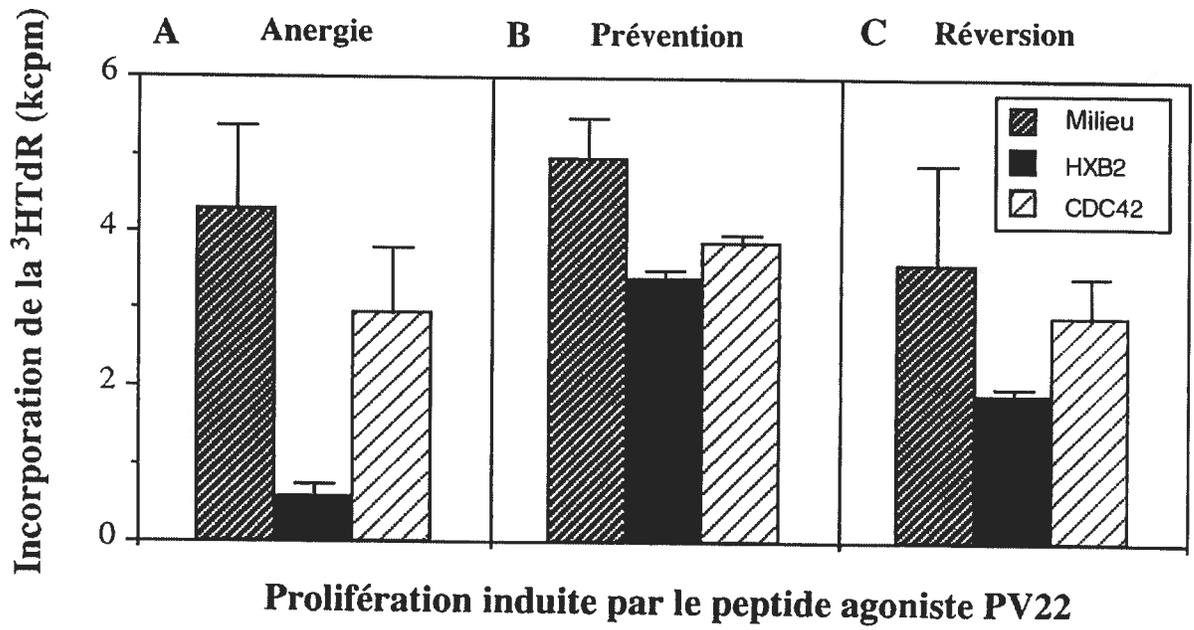
3-2 Réversion de l'anergie des cellules Ee217 par l'IL-2 exogène

Pour vérifier si l'état d'anergie des cellules Ee217 induite par le peptide variant HXB2 est réversible, les cellules Ee217 ont été pré-traitées pendant 48 h, avec les APC DR4⁺ seules, ou avec les APC DR4⁺ présentant le peptide variant anergique HXB2 (10^{-8} M) ou le peptide variant CDC42 (10^{-8} M), en absence de l'IL-2hr exogène. Les cellules ont été par la suite maintenues au repos pendant 48 h en présence de l'IL-2hr (50 U/ml), avant d'être stimulées avec la concentration mitogénique du peptide agoniste PV22 (10^{-8} M) pour évaluer leur capacité de prolifération.

Les résultats de cette expérience, présentés dans la figure 23-C, montrent que l'addition de l'IL-2hr exogène pendant la période de repos des cellules rendues anergiques par le peptide variant HXB2 rétablit 60 % de la capacité de prolifération maximale des cellules Ee217 en réponse au peptide agoniste PV22. L'IL-2hr exogène favorise la récupération de la capacité de prolifération des cellules anergiques et le renversement de l'anergie induite par le peptide variant HXB2.

Figure 23. Prévention et réversion par l'IL-2 exogène, de l'état d'anergie des cellules Ee217 induite par le peptide variant HXB2.

Prolifération des cellules Ee217 pré-traitées, pendant 48 h, avec les APC-DR4⁺ seules, ou avec les APC-DR4⁺ présentant le peptide variant HXB2 (10^{-8} M) ou bien présentant le peptide variant CDC42 (10^{-8} M), puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec le peptide agoniste PV22 (10^{-8} M). (A) Pour induire l'anergie, l'expérience de prolifération a été réalisée en absence de l'IL-2 exogène. (B) Pour prévenir l'anergie, l'IL-2 (50 U/ml) a été ajoutée durant la période de pré-traitement avec les peptides. (C) Pour reverser l'anergie, l'IL-2 (50 U/ml) a été ajoutée durant la période de repos avant la stimulation avec le peptide agoniste PV22. Cette analyse a montré que l'IL-2 exogène a permis de prévenir et de reverser l'anergie induite par le peptide variant HXB2.



4- Anergie des cellules Ee217 induite par absence de co-stimulation

La deuxième partie de notre projet de recherche consistait en la caractérisation et la comparaison de deux modèles d'anergie induits dans le même système cellulaire. Ceci devrait nous permettre d'élucider les mécanismes moléculaires responsables de l'anergie des cellules T lors de l'infection au VIH-1. Nous avons d'abord comparé les activités fonctionnelles des cellules Ee217 rendues anergiques par l'absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3 avec celles des cellules Ee217 rendues anergiques par l'APL présenté par les APC fonctionnelles après la stimulation productive.

4-1 Activation et prolifération des cellules Ee217 en réponse à la stimulation avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28

En plus de la stimulation du TCR, l'activation productive des lymphocytes T humains nécessite une seconde stimulation, le plus souvent fournie par l'interaction de la molécule CD28 à la surface des cellules T avec son ligand présent sur les APC. L'absence de ce signal co-stimulateur empêcherait la sécrétion de l'IL-2 et la prolifération des cellules et, par conséquent, conduirait à un état d'anergie (Jenkins et Schwartz., 1987). Dans notre étude, nous avons comparé l'état d'anergie induite par absence de co-stimulation, avec l'état d'anergie induite par l'APL agoniste partiel en présence du signal co-stimulateur, et ce dans un même système cellulaire. Pour ce faire, nous avons d'abord défini les conditions où la prolifération des cellules Ee217 induite par les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28 sont comparables à celles de la prolifération induite par le peptide agoniste PV22. Nous avons effectué une expérience dose-réponse dans laquelle les cellules Ee217 ont été stimulées, en absence de l'IL-2 exogène, avec des doses croissantes de l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAMIg (antisérum de chèvre dirigé contre les Ig murines), tout en gardant une dose constante de l'AcM anti-CD28 (0.1 µg), pour évaluer leur capacité de prolifération.

Les résultats présentés dans la figure 24-A montrent la présence d'une réponse dose-dépendante des cellules Ee217 à la stimulation par la combinaison AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28. La réponse proliférative maximale des cellules Ee217 a été obtenue lorsque les cellules sont traitées avec 2.4 ng de l'AcM anti-CD3 et 0.1 μ g d'AcM anti-CD28. Ce sont ces quantités des AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28 qui ont été utilisées durant cette étude pour l'induction de la prolifération des cellules T. Aucune prolifération n'a été détectée lorsque les cellules sont traitées avec chacun des AcM séparément.

4-2 Induction de l'anergie des cellules Ee217 par l'AcM anti-CD3

La stimulation des cellules T avec l'AcM anti-CD3 seul peut être utilisée pour mimer l'occupation du TCR en absence de co-stimulation et induire l'anergie (Jenkins *et al.*, 1990). Pour déterminer si la stimulation du TCR seul des cellules Ee217 est suffisante pour induire l'anergie par absence de co-stimulation, les cellules ont été pré-traitées avec des doses croissantes de l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAM1g, pendant 48 h. Par la suite, les cellules ont été maintenues au repos pendant 48 h, et finalement stimulées avec la combinaison mitogénique des AcM anti-CD3 (2.4 ng) \oplus anti-CD28 (0.1 μ g) pour évaluer leur capacité de prolifération. Tel qu'illustré dans la figure 24-B, le pré-traitement des cellules par l'AcM anti-CD3 induit une inhibition dose-dépendante de la prolifération des cellules T Ee217 en réponse à la stimulation normale avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28. Nous avons également montré que le pré-traitement des cellules T avec 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 entraîne une réduction de 90 % de la réponse proliférative induite par la stimulation des cellules Ee217 avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28. Cette expérience nous a permis de déterminer la quantité de l'AcM anti-CD3 (1.2 ng) qui sera utilisée pour induire l'anergie des cellules T Ee217 par absence de co-stimulation dans les expériences subséquentes.

Figure 24.

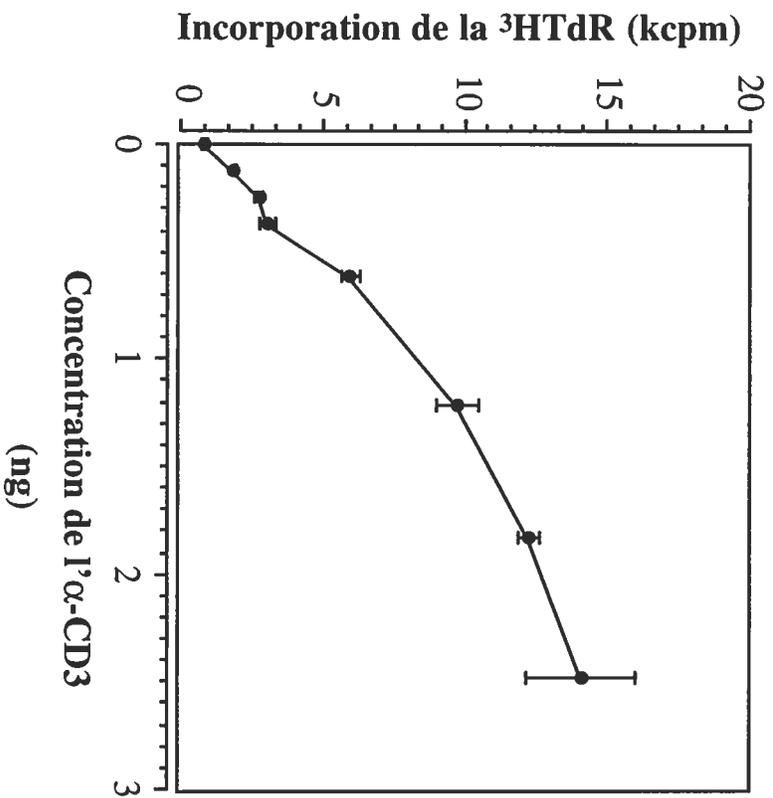
A: Prolifération des cellules Een217 en réponse à la stimulation avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28.

Prolifération des cellules Een217 en réponse à des doses croissantes de l'AcM anti-CD3 (α CD3 : 0.1 ng à 3 ng) immobilisé par le GAMIg (1 μ g) en présence d'une dose constante de l'AcM anti-CD28 (0.1 μ g). La prolifération maximale des cellules Een217 est atteinte après stimulation avec 2.44 ng d'AcM anti-CD3 ⊕ 0.1 μ g d'AcM anti-CD28.

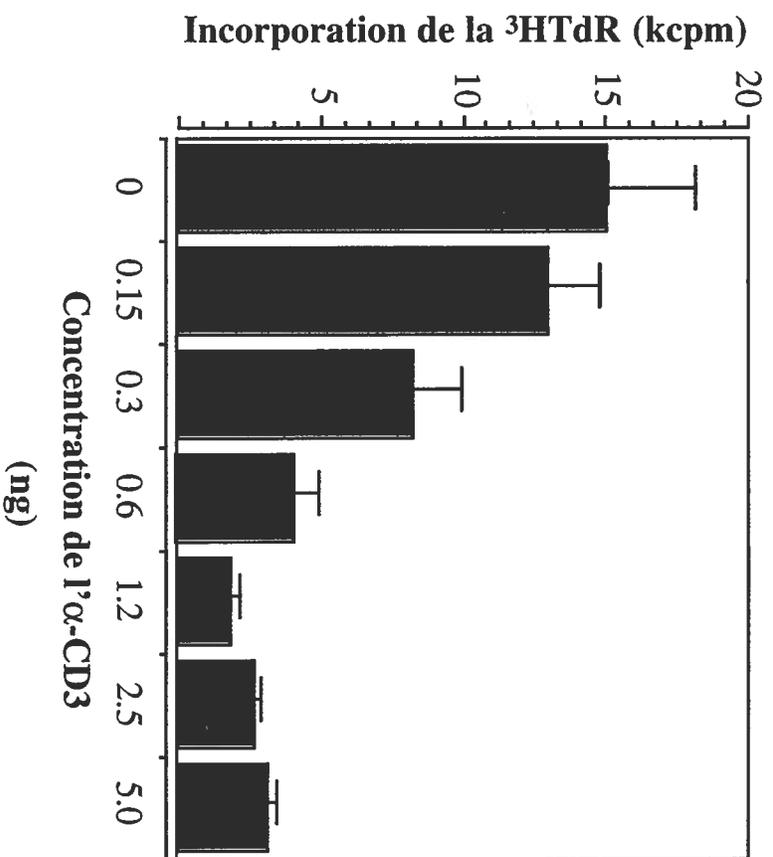
B: Induction de l'anergie des cellules Een217 par stimulation avec l'AcM anti-CD3 seul.

Prolifération des cellules Een217 pré-traitées, pendant 48 h, avec 1 μ g de GAMIg seul (contrôle positif) ou avec des doses croissantes de l'AcM anti-CD3 (0.15 ng à 5 ng) immobilisé avec le GAMIg, puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec les AcM anti-CD3 (2.44 ng) ⊕ anti-CD28 (0.1 μ g). Le pré-traitement avec 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 inhibe la prolifération des cellules Een217 avec un taux d'inhibition de 90 %. La quantité optimale d'AcM anti-CD3 (1.2 ng) pour induire l'anergie des cellules Een217 en absence de co-stimulation a été déterminée par cette expérience.

A



B



4-3 Inhibition de la prolifération des cellules Een217, pré-traitées avec l'AcM anti-CD3, en réponse à la stimulation par le peptide agoniste PV22

Nous avons déjà montré que les cellules Een217 peuvent être rendues anergiques par le traitement des cellules avec un APL naturel dérivé de la gp120 de la souche HXB2 du VIH-1, qui ne diffère du peptide agoniste PV22 que par seulement deux acides aminés (fig. 16) (Bouhdoud *et al.*, 2000).

Afin de déterminer si la prolifération des cellules Een217 en réponse au peptide agoniste PV22 peut aussi être inhibée par le pré-traitement des cellules avec l'AcM anti-CD3 seul, les cellules T ont été incubées, pendant 48 h, en présence de 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAMIg. Les cellules ont été maintenues au repos pendant 48 h, et finalement stimulées avec des concentrations croissantes du peptide agoniste PV22 pour évaluer leur capacité de prolifération. Les résultats présentés dans la figure 25-A montrent que le pré-traitement des cellules avec l'AcM anti-CD3 bloque la prolifération des cellules Een217 en réponse au peptide agoniste PV22 avec un pourcentage d'inhibition variant de 80 à 85. Ainsi, l'anergie induite par l'AcM anti-CD3 en absence du signal co-stimulateur ne peut pas être surmontée par la stimulation *in vitro* des cellules Een217 avec leur ligand physiologique, le peptide agoniste PV22.

4-4 Inhibition de la prolifération des cellules Een217 pré-traitées avec le variant anergique HXB2 en réponse à la stimulation par les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28

Nous avons déjà établi que le pré-traitement des cellules Een217 avec l'APL dérivé de la souche virale HXB2 (10^{-8} M) entraîne un état d'anergie où l'induction de la prolifération des cellules T par le peptide agoniste PV22 est bloquée (Bouhdoud *et al.*, 2000). Afin de déterminer si le pré-traitement des cellules Een217 avec le peptide variant HXB2 inhibe la prolifération des cellules en réponse à la stimulation par les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28, les cellules Een217 ont été incubées, pendant 48 h, en présence des APC DR4⁺ présentant des

concentrations croissantes du peptide variant HXB2 ou du peptide variant CDC42. Le peptide CDC42 qui n'induit ni la prolifération ni l'anergie des cellules Ee217 est utilisé comme contrôle positif. Les cellules ont été maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec la combinaison mitogénique des AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28 pour évaluer leur capacité de prolifération. Les résultats présentés dans la figure 25-B montrent que le pré-traitement des cellules avec le peptide variant HXB2 inhibe la prolifération des cellules T en réponse à la stimulation par les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28. Par contre, et sous les mêmes conditions expérimentales, le peptide variant CDC42 n'a aucun effet inhibiteur sur la prolifération des cellules (fig. 25-B). L'anergie maximale en réponse à la stimulation par les AcM est obtenue lorsque les cellules sont pré-traitées avec 10^{-8} M du peptide variant HXB2 avec une inhibition de 95 % de la prolifération. Vu que le traitement des cellules Ee217 avec 10 nM du peptide variant anergique HXB2 ne cause pas l'internalisation du complexe TCR/CD3 ou du récepteur CD4 (Bouhdoud *et al.*, 2000), il est peu probable que l'incapacité des cellules T de répondre à la stimulation avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28 soit due à une diminution dans l'expression de surface du TCR ou du récepteur CD3.

Figure 25.

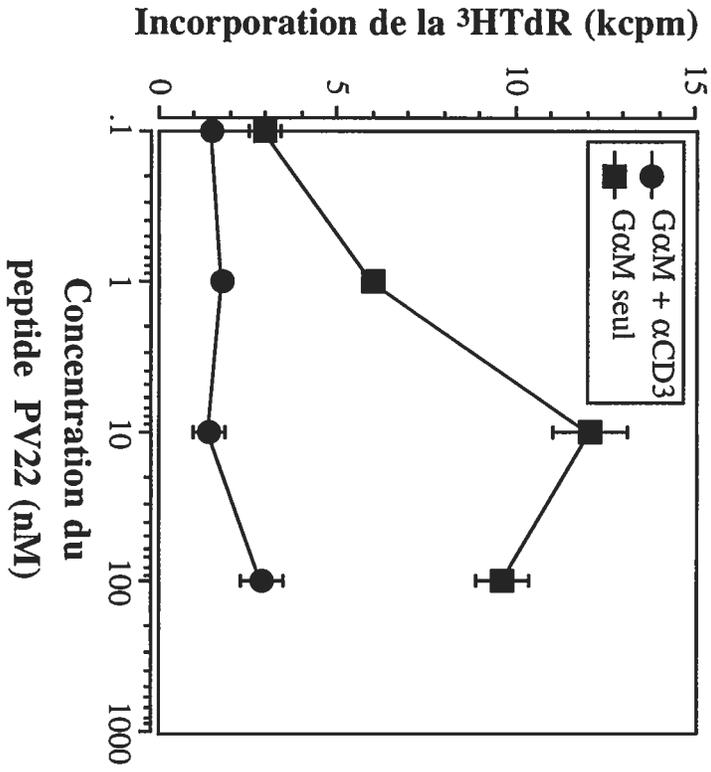
A: Inhibition de la prolifération des cellules Ee217 pré-traitées avec l'AcM anti-CD3 en réponse au peptide agoniste PV22.

Prolifération des cellules Ee217 pré-traitées, pendant 48 h, avec 1 µg de GAMIg seul (GαM) (contrôle positif) ou avec 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 (αCD3) immobilisé avec le GAMIg, puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec différentes concentrations du peptide agoniste PV22. Le pré-traitement avec l'AcM anti-CD3 inhibe la prolifération des cellules Ee217 de 75 % à 85 % en réponse à la stimulation avec le peptide agoniste PV22.

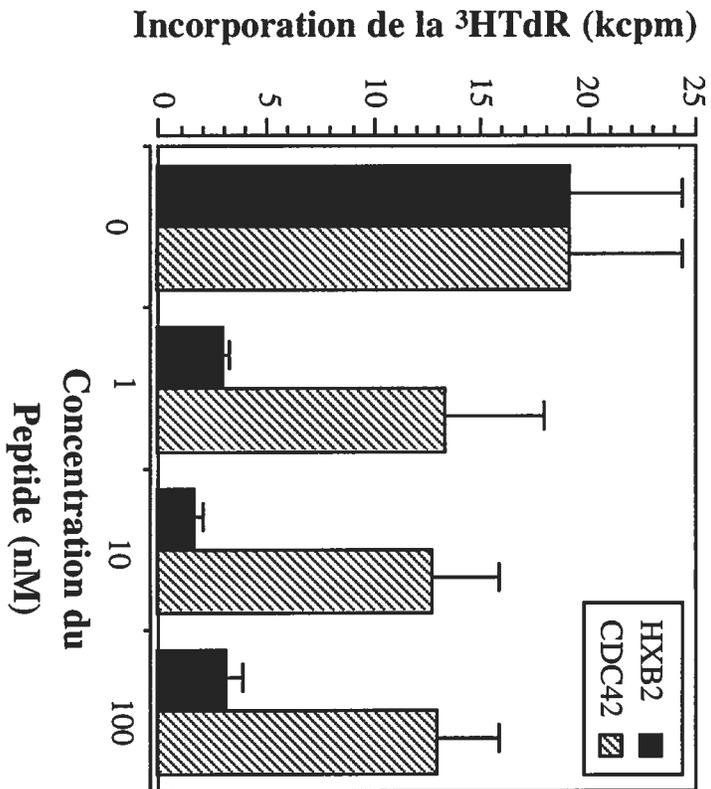
B: Inhibition de la prolifération des cellules Ee217 pré-traitées avec le peptide variant anergique HXB2 en réponse à la stimulation par les AcM.

Prolifération des cellules Ee217 pré-traitées, pendant 48 h, avec les APC DR4⁺ seules ou avec les APC-DR4⁺ présentant le peptide variant HXB2 (1 nM à 100 nM) ou bien présentant le peptide variant CDC42 (1 nM à 100 nM), puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec les AcM anti-CD3 (2.44 ng) ⊕ anti-CD28 (0.1 µg). Le pré-traitement avec le peptide anergique HXB2 inhibe la prolifération des cellules Ee217 en réponse à la stimulation avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28. L'anergie maximale en réponse à la stimulation par les AcM est atteinte lorsque les cellules sont pré-traitées avec 10 nM du peptide anergique HXB2, avec une inhibition de 95 % de la prolifération.

A



B



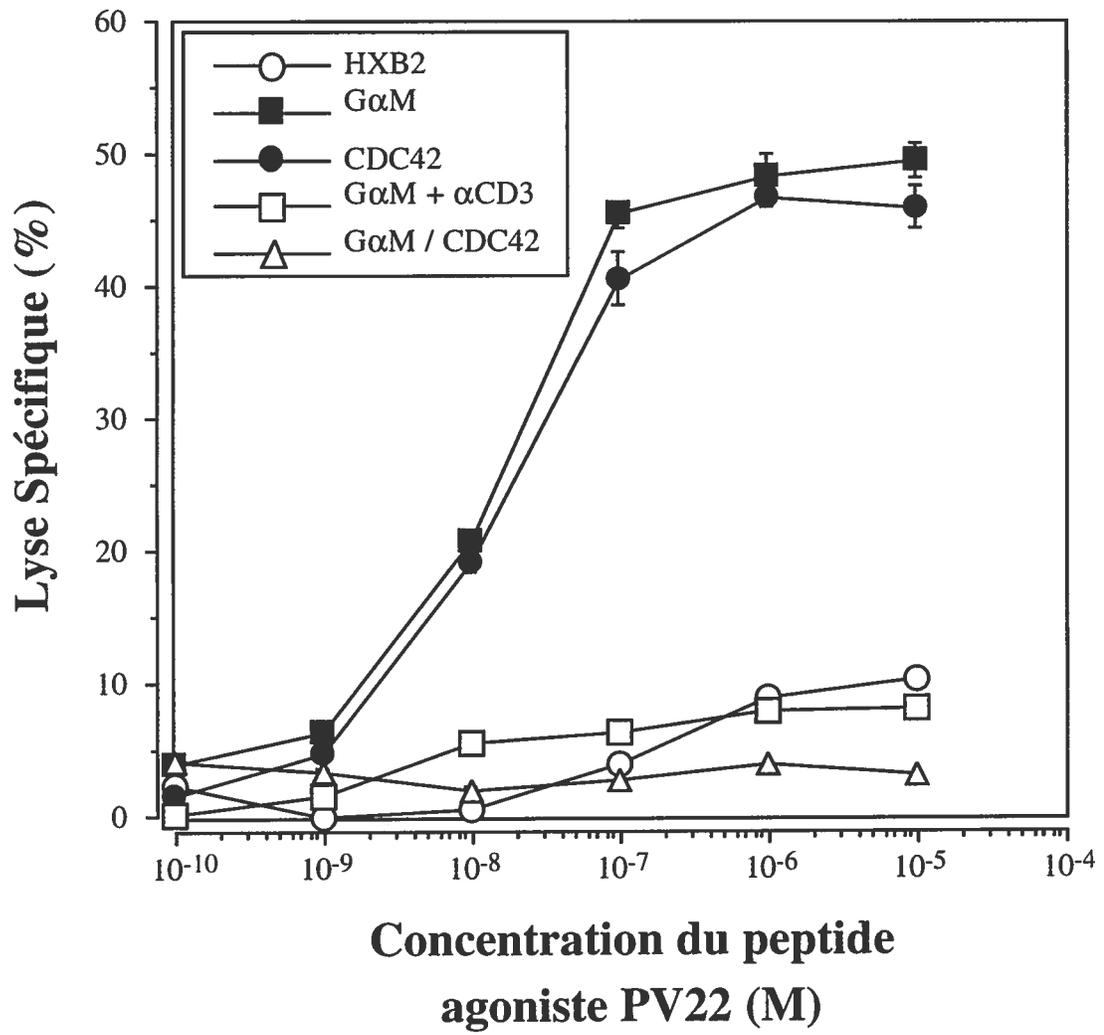
4-5 Inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Ee217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 en réponse au peptide agoniste PV22

Nous avons déjà démontré (Bouhdoud *et al.*, 2000), que le pré-traitement des cellules Ee217 avec l'APL dérivé de la souche virale HXB2 inhibe complètement l'induction de l'activité cytotoxique des cellules T Ee217 observée en réponse au peptide agoniste PV22. Ainsi et afin de vérifier si le pré-traitement des cellules Ee217 avec l'AcM anti-CD3 bloque aussi l'induction de l'activité cytotoxique des cellules T en réponse au peptide antigénique PV22, les cellules Ee217 ont été pré-traitées, pendant 48 h, avec 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAMIg, ou avec les APC DR4⁺ présentant 10⁻⁸ M du peptide variant HXB2 ou présentant 10⁻⁸ M du peptide variant CDC42. Les cellules ont été maintenues au repos pendant 48 h, et ensuite stimulées avec des concentrations croissantes du peptide agoniste PV22 présenté par les cellules cibles (fibroblastes HLA-DR4⁺) pour mesurer leur activité cytotoxique. Les résultats présentés dans la figure 26 nous ont permis de montrer que le pré-traitement des cellules Ee217 avec l'AcM anti-CD3 ou avec le peptide variant HXB2 inhibe l'induction de l'activité cytotoxique des cellules T en réponse au peptide agoniste PV22 avec une lyse spécifique <5 %. La pré-incubation des cellules avec le GAMIg seul ou avec le peptide variant CDC42 n'interfère pas avec l'induction de la fonction cytotoxique des cellules Ee217. Ces données confirment en fait, l'inhibition de l'activité cytotoxique des CTL CD4⁺ spécifiques au VIH-1 rendues anergiques par absence de co-stimulation *in vitro*.

En conclusion, les résultats obtenus montrent clairement que le pré-traitement des cellules Ee217 avec l'AcM anti-CD3 seul (stimulation du TCR en absence de co-stimulation) ou par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 présenté par les APC (stimulation du TCR par l'APL en présence de co-stimulation) ont induit, et ce à un même degré, l'inhibition des réponses fonctionnelles des cellules T en réponse à la stimulation mitogénique avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28.

Figure 26. Inhibition de l'activité cytotoxique des cellules Ee217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 en réponse au peptide agoniste PV22.

Activité cytotoxique des cellules Ee217, pré-traitées avec i) 1 µg de GAMIg seul (GαM) (contrôle positif), ii) 1.2 ng d'AcM anti-CD3 (αCD3) immobilisé par le GAMIg, iii) les APC-DR4⁺ présentant le peptide variant HXB2 (10⁻⁸ M), iiiii) les APC-DR4⁺ présentant le peptide variant CDC42 (10⁻⁸ M), dirigée contre les cellules cibles HLA-DR4⁺ présentant différentes concentrations du peptide agoniste PV22 (contrôle positif) ou du peptide variant CDC42 (contrôle négatif). Le ratio effecteurs:cibles utilisé dans les expériences de cytotoxicité est de 20:1. L'activité cytotoxique atteint son maximum quand les cellules sont pré-traitées avec le GAMIg seul ou bien avec le peptide variant non-nergique CDC42 (45 % à 50 % de lyse spécifique). Le pré-traitement avec l'AcM anti-CD3 ou avec le peptide variant anergique HXB2 inhibe l'activité cytotoxique des cellules Ee217 en réponse au peptide agoniste PV22 de 95 % (lyse spécifique <5 %). Le pré-traitement avec l'AcM anti-CD3 induit donc le même effet inhibiteur que le peptide variant anergique HXB2.

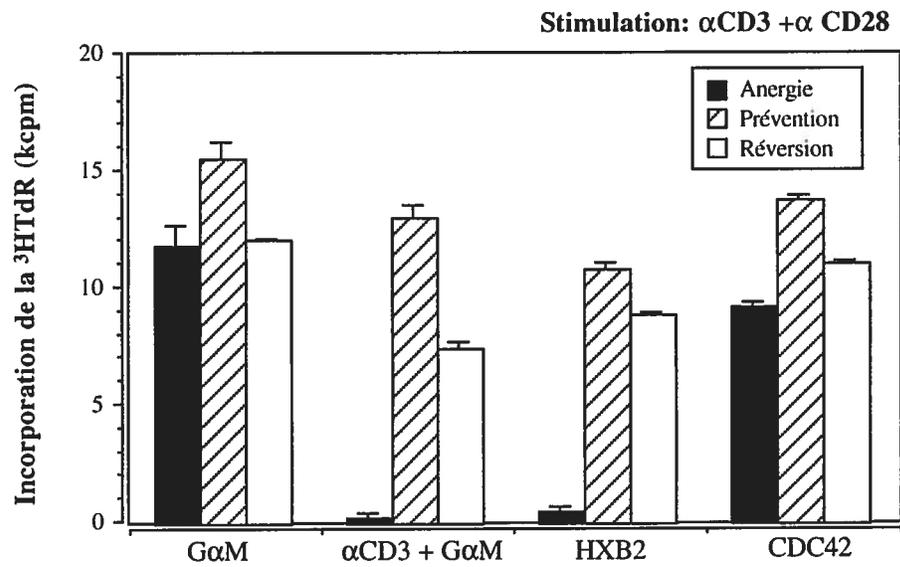
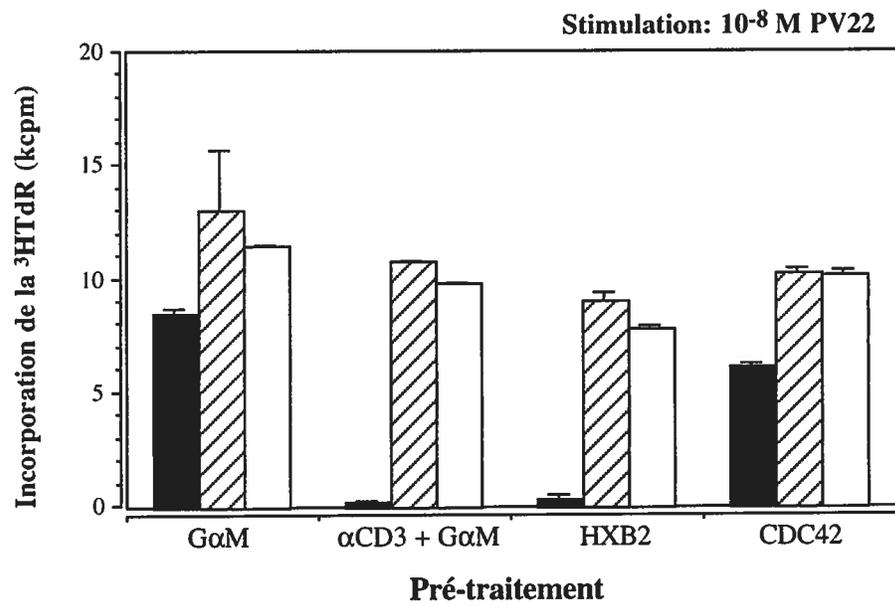


5- Prévention et Réversion, par l'IL-2 exogène, de l'anergie des cellules Ee217 induite par absence de co-stimulation

L'addition de l'IL-2rh exogène permet de prévenir et de reverser l'état d'anergie induite par l'APL dérivé de la souche virale HXB2, suggérant ainsi que le phénotype anergique est causé par l'incapacité des cellules T à sécréter l'IL-2 en réponse à la stimulation par le peptide agoniste PV22 (Bouhdoud *et al.*, 2000). Il nous est donc important de déterminer si l'état d'anergie induite dans les cellules Ee217 par l'AcM anti-CD3 en absence de co-stimulation peut être bloquée par l'addition de l'IL-2rh exogène. Ainsi, les cellules Ee217 ont été pré-traitées, pendant 48 h, avec 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAMIg, ou avec les APC DR4⁺ présentant 10⁻⁸ M du peptide variant HXB2 ou présentant 10⁻⁸ M du peptide variant CDC42. Après une période de repos de 48 h, les cellules T ont été stimulées avec la combinaison mitogénique des AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28, ou avec 10⁻⁸ M du peptide agoniste PV22 pour évaluer leur capacité de prolifération. En absence de l'IL-2rh exogène, le pré-traitement des cellules Ee217 avec l'AcM anti-CD3 ou avec le peptide variant anergique HXB2, inhibe à plus de 90 % leur capacité de prolifération en réponse aux AcM ou en réponse au peptide agoniste PV22 (fig. 27-A,B). Aucun état d'anergie n'est observé lorsque les cellules sont pré-traitées avec le GAMIg seul ou avec le peptide variant CDC42 (fig. 27-A,B). L'addition de l'IL-2rh exogène (50 U/ml), au moment du pré-traitement pour prévenir l'anergie, ou durant la période de repos pour reverser l'anergie (fig. 27-A,B), bloque l'état d'anergie induite par l'AcM anti-CD3 ou par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 dans les cellules Ee217 qui récupèrent plus de 60 % de leur capacité de prolifération en réponse aux stimulations mitogéniques. En conclusion, cette expérience nous a permis de montrer que l'état d'anergie induite par l'APL dérivé de la souche virale HXB2, et l'état d'anergie induite par l'AcM anti-CD3 en absence de co-stimulation partagent le même défaut primaire, c'est-à-dire l'incapacité de sécréter l'IL-2 en réponse à la stimulation mitogénique.

Figure 27. Prévention et réversion, par l'IL-2 exogène, de l'anergie des cellules Ee217 induite par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant anergique HXB2.

Prolifération des cellules Ee217 pré-traitées, pendant 48 h, avec i) 1 µg de GAMIg (GαM) (contrôle positif), ii) 1.2 ng d'AcM anti-CD3 (αCD3) immobilisé par le GAMIg, iii) les APC-DR4⁺ présentant le peptide variant HXB2 (10⁻⁸ M), iiiii) les APC-DR4⁺ présentant le peptide variant CDC42 (10⁻⁸ M), puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec les AcM anti-CD3 (2.44 ng) ⊕ anti-CD28 (0.1 µg) (A) ou avec le peptide agoniste PV22 (10⁻⁸ M) (B). Pour induire l'anergie, l'expérience de prolifération a été réalisée en absence de l'IL-2hr (Histogrammes noirs). Pour prévenir l'anergie, l'IL-2hr (50 U/ml) a été ajoutée durant la période de pré-traitement (Histogrammes rayés). Pour reverser l'anergie, l'IL-2hr (50 U/ml) a été ajoutée durant la période de repos avant la stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22 (Histogrammes blancs). Cette analyse montre clairement que l'IL-2hr exogène permet de prévenir et de reverser l'induction de l'anergie des cellules Ee217 qui récupèrent plus de 60 % de leur capacité de prolifération en réponse aux stimulations mitogéniques.

A**B**

Anergie: Sans IL-2
Prévention: IL-2 ajouté durant le pré-traitement
Réversion: IL-2 ajouté durant la période de repos

6- Induction de l'expression du récepteur CD25 de l'IL-2 dans les cellules Ee217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 et stimulées avec le peptide agoniste PV22

Nous avons montré que les cellules Ee217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 sont capables de proliférer normalement après l'addition de l'IL-2rh exogène (50 U/ml), il nous reste donc à déterminer si l'expression du récepteur CD25 de l'IL-2 est induite à la surface des cellules anergiques après leur stimulation avec la combinaison mitogénique des AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28 ou avec le peptide agoniste PV22. Ainsi, les cellules Ee217 ont été pré-traitées, pendant 48 h, avec 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAMiG, ou avec les APC DR4⁺ présentant le peptide variant HXB2 (10⁻⁸ M). Après une période de repos de 48 h, les cellules ont été stimulées avec le peptide agoniste PV22 (10⁻⁸ M) ou avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28. Le niveau d'expression du récepteur CD25 à la surface des cellules a été évalué par cytométrie de flux, en utilisant l'AcM anti-CD25 dirigé contre la sous-unité α du récepteur de l'IL-2. L'analyse des résultats a révélé qu'au delà de 99 % de la population cellulaire non anergiques expriment à haute densité (MFI>9) le récepteur de surface CD25, après stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22 (Tableau 3). Par contre les cellules Ee217 rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 expriment à très faible densité (MFI=3) l'antigène de surface CD25 suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM, et ce malgré le fait qu'une large proportion de la population cellulaire (74 % à 83 %) expriment à leur surface le récepteur CD25 (Tableau 3). Fait très intéressant, la stimulation avec le peptide agoniste PV22 des cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 a permis d'induire l'expression à haute densité du récepteur CD25 (MFI>9), alors que la stimulation de ces même cellules avec les AcM n'a pas d'effet sur la densité du récepteur CD25 (MFI=2.87) à la surface des cellules (Tableau 3). L'expression à faible densité du récepteur CD25 semble être suffisante pour permettre la prolifération des cellules anergiques par l'IL-2rh exogène (fig. 27).

Tableau 3. Induction de l'expression du récepteur CD25 à la surface des cellules Ee217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22.

Les cellules Ee217 ont été pré-incubées, pendant 48 h, avec i) 1 µg de GAMiG (GαM) seul, ii) 1.2 ng d'AcM anti-CD3 (αCD3) immobilisé avec le GAMiG, iii) les APC DR4⁺ présentant le peptide variant anergique HXB2 (10⁻⁸ M), puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec les AcM anti-CD3 (2.44 ng) ⊕ anti-CD28 (0.1 µg) ou avec le peptide agoniste PV22 (10⁻⁸ M), pendant 48 h. Un million de cellules de chaque stimulation ont été marquées par l'AcM anti-CD25 conjugué à la FITC, puis analysées par cytométrie de flux. Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de cellules CD25⁺ et aussi sous forme de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de l'antigène CD25 à la surface des cellules (densité d'expression). Ainsi, 99.3 % à 99.5 % des cellules pré-traitées avec le GAMiG et stimulées par les AcM ou par 10⁻⁸ M du peptide agoniste PV22 expriment le récepteur CD25 avec une haute densité (MFI>9). Cette expression à haute densité du récepteur CD25 n'est pas induite dans les cellules pré-traitées par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 et stimulées avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22 (MFI=3). Dans le cas des cellules pré-traitées par l'AcM anti-CD3, la stimulation avec le peptide agoniste PV22 induit l'expression du récepteur CD25 à une haute densité, avec une MFI>9.

Pré-traitement	Stimulation	Cellules CD25 ⁺ (%)	MFI
GαM	Aucune	3.5	1.90
GαM	αCD3+αCD28	99.3	9.48
GαM	PV22 10 ⁻⁸ M	99.5	10.50
GαM + αCD3	αCD3+αCD28	71.3	2.87
GαM + αCD3	PV22 10 ⁻⁸ M	99.1	9.37
HXB2 10 ⁻⁸ M	αCD3+αCD28	83.2	3.44
HXB2 10 ⁻⁸ M	PV22 10 ⁻⁸ M	74.4	3.02

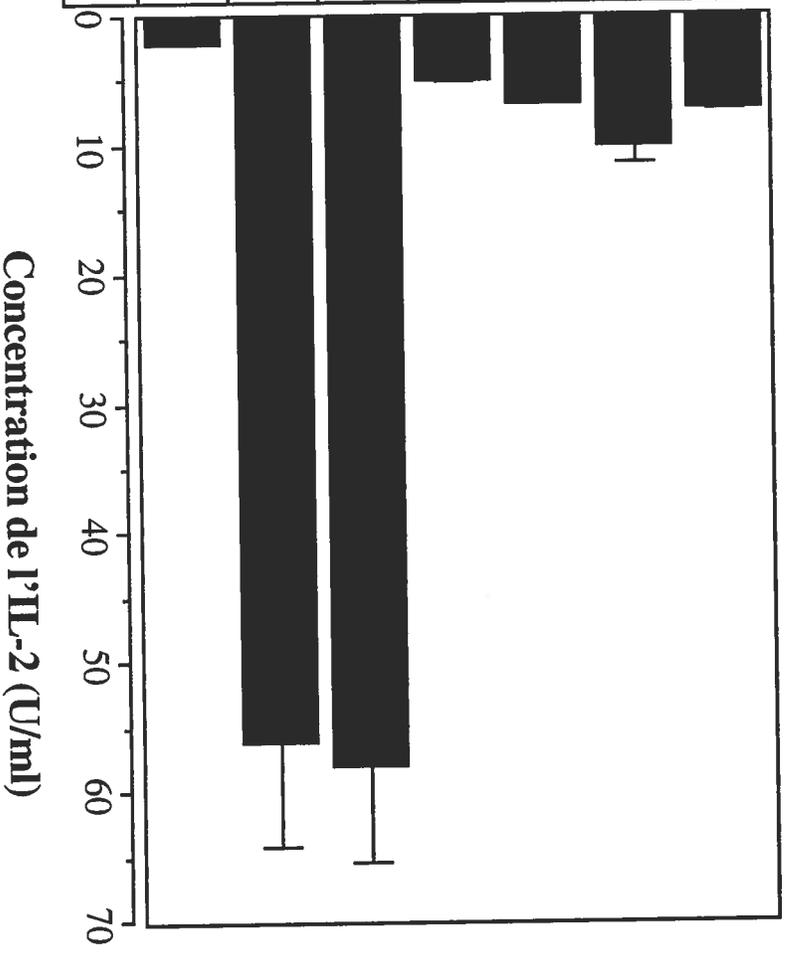
7- Inhibition de la sécrétion de l'IL-2 par les cellules Ee217 anergiques suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28

Nous avons montré que l'addition de l'IL-2rh exogène (50 U/ml) bloque l'induction de l'anergie des cellules Ee217 par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 ou par l'AcM anti-CD3 (fig. 27). Ceci suggère l'absence de la production de l'IL-2 par les cellules T suite à leur stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28. Pour vérifier cette déficience dans la production de l'IL-2, nous avons mesuré directement la quantité de l'IL-2 générée à la suite de la stimulation productive des cellules Ee217 au repos, ou rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2, ou par l'AcM anti-CD3. Ainsi, les CTL Ee217 ont été pré-traitées, pendant 48 h, avec 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAMIg, ou avec les APC DR4⁺ présentant 10⁻⁸ M du peptide variant HXB2. Après une période de repos de 48 h, les cellules ont été stimulées avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28 ou avec le peptide agoniste PV22 (10⁻⁸ M) pour évaluer capacité de prolifération. Les surnageants des cultures ont été dilués et utilisés ensuite pour stimuler la prolifération de la lignée cellulaire CTLL-2 dépendante de l'IL-2. La quantité d'IL-2 produite, en U/ml, a été déterminée après extrapolation des valeurs de la radioactivité incorporée par les CTLL-2 sur une courbe étalon générée en utilisant une solution standard d'IL-2rh (100 U/ml). Les résultats présentés dans la figure 28 montrent que, la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM, des cellules pré-traitées par le GAMIg seul a permis de générer les mêmes concentrations d'IL-2 (entre 50 et 60 U/ml d'IL-2), ce qui confirme à nouveau que les deux stimulations étaient efficaces dans l'induction de l'activation des cellules Ee217. Tel que prévu, la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM, des cellules rendues anergiques par le peptide variant HXB2 ou par l'AcM anti-CD3, n'induit pas la production de quantités significatives de l'IL-2 (<10 U/ml). En conclusion, ces résultats confirment le fait selon lequel la production de l'IL-2 est inhibée et ce, dans le cas des deux modèles d'anergie des cellules Ee217.

Figure 28. Mesure de l'IL-2 secrétée par les cellules Ee217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant HXB2, suite la stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22.

Les cellules Ee217 ont été pré-incubées, pendant 48 h, avec i) 1 µg de GAMIg (GαM) seul, ii) 1.2 ng d'AcM anti-CD3 (αCD3) immobilisé avec le GAMIg, iii) les APC DR4⁺ présentant le peptide variant anergique HXB2 (10⁻⁸ M), puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées avec les AcM anti-CD3 (2.44 ng) ⊕ anti-CD28 (0.1 µg) ou avec le peptide agoniste PV22 (10⁻⁸ M), pendant 48 h. L'IL-2 secrétée présente dans les surnageants de culture a été mesurée, lors d'une épreuve biologique utilisant la lignée cellulaire CTLL-2, par extrapolation sur une courbe étalon générée en utilisant une solution standard d'IL-2hr (100 U/ml). Les résultats sont exprimés en unités d'IL-2/ml. Les cellules rendues anergiques par le peptide variant HXB2 ou par l'AcM anti-CD3 ne produisent pas des quantités significatives normales d'IL-2 (<10 U/ml) après leur stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22

α CD3	α CD3 + α CD28
α CD3	PV22
HXB2	α CD3 + α CD28
HXB2	PV22
G α M	α CD3 + α CD28
G α M	PV22
G α M	Milieu seul
Pré-traitement	Stimulation



8- Événements de transduction du signal induits par la stimulation mitogénique des cellules Een217 rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche HXB2 ou par l'AcM anti-CD3

Aucune différence n'a été révélée lors de l'analyse comparative des activités fonctionnelles entre les cellules Een217 rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 en présence de la co-stimulation, et les cellules Een217 rendues anergiques par absence de co-stimulation en utilisant l'AcM anti-CD3. Par contre, l'induction de la sécrétion de l'IL-2 suite à la stimulation du TCR dépend de l'activation de plusieurs cascades de signalisation qui pourraient être affectées différemment par le traitement des cellules T par l'APL ou par l'AcM anti-CD3. D'où l'idée de caractériser et de comparer les événements précoces et tardifs de transduction du signal du TCR induits par la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28, des cellules Een217 rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 ou par l'AcM anti-CD3.

8-1 Restauration de la phosphorylation de la PTK Zap-70, des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 dans les cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22

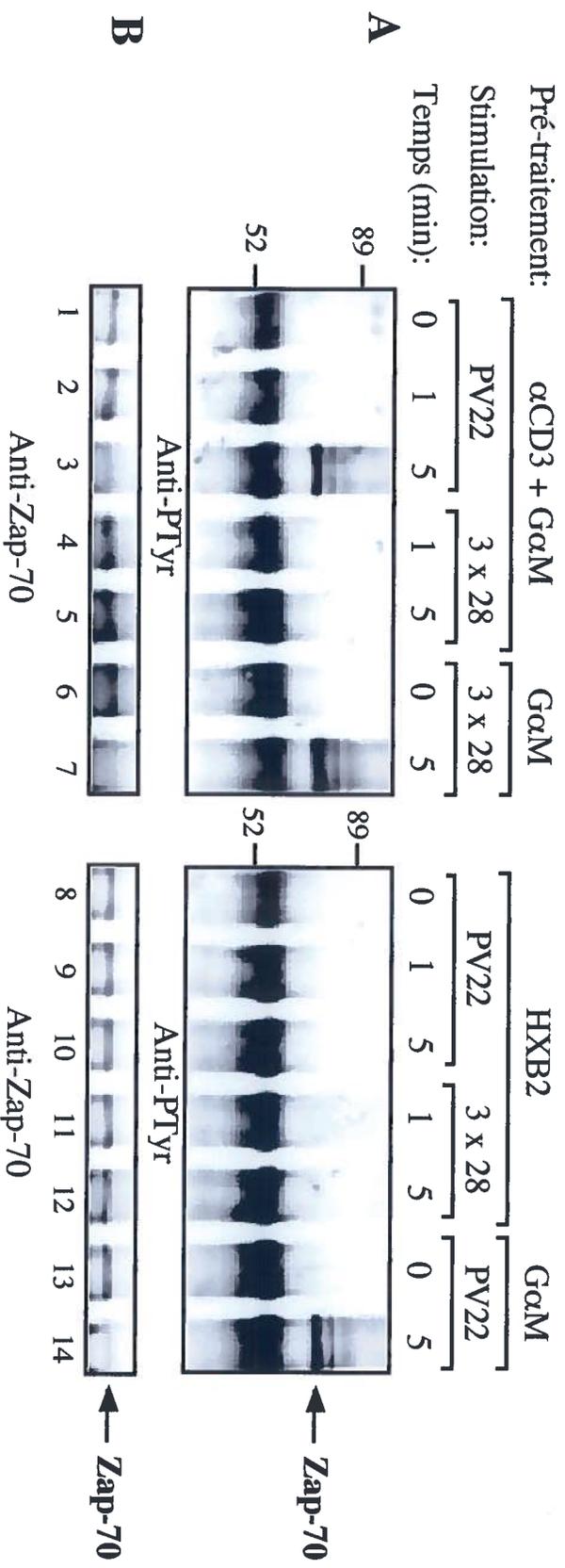
8-1.1 Immunoprécipitation de Zap-70

La phosphorylation de la PTK Zap-70 sur les résidus tyrosine a été mesurée suite à la stimulation mitogénique des cellules anergiques. Les cellules Een217 ont été pré-traitées, pendant 48 h, avec 1.2 ng de l'AcM anti-CD3 immobilisé par le GAMIg, ou avec les APC DR4⁺ présentant 10⁻⁸ M du peptide variant HXB2. Après une période de repos de 48 h, les cellules ont été stimulées pendant 0, 1 ou 5 min avec 10 μ M du peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28. La PTK Zap-70 a été immunoprécipitée à partir des lysats cellulaires à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-Zap-70 et les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par Western blot en utilisant l'AcM anti-phosphotyrosine et l'AcM anti-Zap-70 pour vérifier respectivement les niveaux de

phosphorylation et de l'expression de Zap-70. Cette analyse a montré que Zap-70 est phosphorylée sur ses résidus tyrosines dans les cellules non anergiques (pré-incubées avec le GAMIg seul), après 5 min de stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22 (fig. 29-A, puits 7 et 14). Zap-70 n'est pas phosphorylée dans les cellules rendues anergiques par le peptide variant HXB2, après la stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22 (fig. 29-A, puits 8 à 12). Par contre, dans les cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, la stimulation avec le peptide agoniste PV22 permet de restaurer la phosphorylation normale de Zap-70 (fig. 29-A, puits 3). La phosphorylation de Zap-70 n'est pas restaurée après la stimulation des mêmes cellules avec les AcM (fig. 29-A, puits 4 et 5). Ces résultats nous ont permis de montrer que le peptide agoniste PV22 est capable de restaurer la phosphorylation de Zap-70, via le TCR, dans les cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 en absence de co-stimulation.

Figure 29. Niveau de phosphorylation de la PTK Zap-70, dans les cellules Ee217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant HXB2, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM.

La PTK Zap-70 a été immunoprécipitée à partir des lysats des cellules Ee217 pré-traitées, pendant 48 h, avec i) 1 µg de GAMIg (GαM) seul, ii) 1.2 ng d'AcM anti-CD3 (αCD3) immobilisé avec le GAMIg, iii) les APC DR4⁺ présentant le peptide variant anergique HXB2 (10⁻⁸ M), puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées pendant 0, 1 et 5 min avec 10 µM du peptide agoniste PV22 (puits 1, 2, 3, 4, 8, 9 et 10) ou avec les AcM anti-CD3 (12 ng/ml) ⊕ anti-CD28 (0.5 µg/ml) (puits 4, 5, 11 et 12) (3x28). Les cellules pré-traitées avec le GAMIg seul ont été stimulées pendant 0 et 5 min avec les AcM (puits 6 et 7) ou avec le peptide agoniste PV22 (13 et 14). Les produits d'immunoprécipitation ont été analysés par Western blot en utilisant un AcM anti-phosphotyrosine (anti-Ptyr) (A). Les AcM (3x28) et le peptide agoniste PV22 ont induit la phosphorylation de Zap-70 dans les cellules pré-traitées avec le GAMIg seul (puits 7 et 14) (contrôles positifs), mais aucune phosphorylation n'a été observée dans les cellules pré-traitées avec le peptide variant HXB2 (puits 9 à 12). Cependant seule la stimulation avec le peptide agoniste PV22 des cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, a permis la restauration de la phosphorylation de Zap-70 (puits 3). L'analyse par Western blot en utilisant l'AcM anti-Zap-70 a permis de s'assurer de la présence de quantités équivalentes de Zap-70 dans tous les produits d'immunoprécipitation (B).



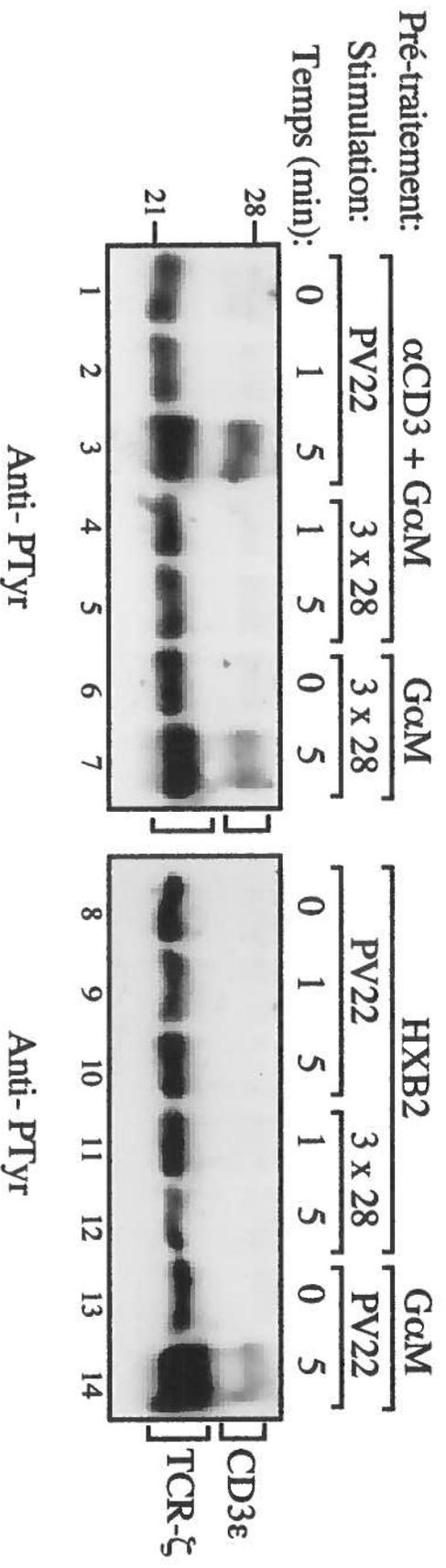
8-1.2 Précipitations des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 en présence de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂

L'activation enzymatique et la phosphorylation de Zap-70 en réponse à la stimulation du TCR requièrent la phosphorylation complète des motifs ITAM des chaînes ζ du TCR et des chaînes ϵ du CD3. Nous avons démontré, ainsi que d'autres auteurs que les chaînes ζ du TCR sont partiellement phosphorylées sur les résidus tyrosines en réponse aux APL, alors que les chaînes ϵ du CD3 associé au TCR demeurent non phosphorylées (Kersh *et al.*, 1998 ; Bouhdoud *et al.*, 2000). Pour déterminer si la stimulation avec le peptide agoniste PV22 est capable également de restaurer la phosphorylation des chaînes ζ du TCR et des chaînes ϵ du CD3 dans les cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, nous avons effectué les mêmes traitements cellulaires que dans les expériences décrites dans la section 8-1.1. Lors de ces expériences, les chaînes accessoires du TCR ont été précipitées en présence de la protéine de fusion GST-Zap (SH2)₂. Les produits de co-précipitation ont été analysés par Western blot en utilisant l'AcM anti-phosphotyrosine. Comme prévu, l'analyse a révélé que dans les cellules pré-traitées avec le GAMiG seul, la stimulation mitogénique avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28 ou avec le peptide agoniste PV22 induit une phosphorylation importante des chaînes ζ du TCR et de la protéine de 26 kDa qui correspond à la chaîne ϵ du CD3 (fig. 30, puits 7 et 14). Le pré-traitement des cellules avec l'AcM anti-CD3 ou avec l'APL dérivé de la souche virale HXB2 induit une phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR mais n'induit aucune phosphorylation des chaînes ϵ du CD3 en réponse à la stimulation avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28 (fig. 30, puits 4, 5, 11 et 12). Nous avons cependant montré que la stimulation avec le peptide agoniste PV22 est capable de restaurer la phosphorylation normale des chaînes ζ du TCR et des chaînes ϵ du CD3 dans les cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 (fig. 30, puits 3), mais pas dans les cellules rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 (fig. 30, puits 9 et 10).

En conclusion, ces expériences nous ont permis de démontrer que la phosphorylation de Zap-70, des chaînes ζ du TCR et des chaînes ϵ du CD3 peut être restaurée à un niveau normal à la suite de la stimulation des cellules, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, avec le peptide agoniste PV22. Cependant l'induction de ces événements précoces n'est pas suffisante pour induire la prolifération cellulaire et l'activité cytotoxique de ces cellules.

Figure 30. Niveau de phosphorylation des chaînes ζ du TCR et des chaînes ϵ du CD3, dans les cellules Ee217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant HXB2, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM.

Les chaînes ζ du TCR ont été précipitées en présence de 5 μg de la protéine de fusion GST-Zap(SH2)₂, à partir des lysats des cellules Ee217 (12x10⁶ cellules/tests) pré-traitées, pendant 48 h, avec i) 1 μg de GAMIg (G α M) seul, ii) 1.2 ng d'AcM anti-CD3 (α CD3) immobilisé avec le GAMIg, iii) les APC DR4⁺ présentant le peptide variant anergique HXB2 (10⁻⁸ M), puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées pendant 0, 1 et 5 min avec 10 μM du peptide agoniste PV22 (puits 1, 2, 3, 4, 8, 9 et 10) ou avec les AcM anti-CD3 (12 ng/ml) \oplus anti-CD28 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (puits 4, 5, 11 et 12) (3x28). Les cellules pré-traitées avec le GAMIg seul ont été stimulées pendant 0 et 5 min avec les AcM (puits 6 et 7) ou avec le peptide agoniste PV22 (13 et 14). L'analyse par Western blot des produits de co-précipitation en utilisant un AcM anti-phosphotyrosine (anti-Ptyr) a montré que la stimulation avec les AcM (3x28) ou avec le peptide agoniste PV22 induit la phosphorylation normale des chaînes ζ du TCR ainsi que celle des chaînes ϵ du CD3 (puits 7 et 14). Par contre dans les cellules pré-traitées avec le peptide variant HXB2, les chaînes ζ du TCR sont partiellement phosphorylées alors que les chaînes ϵ du CD3 ne le sont pas (puits 9 à 12). Seule la stimulation avec le peptide agoniste PV22, des cellules pré-traitées par l'AcM anti-CD3 est capable de restaurer la phosphorylation normale des chaînes ζ du TCR et des chaînes ϵ du CD3 (puits 3).



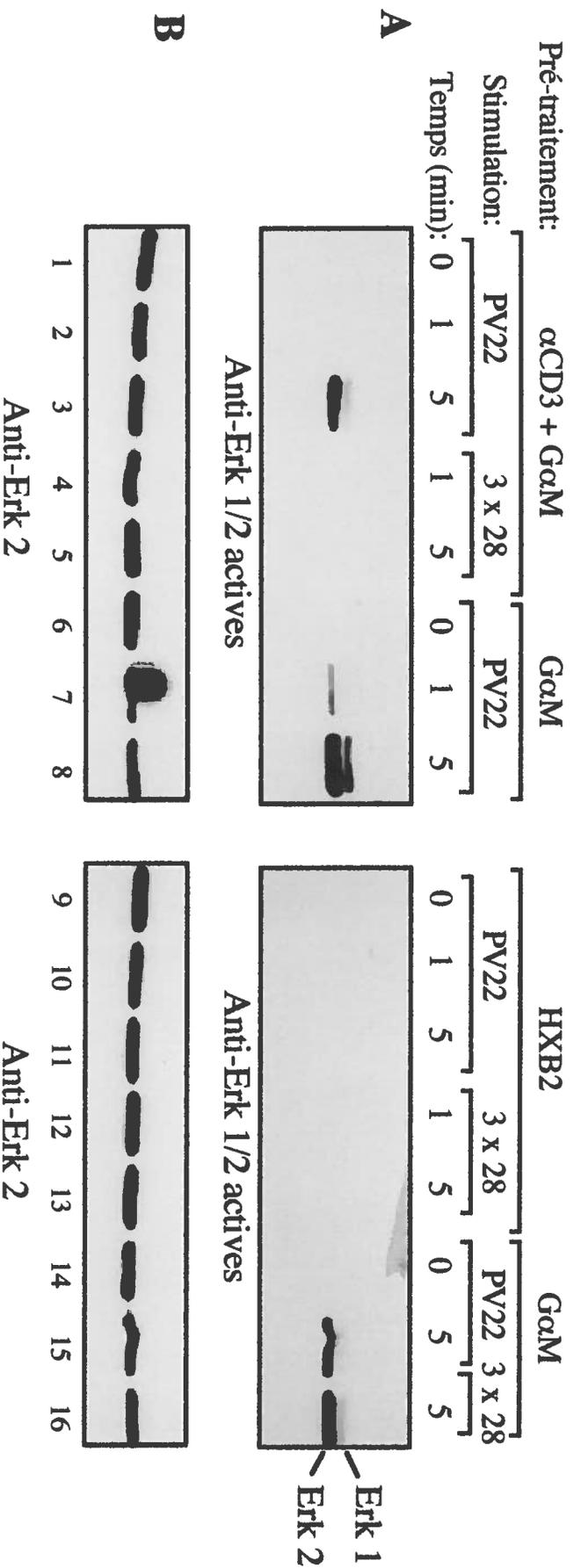
8-2 Restauration de la voie d'activation des MAP kinases Erk 1/2 dans les cellules Een217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22

La capacité du peptide agoniste PV22 à restaurer les événements de signalisation précoces du TCR dans les cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, se reflète aussi au niveau de la dernière étape de l'activation de la cascade Ras-MAP kinases Erk 1/2. Cette cascade de signalisation précède en fait l'activation du facteur de transcription cellulaire AP-1 nécessaire pour l'activation du gène de l'IL-2. Nous avons donc décidé d'examiner l'effet de la stimulation, avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28, des cellules rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 ou par l'AcM anti-CD3 en absence de co-stimulation, sur la voie d'activation des MAP kinases Erk. Ainsi, les protéines des lysats cellulaires provenant de l'expérience décrite dans la section 8-1.1 ont été analysées par Western blot en utilisant l'anticorps polyclonal anti-MAP kinases. Cet anticorps polyclonal reconnaît les MAP kinases actives, doublement phosphorylées, Erk 1 (p44) et Erk 2 (p42). Tel que prévu, l'activation des MAP kinases Erk 1/2 est très importante dans les cellules non anergiques (pré-traitées avec le GAMiG seul), après 5 min de stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28, comme le montre leurs niveaux de phosphorylation (fig. 31-A, puits 8 et 16). Par contre, les cellules rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 n'ont montré aucune activation des MAP kinases Erk 1/2, après leur stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM (fig. 31-A, puits 10 à 13). La stimulation avec les AcM des cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 n'induit aucune activation des MAP kinases Erk 1/2 (fig. 31-A, puits 4 et 5), alors que la stimulation de ces cellules anergiques avec le peptide agoniste PV22 pendant 5 minutes résulte en la restauration de l'activation des MAP kinases Erk 1/2 (fig. 31-A, puits 3). Ces variations dans l'activation des MAP kinases Erk 1/2 ne peuvent être dûes aux modulations des niveaux d'expression des MAP kinases puisque l'analyse par Western blot utilisant l'AcM anti-Erk 2 (pour évaluer le niveau

d'expression de Erk 2) montre la présence des mêmes quantités de Erk 2 dans chacun des échantillons analysés (fig. 31-B). Ces résultats montrent que le peptide agoniste PV22 permet la restauration de la voie d'activation des MAP kinases Erk 1/2, mais seulement dans les cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, ceci indique que la voie d'activation de Ras n'est pas inhibée dans ces cellules. Cependant, l'induction de ces événements tardifs de signalisation reste insuffisante pour rétablir la capacité de prolifération et l'activité cytotoxique des cellules Een217 anergiques. Ces résultats montrent aussi, et ce pour la première fois, que l'activation des MAP kinases Erk 1/2 est inhibée dans les cellules T rendues anergiques par l'APL, et ce possiblement à travers l'inhibition de la voie d'activation de Ras.

Figure 31. Niveau d'activation des MAP kinases Erk 1/2, dans les cellules Ee217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par le peptide variant HXB2, suite à la stimulation avec les AcM ou avec le peptide agoniste PV22.

Les protéines des lysats cellulaires, provenant de l'expérience décrite dans la légende de la figure 30, ont été analysées par Western blot en utilisant un anticorps polyclonal anti-MAP kinase (anti-Erk 1/2 actives), dirigé contre les MAP kinases actives doublement phosphorylées Erk 1 (p44) et Erk 2 (p42), pour vérifier leur présence (A). Les AcM (3x28) et le peptide agoniste PV22 induisent l'activation des MAP kinases Erk 1/2 dans les cellules pré-traitées avec le GAMIG seul, comme le montre leur niveau de phosphorylation (puits 15 et 16) (contrôles positifs). Le pré-traitement des cellules Ee217 avec le peptide variant HXB2 inhibe complètement l'activation des MAP kinases Erk 1/2 par les AcM ou par le peptide agoniste PV22 (puits 10 à 13). Seule la stimulation avec le peptide agoniste PV22 des cellules pré-traitées par l'AcM anti-CD3, a permis la restauration de l'activation des MAP kinases Erk 1/2 (puits 3). L'analyse par Western blot en utilisant l'AcM anti-Erk 2 a permis de s'assurer de la présence de quantités équivalente de la protéine Erk 2 dans tous les lysats cellulaires analysés (B).



8-3- Réduction du niveau d'activation de la MAP kinase JNK dans les cellules Een217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22

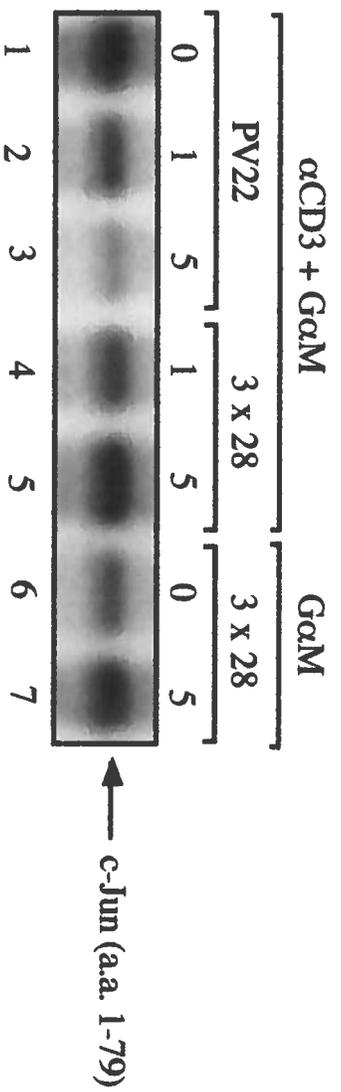
L'activation de la transcription du gène de l'IL-2 dépend de la formation du facteur de transcription cellulaire AP-1. L'activation de la MAP kinase Erk 2 participe à la formation de l'AP-1 en augmentant l'activité transcriptionnelle du gène *c-fos* à travers le facteur de transcription Elk-1 (Marais *et al.*, 1993). La formation de l'AP-1 nécessite aussi la présence de la protéine c-Jun phosphorylée par la MAP kinase JNK (Davis, 2000). En se basant sur le fait que la stimulation avec le peptide agoniste PV22 des cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 n'induit pas la sécrétion de l'IL-2, et ce malgré l'activation de la MAP kinase Erk 2, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'activité de JNK est déficiente dans ces cellules. Pour évaluer le niveau d'activité de JNK, nous nous sommes basés sur la capacité de cette kinase de se lier à la séquence amino-terminale de c-Jun et de la phosphoryler sur les deux résidus serine en positions 63 et 73 (Hibi *et al.*, 1993). Les cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ont été stimulées avec 10 μ M du peptide agoniste PV22, ou bien avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28 pendant 0, 1 et 5 min. Les lysats cellulaires ont été incubés, pendant 2 h, en présence de la protéine de fusion GST-c-Jun (acides aminés 1-79) (Jacinto *et al.*, 1998) pour précipiter la MAP kinase JNK. La réaction kinase (phosphorylation de c-Jun par JNK) a lieu pendant 30 min en présence de 10 μ Ci [32 P] γ -ATP. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose, et la présence de la protéine c-Jun phosphorylée par JNK (c-Jun-[32 P]) est révélée par autoradiographie de la membrane. Cette analyse a révélé que l'activité kinase de JNK est induite à la suite de la stimulation de cellules Een217 non anergiques (pré-traitées par le GAMiG seul) avec les AcM (fig. 32, puits 7). Cependant, la stimulation avec le peptide agoniste PV22, des cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, provoque une répression dépendante du temps dans l'activité kinase basale de JNK (fig. 32, puits 2 et 3). Cet événement ne s'est pas produit lorsque les mêmes cellules sont

stimulées avec les AcM (fig. 32, puits 4 et 5), ou bien lorsque les cellules Een217, rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2, sont stimulées avec le peptide agoniste PV22 ou bien avec les AcM. Ce résultat fournit une explication plausible quant à l'incapacité des cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 de produire l'IL-2 et de proliférer en réponse à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 même lorsque l'activation des MAP kinase Erk 1 et Erk 2 a été restaurée.

Figure 32. Niveau d'activation de la MAP kinase JNK dans les cellules Een217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3, suite à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM.

La MAP kinase JNK a été précipitée en présence de 5 µg de la protéine de fusion GST-c-Jun (a.a 1-79), à partir des lysats des cellules Een217 (12×10^6 cellules/tests) pré-traitées, pendant 48 h, avec 1 µg de GAMIg (GαM) seul ou avec 1.2 ng d'AcM anti-CD3 (αCD3) immobilisé par le GAMIg, puis maintenues au repos pendant 48 h avant d'être stimulées pendant 0, 1 et 5 min avec 10 µM du peptide agoniste PV22 (puits 1 à 3) ou avec les AcM anti-CD3 (12 ng/ml) ⊕ anti-CD28 (0.5 µg/ml) (puits 4 à 7) (3x28). Les complexes GST-c-Jun/JNK ont été incubés pendant 30 min en présence de 10 µCi [32 P] γ-ATP pour permettre la phosphorylation de c-Jun par la MAP kinase JNK. Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose, et la présence de la protéine c-Jun phosphorylée par JNK (c-Jun- 32 P) a été révélée par autoradiographie. Les AcM (3x28) ont induit l'activation de la MAP kinases JNK dans les cellules pré-traitées avec le GAMIg seul (puits 7). La stimulation avec le peptide agoniste PV22 des cellules Een217 rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 induit une répression dépendante du temps de l'activité basale de JNK (puits 2 et 3), alors que la stimulation de ces mêmes cellules avec les AcM n'a pas induit cette répression.

Pré-traitement:
Stimulation:
Temps (min):



DISCUSSION

1- Anergie via le TCR des CTL CD4⁺ par un peptide dérivé d'un variant du VIH-1

Durant l'infection au VIH-1, les CTL exercent une pression sélective significative sur la population virale et favorisent ainsi l'émergence de virus variants capables d'échapper à la réponse CTL (Koenig *et al.*, 1995; Koup, 1994b; Phillips *et al.*, 1991; Price *et al.*, 1997). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la capacité du VIH-1 à éviter la réponse CTL spécifique au virus durant la phase asymptomatique de l'infection. Ces mécanismes incluent les mutations des séquences des épitopes viraux majeurs qui se traduisent par la présentation inefficace de l'épitope par les molécules du CMH ou par la perte ou la perturbation de sa reconnaissance par le TCR des CTL spécifiques (Callahan *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1992). La perturbation de la reconnaissance des épitopes variants peut entraîner l'antagonisme où la co-présentation du peptide variant et du peptide agoniste inhibe l'activation des CTL (Bachmann *et al.*, 1998; Klenerman *et al.*, 1994; Purbhoo *et al.*, 1998; Sewell *et al.*, 1997).

Nous avons montré, lors de ce projet, la capacité du peptide variant dérivé de la souche virale HXB2 du VIH-1 à induire, *in vitro*, l'anergie des CTL CD4⁺ (clone Een217) en réponse au peptide agoniste dérivé de la souche sauvage PV22 du VIH-1. Le pré-traitement des cellules Een217 avec une concentration non mitogénique (10^{-8} M) du peptide variant HXB2 inhibe la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules T en réponse à la stimulation avec une concentration mitogénique ($\geq 10^{-8}$ M) du peptide agoniste PV22 (figures 16 et 18). Par contre, cette inhibition ne nécessite pas la co-présentation du peptide variant HXB2 et du peptide agoniste PV22 aux cellules T. Ceci suggère que l'inhibition fonctionnelle observée dans ce système cellulaire est probablement le résultat de l'anergie via le TCR, et non pas le résultat de l'antagonisme.

L'exposition des lymphocytes T à des concentrations mitogéniques d'un peptide agoniste, présenté en association avec la molécule appropriée du CMH par les cellules

présentatrices de l'antigène (APC), peut induire l'internalisation du complexe TCR/CD3. Cette internalisation a lieu suite à des interactions en série du récepteur TCR avec un petit nombre de complexes CMH/peptide, conduisant à la diminution subséquente de l'expression du TCR (Valiutti *et al.*, 1995). Un tel phénomène ne se produit pas avec les agonistes partiels ou avec les antagonistes du TCR.

Même si des concentrations élevées du peptide variant HXB2 ($\leq 10^{-7}$ M) sont capables d'induire la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules Een217 (figures 14 et 15), la stimulation des cellules Een217 avec 10^{-8} M du peptide variant HXB2 pour induire l'anergie n'entraîne pas des réductions significatives dans les niveaux d'expression du complexe TCR/CD3 ou du récepteur CD4. Les niveaux d'expression de ces antigènes de surface sont demeurés >90 % (fig. 18). Il est donc extrêmement improbable que la réduction de 95 % de la capacité de prolifération des cellules Een217 et l'inhibition totale de la fonction cytotoxique observées après le pré-traitement des cellules avec 10^{-8} M du peptide variant HXB2, soient le résultat d'une réduction dramatique des niveaux d'expression du complexe TCR/CD3 ou du récepteur CD4 à la surface des cellules, avant la stimulation avec le peptide agoniste PV22.

Le double effet, *in vitro*, du peptide variant anergique HXB2 sur les cellules CTL CD4⁺, qui consiste à l'induction de l'anergie à de faibles concentrations et à l'induction de la prolifération et de l'activité cytotoxique à de hautes concentrations, lui est en fait très unique. Reste à savoir quel en serait le résultat *in vivo*, de la stimulation des cellules Een217 avec un variant de l'épitope CTL sauvage qui émerge au cours de l'infection au VIH-1. En partant du principe selon lequel la concentration d'un tel peptide variant à la surface d'une cellule infectée augmente avec le temps, il est donc raisonnable de penser que la concentration nécessaire pour l'induction de l'anergie sera atteinte en premier. Par ailleurs, il est improbable que l'infection au VIH-1, *in vivo*, puisse générer de très hautes concentrations d'un peptide altéré à la surface des cellules infectées (Price *et al.*, 1997 ; Sewell *et al.*, 1997).

Ainsi, la présentation d'un APL agoniste partiel anergique engendré, *in vivo*, est probablement insuffisante pour l'activation de la réponse CTL anti-VIH-1, mais suffisante pour induire l'anergie.

Il a été montré, en utilisant une variété de systèmes expérimentaux, que les lymphocytes T CD4⁺ (humains ou murins) peuvent être rendues anergiques via le TCR par les épitopes variants (APL agonistes partiels) (Sloan-Lancaster *et al.*, 1993, 1994a ; Schwartz, 1996). En se basant sur ces travaux, nos résultats suggèrent que les CTL CD4⁺ spécifiques au VIH-1 peuvent être rendues anergiques via le TCR par les épitopes de virus variants. L'anergie ainsi induite explique, au moins en partie la perte de l'activité cytotoxique des CTL CD4⁺ et par conséquent l'évasion des variants du VIH-1 à la réponse cellulaire *in vivo*.

Bien que la vaste majorité des épitopes CTL VIH-1 identifiés jusqu'à présent sont restreints aux molécules du CMH classe I et suscitent des réponses cellulaires de phénotype CD8⁺ (Cleirici *et al.*, 1991 ; Shirai *et al.*, 1992 ; McMichael, 1998), l'existence des épitopes CTL anti-VIH-1 restreints aux molécules du CMH classe II qui suscitent une réponse CTL anti-VIH-1 de phénotype CD4⁺ a été clairement démontrée *in vitro* (Johnson *et al.*, 1994; Lekutis et Letvin, 1998; Siliciano *et al.*, 1988; McMichael et Phillips, 1997). Cependant, le niveau d'implication des CTL CD4⁺ dans les réponses immunes anti-virales spécifiques au VIH-1 n'est pas bien caractérisé, *in vivo*.

Curiel *et al.*, 1993, Littaua *et al.*, 1992, Hammond *et al.*, 1992, ont réussi à isoler, chez des patients infectés au VIH-1, des CTL CD4⁺ spécifiques à des épitopes localisés sur la protéine gp120 et la protéine Gag du VIH-1. Fait intéressant, la présence limitée des CTL CD4⁺, *in vivo*, chez les patients infectés par le VIH-1 contraste avec le fait que les CTL CD4⁺ peuvent être facilement isolés, *in vitro*, à partir de PBMC normaux stimulés avec la gp120 recombinante du VIH-1, ou *in vivo*, chez les individus séronégatifs immunisés avec

les vaccins recombinants dérivés de la gp160/120 (Hammond *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1994, 1992; Orentas *et al.*, 1990; Siliciano *et al.*, 1988). Les CTL CD4⁺ sont facilement isolés chez les humains et les animaux infectés avec des pathogènes tel que le virus de l'herpès humain (HSV) et bovin (BSV), et le virus de l'hépatite murine (Kurane *et al.*, 1998; Lewinsohn *et al.*, 1998; Mikloska et Cunningham, 1998; Wang et Splitter, 1998; Wijburg *et al.*, 1996; Yasukawa *et al.*, 1996). Ces données supportent l'hypothèse selon laquelle les CTL CD4⁺ sont générés suite à l'infection au VIH-1, durant les stades précoces de l'infection, mais sont les premières cellules cibles détruites par le virus.

L'induction de l'anergie des cellules Ee217 par le peptide variant HXB2 a été confirmée par les analyses biochimiques des événements précoces de transduction du signal induits par ce peptide (Bouhdoud *et al.*, 2000). En effet, la stimulation des cellules Ee217 avec le peptide variant HXB2 induit des événements intracellulaires précoces modifiés qui sont caractéristiques des APL inducteurs d'anergie, tel que la phosphorylation partielle des chaînes ζ associées au TCR (p21), et le recrutement de la PTK Zap-70 non phosphorylée et inactive au complexe TCR/CD3 (fig. 20).

En se basant sur les travaux de Kersh *et al* (1998), les chaînes ζ partiellement phosphorylées (p21) qui apparaissent en réponse à la stimulation des cellules Ee217 avec, l'APL dérivé de la souche virale HXB2, ne devraient pas contenir les motifs ITAM doublement phosphorylés. Pourtant nos travaux montrent que les chaînes ζ partiellement phosphorylées dans les cellules Ee217 traitées avec l'APL dérivé de la souche virale HXB2 sont toujours capables d'interagir avec la PTK Zap-70 (fig. 20), et avec la protéine de fusion Zap(SH2)₂-GST (fig. 21). Ceci suggère qu'au moins un des trois motifs ITAM présents dans chaque chaîne ζ du TCR est complètement phosphorylé générant ainsi un site d'attachement pour les deux domaines SH2 de la PTK Zap-70. En plus, le fait que la PTK Zap-70 associée aux chaînes ζ du TCR n'est pas phosphorylée sur ses résidus tyrosine, un événement normalement assuré par la PTK Lck, suggère que le peptide variant HXB2 est incapable

d'induire la phosphorylation précoce et l'activation de Zap-70 par Lck (Faith *et al.*, 1997). Par contre et vu que Lck est responsable de la phosphorylation des chaînes ζ du TCR et de l'activation de Zap-70 (Van Oers *et al.*, 1996), il n'est pas clair comment la phosphorylation des chaînes ζ du TCR peut avoir lieu en absence de la phosphorylation de Zap-70. Il est cependant concevable, qu'en réponse à la stimulation avec l'APL dérivé de la souche virale HXB2 (fig. 20), la PTK Zap-70 soit recrutée au complexe TCR/CD3 mais sous une forme non phosphorylée et inactive par une phosphatase des tyrosines phosphorylées. Il pourrait s'agir de la phosphatase SHP-1, capable d'inhiber l'activation des cellules T et la phosphorylation de la protéine Zap-70 (Johnson *et al.*, 1999; Plas *et al.*, 1996), ou de la phosphatase CD45, capable d'interagir avec la chaîne ζ et de déphosphoryler *in vitro* les chaînes ζ du TCR et la PTK Zap-70 (Furuzawa *et al.*, 1994; Mustelin *et al.*, 1995).

Le pré-traitement des cellules Een217 avec 100 nM du peptide variant HXB2 réduit la phosphorylation des chaînes ζ du TCR induite par le peptide agoniste PV22 (fig. 22). Cependant nous n'avons montré aucune réduction significative de l'expression du TCR/CD3 à la surface des cellules Een217 sous ces conditions (fig. 18). Ces résultats supportent donc la présence d'une inhibition, probablement par une phosphatase, des événements précoces de signalisation du TCR conduisant normalement à la phosphorylation des chaînes ζ du TCR et de la PTK Zap-70. Ainsi, dans le cas de l'infection au VIH-1, nos résultats montrent que les événements précoces de transduction du signal, qui contribuent à l'activation et la prolifération cellulaire, sont modifiés dans les CTL CD4⁺ anti-VIH-1 rendues anergiques par les peptides variants du VIH-1.

Il est bien établi que c'est le niveau de production de l'IL-2 qui contrôle l'anergie des cellules T (Madrenas *et al.*, 1996 ; Boussiotis *et al.*, 1997; Telander *et al.*, 1999). Ceci est en accord avec nos travaux de recherche qui ont clairement montré que l'addition de l'IL-2hr exogène au moment du pré-traitement avec le peptide variant anergique HXB2, ou avant la stimulation avec le peptide agoniste PV22 (fig. 23), est suffisante pour empêcher l'anergie

des cellules Ee217 induite par l'APL dérivé de la souche virale HXB2. La capacité, des cellules Ee217 rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2, à proliférer en réponse à l'IL-2 exogène est confirmée par l'induction de l'expression, par ces cellules, du récepteur CD25 de l'IL-2 (fig. 19). Ainsi, la possibilité de prévenir ou de reverser l'anergie, *in vitro*, par l'addition de l'IL-2 exogène laisse entrevoir l'espoir que l'administration de l'IL-2 aux patients infectés par le VIH-1, pourrait être efficace pour activer les CTL rendues anergiques, *in vivo*, par les variants naturels du virus. Cette approche thérapeutique, utilisant l'IL-2 exogène, dans le cas de l'infection au VIH-1, peut être intéressante et définitivement plus efficace à cause, entre autres, du rôle de l'IL-2 dans l'activation cellulaire.

L'IL-2 est utilisée dans différents essais cliniques, en combinaison avec d'autres traitements anti-viraux, pour contrecarrer la perte des cellules CD4⁺ et renforcer ainsi les différentes composantes de la réponse immunitaire dirigée contre le virus lui-même et contre les pathogènes opportunistes (Davey *et al.*, 2000 ; Blankson *et al.*, 2000). Cependant, et en dépit des bénéfices biologiques et cliniques de cette approche thérapeutique, une telle stratégie peut être compromise, voire néfaste pour les patients dans le cas où les cellules ayant intégré le génome d'autres souches du VIH-1 sont activées par l'IL-2 et se mettent à produire en plus grande concentration un virus pouvant être plus cytopathogène.

Nos résultats apportent en fait, et ce pour la première fois, la preuve de l'existence d'un variant naturel du VIH-1 capable d'induire l'anergie d'un clone de CTL CD4⁺ dirigé spécifiquement contre la souche virale PV22 du VIH-1. Cette démonstration pointe vers le fait que l'anergie des cellules T, induite par les variants naturels du VIH-1 dont l'ancêtre est la souche HXB2, représente un des mécanismes utilisés par le VIH-1 pour échapper à la réponse immune dont la réponse CTL, pour assurer sa persistance chez les individus infectés. Nos résultats devraient donc être pris en considération dans toute stratégie visant le développement et l'utilisation de vaccins anti-VIH-1. En effet, la réponse des CTL CD4⁺

spécifiques aux épitopes viraux, suscitée par vaccination utilisant comme antigène l'épitope sauvage, peut s'avérer inefficace si l'individu vacciné est infecté par une population virale contenant un ou des épitopes variants arborant les propriétés d'un agoniste partiel capables de rendre anergiques les CTL CD4⁺. Cette hypothèse est supportée entre autres par les travaux de Kent *et al.*, 1997, qui ont montré que les CTL CD4⁺ spécifiques au VIH-1, développés chez un individu alors séronégatif mais vacciné avec la protéine recombinante de l'enveloppe du VIH-1, sont antagonisés, *in vitro*, par un variant du VIH-1 ayant deux mutations dans l'épitope inducteur du clone CTL. Le variant antagoniste faisait partie en fait des premières souches infectieuses autologues isolées chez le même individu devenu alors séropositif. Ce variant antagoniste a été isolé durant le stade primaire de l'infection (Kent *et al.*, 1997).

Enfin, il serait possible de manipuler les CTL rendues anergiques par les variants du VIH-1 afin de restaurer leur capacité à répondre à la stimulation par le peptide antigénique. Cette manipulation consiste en fait à exposer les cellules T anergiques aux peptides hétéroclites, qui sont essentiellement des versions mutées du peptide antigénique natif ayant la capacité de stimuler les cellules T de façon plus efficace que le peptide natif lui-même. En effet, il a été reporté récemment que le traitement des cellules T murines en tolérance *in vivo*, un phénomène impliquant l'induction de l'anergie des cellules T, avec des peptides hétéroclites permet la réversion de l'anergie de ces cellules *in vitro* (Zugel *et al.*, 1998). Ces données suggèrent que l'anergie des cellules T n'est pas irréversible et que la super-induction du TCR exprimé par les clones anergiques, avec les peptides hétéroclites, peut restaurer les réponses de ces cellules à l'antigène spécifique. Ainsi, il serait important de vérifier la possibilité de réverser l'anergie des CTL-anti-VIH-1, *in vitro*, à l'aide de peptides hétéroclites, dans l'espoir de les utiliser dans des stratégies vaccinales thérapeutiques visant à renforcer le système immunitaire des individus infectés. Une telle stratégie de vaccins thérapeutiques nécessite le recensement et la caractérisation des souches virales infectantes

chez les patients à traiter. De plus, il serait aussi capital de caractériser les mécanismes d'anergie des CTL CD8⁺ par les variants du VIH-1 sachant que les réponses CTL anti-VIH-1 sont principalement de phénotype CD8⁺.

2- Mécanismes moléculaires responsables de l'anergie des cellules T

Il a été démontré, en utilisant différents systèmes expérimentaux, que la stimulation du TCR en absence de la co-stimulation du récepteur CD28 par son ligand conduit à l'anergie des lymphocytes T (Shwartz, 1996). Les lymphocytes T anergiques ne répondent plus par prolifération ou par activation fonctionnelle suite à la stimulation avec l'antigène spécifique, et ce même si le signal co-stimulateur est fourni. Ce modèle d'anergie par absence de co-stimulation a été démontré, à l'origine, par stimulation des cellules CD4⁺ de clones humains TH1 avec les peptides antigéniques présentés par les APC fixées chimiquement (Jenkins et Schwartz, 1987), ou bien avec l'AcM anti-CD3 immobilisé (Jenkins *et al.*, 1990 ; Quill et Schwartz, 1987 ; Mueller *et al.*, 1989). Comme nous l'avons montré dans le cas de l'infection au VIH-1 lors de la première partie de ce projet (Bouhdoud *et al.*, 2000), l'anergie des cellules T peut aussi être induite via le TCR par les APL agonistes partiels, et ce même en présence du signal co-stimulateur dérivé du CD28 (Sloan-Lancaster *et al.*, 1993).

Les événements intracellulaires responsables de l'anergie des cellules T, dans ces deux modèles, ont été étudiés intensivement *in vitro*. La stimulation des lymphocytes T CD4⁺ humains ou murins avec les APL agonistes partiels engendre des événements de signalisation modifiés caractérisés par la non-activation de la PTK Lck. Ceci entraîne la phosphorylation déficiente des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 et par conséquent le recrutement de la PTK Zap-70 non phosphorylée et inactive au complexe TCR/CD3 (Sloan-Lancaster *et al.*, 1994; Madrenas *et al.*, 1995; Migita *et al.*, 1995; Faith *et al.*, 1997 ; LaFace *et al.*, 1997; Couture *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1998; Bouhdoud *et al.*, 2000). De plus, dans les cellules T rendues anergiques par absence de co-stimulation, la protéine Ras et les MAP

kinases Erk 1/2 et JNK sont inhibées (Fields *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1996), résultant ainsi dans la non activation du facteur de transcription cellulaire AP-1 essentiel pour l'activation du gène codant pour l'IL-2. Par contre et malgré ces intenses investigations, il n'existe toujours pas de modèle unifiant l'ensemble des événements de signalisation responsables de l'anergie. Ceci est dû, entre autres, à la complexité des événements de signalisation induits et à l'utilisation de plusieurs différents systèmes expérimentaux. Il s'agit généralement des cellules T humaines versus les cellules T murines, les cellules TH1 versus les cellules TH2, les cellules T CD4⁺ versus les cellules T CD8⁺. En plus il n'existe aucune étude comparative des différents modèles d'anergie des cellules T utilisant la même lignée cellulaire pour caractériser les mécanismes moléculaires responsables de l'anergie des cellules T.

Dans la deuxième partie de notre projet de recherche, nous nous sommes intéressés à étudier, dans un même système cellulaire humain (CTL CD4⁺ [Een217] spécifiques à la gp120 de la souche PV22 du VIH-1), deux modèles d'anergie des cellules T, induits par absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3, ou par l'APL agoniste partiel en présence de la co-stimulation. Ceci nous a permis en fait de comparer systématiquement, les activités fonctionnelles ainsi que les événements de transduction du signal du TCR induits dans les cellules Een217, rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 ou par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 du VIH-1, suite à la stimulation mitogénique avec le peptide agoniste dérivé de la souche PV22 du VIH-1 ou avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28.

Le pré-traitement des cellules TH1 de souris avec l'AcM anti-CD3 seul est une méthode qui mime l'occupation du TCR en absence de co-stimulation et induit en conséquence l'inhibition de la prolifération de ces cellules en réponse à leur antigène spécifique (Jenkins *et al.*, 1990). En se basant sur le même principe, nous avons montré que le pré-traitement des cellules Een217 avec l'AcM anti-CD3 seul (1.2 ng) inhibe la prolifération des cellules non seulement à la stimulation avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-

CD28, mais aussi à la stimulation avec le peptide agoniste PV22 (figures 24-B et 25-A). En plus, l'induction de l'activité cytotoxique des cellules T Een217 rendues anergiques par absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3, en réponse au peptide agoniste PV22, est aussi inhibée (fig. 26). Ce résultat montre la perte *in vitro* de l'activité cytotoxique de CTL CD4⁺ spécifiques au VIH-1 rendues anergiques par absence de co-stimulation. Ainsi, nos résultats suggèrent l'induction de l'anergie des CTL CD4⁺ anti-VIH-1, par absence de co-stimulation, comme mécanisme possible permettant au virus d'échapper, *in vivo*, à la réponse CTL et ce dans le cas où l'infection virale affecte la fonction de co-stimulation des cellules présentatrices d'antigène (APC). Cette hypothèse est supportée en partie par les travaux de Ho *et al.*, 1986; Macatonia *et al.*, 1989, Schuitemaker *et al.*, 1992, qui ont montré que les APC, tel que les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, peuvent être infectées par le VIH-1, et que leur infection affecte leur fonction dans la génération du signal co-stimulateur en interférant avec l'expression des molécules accessoires tel que les molécules B7. Par ailleurs, Petit *et al.*, 1988; Ennen *et al.*, 1990, ont montré une diminution de la fonction cellulaire accessoire des monocytes/macrophages humains, *in vitro*, après leur infection par le VIH-1. L'anergie induite par absence de co-stimulation peut entraîner non seulement la perte de la fonction cytotoxique des CTL CD4⁺ anti-VIH-1, mais aussi la perte de la fonction des cellules T CD4⁺ auxiliaires qui sont importantes pour les réponses immunologiques anti-virales, favorisant ainsi la persistance du virus chez les individus infectés. Toutefois, l'induction de l'anergie des CTL CD4⁺/CD8⁺ anti-VIH-1 par absence de co-stimulation, n'est toujours pas bien caractérisée dans le cas de l'infection au VIH-1.

La comparaison des activités fonctionnelles des cellules Een217 rendues anergiques par absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3, ou par l'APL dérivé de la souche virale HXB2, en présence de la co-stimulation, n'a montré aucune différence entre les deux modèles d'anergie. D'une part, la capacité de prolifération et l'activité cytotoxique des cellules Een217, pré-traitées avec l'APL ou avec l'AcM anti-CD3, en réponse à la

stimulation avec le peptide agoniste sont inhibées, et ce au même degré (figures 25 et 26). D'autre part, l'addition de l'IL-2hr exogène aux cellules Ee217 rendues anergiques dans les deux modèles d'anergie, a permis aux cellules de récupérer leur capacité de prolifération en réponse à la stimulation mitogénique avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28 (fig. 27). Ce résultat nous a permis de valider à nouveau le concept selon lequel l'incapacité des cellules T anergiques à proliférer en réponse à la stimulation du TCR, est dû à l'inhibition de l'expression du gène codant pour l'IL-2, et que l'anergie peut être reversé par la signalisation à travers la chaîne γ du récepteur de l'IL-2 (Boussiotis *et al.*, 1994 ; Madrenas *et al.*, 1996). En conclusion, au niveau fonctionnel, les CTL Ee217 rendues anergiques, par absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3 ou par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 en présence de la co-stimulation, sont phénotypiquement identiques.

Le résultat de la stimulation du TCR dépend de la capacité du ligand du TCR à induire l'activation de la PTK Lck pour catalyser la phosphorylation complète des motifs ITAM des chaînes ϵ , γ , δ du CD3 et des chaînes ζ associées au TCR. Ces événements de phosphorylation favorisent le recrutement et l'activation de la PTK Zap-70 (Hemmer *et al.*, 1998), ce qui conduit à l'activation de la protéine Ras et par conséquent à l'activation des cascades des MAP kinases Erk 1/2 et JNK. Ces événements ne sont pas détectés dans les cellules exposées aux ligands faibles tels que les APL agonistes partiels inducteurs d'anergie (Sloan-Lancaster *et al.*, 1994 ; Madrenas *et al.*, 1995 ; Bouhdoud *et al.*, 2000), et les APL antagonistes (Laface *et al.*, 1997), ou à la suite de la stimulation optimale des cellules T rendues anergiques par absence de co-stimulation (Boussiotis *et al.*, 1997 ; 2000).

La caractérisation et la comparaison des événements de transduction du signal du TCR engendrés suite à la stimulation des cellules Ee217, rendues anergiques par l'APL HXB2 ou par l'AcM anti-CD3, avec le peptide agoniste PV22 ou avec les AcM anti-CD3 \oplus anti-CD28, nous a permis de mettre en évidence des différences importantes dans les phénotypes

de signalisation induits dans ces deux types d'anergie des cellules T. Cette analyse comparative nous a permis de décrire un état dans lequel certains événements de transduction du signal du TCR sont induits et où la capacité de prolifération et la fonction cytotoxique des cellules sont inhibées. En effet, la stimulation des cellules rendues anergiques par l'AcM anti-CD3 en absence de co-stimulation, avec le peptide agoniste PV22, engendre un signal qui restaure la phosphorylation complète des chaînes ζ du TCR et ϵ du CD3 (fig. 30), la phosphorylation optimale de Zap-70 (fig. 29), ainsi que l'activation des MAP kinases Erk 1/2 (fig. 31). Ceci suggère que la répression de la protéine Ras, normalement observée dans les cellules T humaines rendues anergiques par absence de co-stimulation (Fields *et al.*, 1996), est levée dans les cellules Een217 rendues anergiques par absence de co-stimulation. Par contre, l'inhibition de la sécrétion de l'IL-2 est maintenue dans les cellules Een217 rendues anergiques par absence de co-stimulation (fig. 28). Ce résultat suggère que certaines cascades de signalisation, essentielles pour l'activation du promoteur de l'IL-2, sont encore réprimées malgré la restauration des événements précoces de la signalisation du TCR. L'inhibition de la sécrétion de l'IL-2 peut également être expliquée par la présence d'inhibiteurs de la transcription du promoteur de l'IL-2, tel que la protéine répressive NIL-2-a qui se fixe à un élément de régulation négative (NRE-A) localisé à la position -105 du promoteur de l'IL-2 (Becker *et al.*, 1995), qui sont restés actifs dans ces cellules anergiques.

Les travaux de Boussiotis *et al.*, 1997, ont montré que la protéine Rap-1, une petite GTPase, peut antagoniser l'activation de Ras à la suite de la stimulation mitogénique des lymphocytes T rendues anergiques par absence de co-stimulation, possiblement à travers la compétition avec une molécule activatrice de Ras. En fait, l'activation de Ras dépend de la phosphorylation de la protéine membranaire Lat par la PTK Zap-70 (Isakov, 1993). La protéine Lat est responsable du recrutement du complexe protéique Grb-2/Sos à la membrane cellulaire pour activer Ras par échange GDP/GTP catalysé par le facteur

d'échange de guanine Sos (Izquierdo, 1995). Puisque nous avons montré que l'activation des MAP kinase Erk 1/2 est restaurée à un niveau normal à la suite de la stimulation des cellules Een217 rendues anergiques par absence de co-stimulation, avec le peptide agoniste PV22, alors la voie d'activation de Ras est totalement restaurée et ne serait donc pas antagonisée dans ce modèle d'anergie.

Fait intéressant, nous avons détecté une répression de l'activité basale de la MAP kinase JNK après une minute de stimulation des cellules Een217 rendues anergiques par absence de co-stimulation, avec le peptide agoniste PV22 (fig. 32). Cette répression ne se produit pas suite à la stimulation des mêmes cellules anergiques avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28 et où l'activation des MAP kinases Erk 1/2 n'est pas restaurée. Il est donc possible que, dans notre système expérimental, le produit de la stimulation du TCR des cellules normales et anergiques, dépend en fait de la capacité de la stimulation à activer ou non les deux MAP kinases Erk (1/2) et JNK. Ainsi, nos résultats suggèrent l'inhibition de l'activation de la MAP kinase JNK comme le mécanisme qui explique l'incapacité des cellules T rendues anergiques par absence de co-stimulation, de sécréter l'IL-2 et de proliférer en réponse à des stimulations capables de restaurer les événements précoces de la signalisation du TCR.

Aucune restauration des événements de signalisation du TCR n'a été observée après la stimulation des cellules Een217 rendues anergiques par l'APL dérivé de la souche virale HXB2, avec les AcM anti-CD3 ⊕ anti-CD28 ou avec le peptide agoniste PV22. En effet, la stimulation du TCR des CTL Een217 rendues anergiques par l'APL HXB2, avec le ligand agoniste PV22 n'induit pas la phosphorylation des chaînes ϵ du CD3, mais induit la phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR qui restent associées avec la PTK Zap-70 non phosphorylée et inactive (figures 29 et 30). De plus, aucune activation des MAP kinases Erk 1/2 n'a été restaurée (fig. 30). Ceci est probablement dû à l'inhibition de la voie d'activation de la protéine Ras à cause de la non activation de la PTK Zap-70. Ces données

confirment que l'inhibition de l'activation et de la prolifération des CTL Een217 rendues anergiques par l'APL HXB2, en réponse à la stimulation mitogénique, est dû à l'inhibition de l'activation de la PTK Zap-70. La PTK Lck est responsable de la phosphorylation des chaînes ζ du TCR et de l'activation de la PTK Zap-70 (Van Oers *et al.*, 1996). Pourtant, dans les cellules Een217 rendues anergiques par l'APL HXB2, la phosphorylation partielle des chaînes ζ du TCR a lieu en absence de la phosphorylation de Zap-70 (figures 29 et 30). Il est donc concevable, qu'en réponse à la stimulation avec l'APL HXB2, la PTK Zap-70 soit recrutée au complexe TCR/CD3 mais sous une forme non phosphorylée et inactive par une phosphatase des tyrosines phosphorylées. Ainsi, l'induction de l'anergie des CTL CD4⁺ spécifiques au VIH-1 via le TCR, par les peptides de variants du VIH-1, serait dûe à l'inhibition de l'activation de la PTK Zap-70 indispensable pour le déclenchement des cascades de signalisation tardives responsables de l'activation des facteurs de transcription du gène de l'IL-2 et de la prolifération cellulaire.

L'ensemble des résultats obtenus avec notre système cellulaire nous a permis de mettre en évidence l'existence de deux mécanismes moléculaires distincts responsables de l'anergie des cellules T. Ces mécanismes opèrent à différents niveaux dans les cascades de signalisation du TCR pour bloquer la prolifération des cellules anergiques au moment de leur réactivation suggérant ainsi l'existence de plusieurs niveaux d'anergie clonale.

Nous avons ainsi établi un modèle qui fait intervenir différents mécanismes moléculaires responsables de l'anergie des cellules T, au niveau des événements de signalisation du TCR, après stimulation des cellules anergiques avec le peptide agoniste (fig. 33). Selon notre modèle, dans le cas des cellules rendues anergiques par absence de co-stimulation, la cascade d'activation de la MAP kinase JNK est inhibée. Cette inhibition se traduit par le blocage de la production de l'IL-2 et par conséquent par la perte de la capacité de prolifération des cellules en réponse à la stimulation avec le peptide agoniste (fig. 33). L'activité de JNK serait réprimée par une phosphatase, tel que VHR, qui est capable

d'inhiber l'activation des MAP kinases JNK et Erk suite à la stimulation mitogénique des lymphocytes T (Alonso et al., 2001), ou par l'inhibition d'une MAP kinase kinase tel que MKK4 ou MKK7 connues pour leurs capacité de phosphoryler et d'activer JNK (Minden *et al.*, 1994a ; Sanchez *et al.*, 1994 ; Karin, 1995 ; Tournier *et al.*, 1997). Dans le cas des cellules T rendues anergiques avec l'APL, l'inhibition se produit au niveau des événements de signalisation responsables de la phosphorylation complète des chaînes ζ du TCR et de la phosphorylation et de l'activation de la PTK Zap-70 (fig. 33). L'inhibition de l'activation de Zap-70 conduit à l'inhibition de l'activation de Ras, qui est essentielle pour l'activation des MAP kinases Erk 1/2 et JNK impliquées entre autres dans l'activation du facteur de transcription cellulaire AP-1, activateur du gène de l'IL-2. L'inhibition de l'activation de Zap-70 peut entraîner également l'inhibition de l'activation de la PLC γ 1, très importante pour l'activation des facteurs de transcription cellulaire NF-AT et NF- κ B qui sont essentiels pour l'activation de la transcription du gène de l'IL-2. L'activation de Zap-70 serait quant à elle inhibée par une phosphatase, tel que SHP-1, connue pour sa capacité d'inhiber la phosphorylation de la protéine Zap-70 (Johnson *et al.*, 1999; Plas *et al.*, 1996), ou la phosphatase CD45, capable de déphosphoryler, *in vitro*, les chaînes ζ du TCR et Zap-70 (Furuzawa *et al.*, 1994; Mustelin *et al.*, 1995).

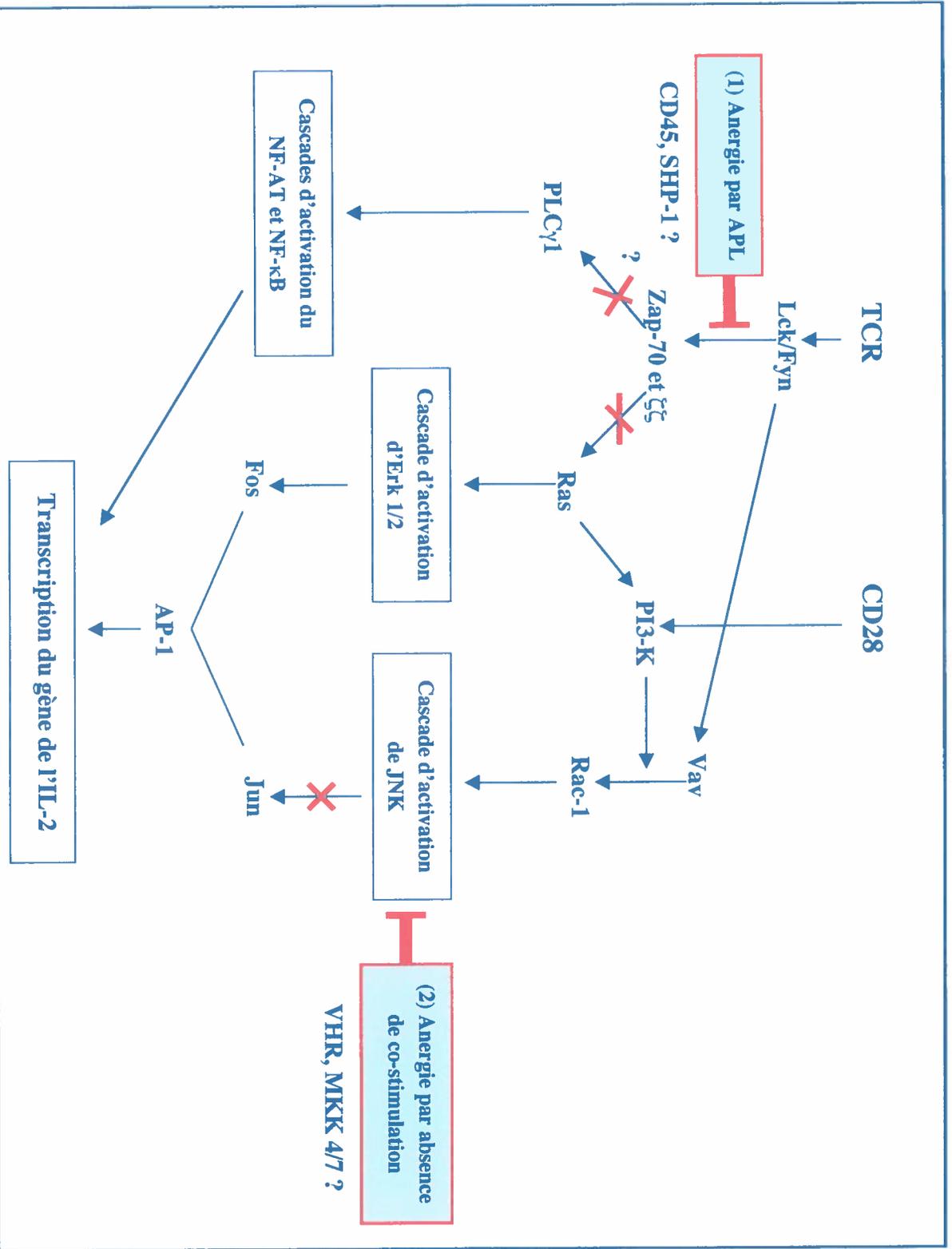
Finalement, des recherches plus poussées devraient être entreprises pour identifier et caractériser le rôle des enzymes responsables de l'inhibition de l'activation de JNK et de Zap-70 dans les CTL CD4⁺ anti-VIH-1 anergiques, après stimulation avec le peptide antigénique. Réussir à élucider les événements responsables du maintien de l'état d'anergie pourrait être très utile pour le développement de stratégies thérapeutiques visant à reverser l'anergie des cellules T et rétablir leurs activités fonctionnelles pour lutter efficacement contre l'infection au VIH-1. Des thérapies désignées à normaliser les cascades défectueuses de transduction du signal peuvent s'avérer efficaces pour rétablir les activités fonctionnelles des cellules CD4⁺ anergiques dans l'infection au VIH-1.

Figure 33. Modèle pour expliquer les mécanismes moléculaires, au niveau des événements de transduction du signal du TCR, responsables de l'anergie des cellules T.

La stimulation du TCR par l'antigène spécifique induit des événements de signalisation précoces qui conduisent à l'activation de la PTK Zap-70. Zap-70 phosphoryle et active d'autres substrats cellulaires tel que Lat et SLP-76, ce qui résulte en l'activation des cascades de signalisation tardives. La co-stimulation du CD28 complète les signaux dérivés du TCR en augmentant l'activation du promoteur de l'IL-2.

(1) Dans le cas d'anergie des cellules T par l'APL, l'inhibition se produit au niveau des événements précoces de signalisation responsables de l'activation de Zap-70. Ceci se traduit par l'inhibition de la cascade d'activation de Ras et de la PLC γ 1 qui sont importantes pour l'activation du promoteur du gène de l'IL-2. L'activation de Zap-70 serait inhibée par une phosphatase telle que SHP-1 ou CD45.

(2) Dans le cas d'anergie des cellules T par absence de co-stimulation, l'inhibition se produit au niveau de la cascade d'activation de la MAP kinase JNK, conduisant ainsi à l'inhibition de la transcription du gène de l'IL-2. JNK serait réprimée soit par une phosphatase, telle que VHR, soit à travers l'inhibition d'une MAP kinase kinase telle que MKK4/7.



CONCLUSIONS

Nous avons montré au cours de ce travail qu'un peptide variant dérivé de la souche virale HXB2 du VIH-1 est capable d'induire l'anergie des CTL CD4⁺ spécifiques à la gp120 de la souche sauvage PV22. Le peptide variant anergique dérivé du virus HXB2 du VIH-1 inhibe l'activité cytotoxique des CTL CD4⁺ dirigée normalement contre le peptide agoniste dérivé du PV22. Ces données suggèrent que durant la progression de l'infection au VIH-1 *in vivo*, les variants nouvellement générés affaiblissent la réponse CTL anti-VIH-1, effectrice au début de l'infection contre les souches infectantes d'origine, en induisant l'anergie des CTL. Il est plausible de penser que ceci permet au VIH-1 d'échapper à la réponse cellulaire responsable du maintien de l'état asymptomatique de l'infection chez l'hôte et par conséquent participer à la progression de l'infection vers le stade SIDA.

L'anergie des CTL anti-VIH-1 par les variants naturels constitue donc une des stratégies du virus lui permettant d'échapper à l'activité CTL et persister ainsi chez les patients infectés. Cependant, et même si l'anergie *in vivo* des CTL par les variants naturels du VIH-1 n'est pas caractérisée, le fait que la plupart des vaccins anti-VIH-1 en développement ou en essais cliniques contiennent les sous-unités de l'enveloppe signifie que l'induction de l'anergie par certains épitopes de l'enveloppe est une possibilité. Ainsi, les stratégies visant à développer un vaccin anti-VIH-1 capable de susciter une réponse CTL, doivent prendre en considération l'existence de variants inducteurs d'anergie.

Nos travaux de recherche ont montré que l'état d'anergie induite par le variant HXB2 du VIH-1 est réversible par l'IL-2hr exogène, suggérant ainsi que l'inhibition de la sécrétion de l'IL-2 est à la base de l'état d'anergie des CTL CD4⁺. L'analyse des événements précoces de transduction du signal du TCR a montré que le peptide variant HXB2 induit des événements de signalisations modifiés caractéristiques des APL inducteurs d'anergie. L'APL dérivé de la souche virale HXB2 n'est pas capable d'induire la phosphorylation et

l'activation de la PTK Zap-70 importante pour le déclenchement des cascades de signalisations tardives essentielles pour l'activation du promoteur de l'IL-2.

La comparaison dans le même système cellulaire, Ee217, de deux modèles d'anergie des cellules T, par absence de co-stimulation à l'aide de l'AcM anti-CD3, ou par l'APL dérivé de la souche virale HXB2 en présence de la co-stimulation, nous a permis de montrer qu'au niveau fonctionnel, les cellules anergiques sont phénotypiquement identiques. Dans les deux modèles, les cellules anergiques ne secrètent pas l'IL-2 en réponse aux stimulations mitogéniques et ne présentent aucune activité cytotoxique dirigée contre le peptide agoniste PV22. Ces résultats montrent que les CTL CD4⁺ rendues anergiques par absence de co-stimulation perdent leur activité cytotoxique. Ceci suggère l'anergie des CTL CD4⁺ anti-VIH-1, par absence de co-stimulation, comme un événement qui pourrait avoir lieu dans le cas où l'infection au VIH-1 affecterait la fonction de co-stimulation des APC.

La caractérisation et la comparaison des événements de signalisation dans les deux modèles d'anergie induits dans un même système cellulaire nous a permis de montrer l'existence de mécanismes moléculaires distincts responsables du maintien de l'anergie des cellules T et donc la présence de plusieurs niveaux d'anergie clonale des cellules T. Ainsi, en se basant sur les résultats obtenus avec notre système cellulaire, nous avons établi un modèle qui fait intervenir les différents mécanismes moléculaires, au niveau des événements de transduction du signal du TCR, dans les cellules T anergiques après stimulation avec le peptide agoniste. Selon le modèle décrit à la figure 33, l'anergie des cellules T par absence de co-stimulation se produit après un blocage au niveau de la cascade d'activation de la MAP kinase JNK, importante pour l'activation du promoteur de l'IL-2. L'activation de JNK serait bloquée par une phosphatase telle que VHR ou par l'inhibition d'une MAP kinase telle que MKK4 ou MKK7, et non pas suite à l'inhibition de la protéine Ras telle que démontré dans d'autres modèles cellulaires. L'anergie des cellules T par les APL se produit quant-à-elle par un blocage au niveau des événements précoces de signalisation responsables

de l'activation de la PTK Zap-70, ce qui entraîne l'inhibition de l'activation de Ras et de la PLC γ 1 essentielles pour l'activation des facteurs de transcription cellulaires qui activent le promoteur du gène de l'IL-2.

Dans la poursuite logique de nos travaux, il serait important de déterminer et de caractériser les facteurs responsables de l'inhibition de la transcription du gène de l'IL-2 dans les CTL CD4⁺ anti-VIH-1 anergiques. Le développement de stratégies thérapeutiques visant à reverser l'état d'anergie des cellules T et à restaurer leurs activités fonctionnelles anti-VIH-1 est d'une importance primordiale dans ce champ d'étude.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements à mes directeurs de thèse, le Dr. Clément Couture, le Dr. Max Arella et le Dr. Abderrazzak Merzouki pour avoir accepté de diriger ce travail, pour leur encadrement et pour les moments qu'ils ont consacré à la réalisation de ce travail.

Je désire exprimer ma reconnaissance au Dr. C. Couture et au Dr. A. Merzouki pour leur compétence, leur encadrement et le support technique de leurs laboratoires.

Je remercie vivement mon mari pour son implication directe dans mon projet de doctorat. Je le remercie pour sa disponibilité constante, pour sa confiance et pour la patience extraordinaire dont il a fait preuve tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent au Dr. Patricia Villain pour son amitié et ses encouragements, et pour les discussions scientifiques fructueuses. Je remercie tous les membres du laboratoire du Dr. C. Couture à l'Institut Lady Davis et du laboratoire du Dr. A. Merzouki à l'INRS-Institut Armand-Frappier, en particulier Mme. Nathalie Gauthier et Mr. Marc Henrichon pour leur support technique.

Je désire exprimer toute ma gratitude à mon très cher père et ma très chère mère pour leur grande confiance en moi et leur grand amour. Je voudrais également remercier mes très chers frères et sœurs, en particulier ma petite sœur Nadia, ainsi que ma nièce Asmae et tous mes neveux pour leurs encouragements et leur amour.

Mes remerciements s'adressent à tous mes camarades et collègues de travail à l'Institut Lady Davis et à l'INRS-Institut Armand-Frappier.

RÉFÉRENCES

Ahmad A., Morisset R., Thomas R., Menezes J. 1994. Evidence of a defect of ADCC effector function and anti-HIV gp120/41 specific ADCC-mediating antibody titres in HIV-infected individuals. *J. AIDS* 7 : 428-437.

Ahmed R. and Gray, D. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272: 54-60.

Ahn N.G., Seger R., and Krebs E.G. 1992. The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 992-999.

Aldovini A., Young R.A. 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* 64:1920-1926.

Alexander J., Snoke K., Ruppert J., Sidney J., Wall M., Southwood S., Oseroff C., Arrhenius T., Gaeta F.C.A., Colon S.M., Grey H.M., and Sette A. 1993. Functional consequences of engagement of the T cell receptor by low affinity ligands. *J. Immunol.* 150 : 1-7.

Allan J.S., Coligan J.E., Barin F., McLane M.F., Sodroski J.G., Rosen C.A., Haseltine W.A., Lee T.H., Essex M. 1985. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* 228 : 1091-1093.

Alonso A, Saxena M, Williams S, Mustelin T. 2001. Inhibitory role for dual specificity phosphatase VHR in T cell antigen receptor and CD28-induced Erk and Jnk activation. *J Biol Chem* 276:4766-4771.

Arendrup M., Nielsen J.-E., Hansen S., Pedersen C., Mathiesen L., Nielsen J.O. 1992. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 5:303-307.

Arpaia E., Shahar M., Dadi H., Cohen a., and Roifman C.M. 1994. Defective T cell receptor signaling and CD8⁺ thymic selection in humans lacking the Zap-70 kinase. *Cell* 76: 947-958.

Arya S.K., Gallo R.C. 1988. Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: Immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2209-2213.

Ashwell J.D., and Klausner R.D. 1990. Genetic and mutational analysis of the T cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 139-168.

Autran B, Mayaud CM, Raphael M, Plata F, Denis M, Bourguin A, Guillon JM, Debre P, Akoun G. 1988. Evidence for a cytotoxic T-lymphocyte alveolitis in human immunodeficiency virus-infected patients. *AIDS* 2:179-183.

- Bachmann, M. F., D. E. Speiser, A. Zakarian, and P. S. Ohashi. 1998. Inhibition of TCR triggering by a spectrum of altered peptide ligands suggests the mechanism for TCR antagonism. *Eur. J. Immunol.* **28**:3110-3119.
- Bagasra O., Hauptman S.P., Lischner H.W., Sachs M., Pomerantz R.J. 1992. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction. *N. Engl. J. Med.* **326**: 1385-1391.
- Baldari C.T., Macchia G., and Telford J.L. 1992. Interleukin-2 promoter activation in T-cells expressing activated Ha-ras. *J. Biol. Chem.* **267**: 4289-4291.
- Baniyash M., Garcia-Morales P., Bonifacino J.S., Samelson L.E., and Klausner R.D. 1988. Disulfide linkage of the ζ and η chains of the T cell receptor. *J. Biol. Chem.* **263**: 9874-9878.
- Baniyash M., Hsu V.W., Seldin M.F., and Klausner R.D. 1989. The isolation and characterization of the murine T cell antigen receptor ζ chain gene. *J. Biol. Chem.* **264**: 13252-13257.
- Barre-Sinoussi F., Cherman J.C., Rey R., Nugerye M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauget C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rosenbaum W., and Montagnier L. 1983. Isolation of a lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *Science* **220** : 868-871.
- Becker, J.C., T. Brabletz., C.T.Conrad., E-B. Bröcker., and R.A. Reisfeld. 1995. Negative transcriptional regulation in anergic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 2375-2378.
- Bentin J., Tsoukas C., McCutchan J.A., *et al.* 1989. Impairment in T-lymphocyte responses during early infection with human immunodeficiency virus. *J. Clin. Immunol.* **9**: 159-168
- Bergman M., Mustelin T., Oetken C., Partanen J., Flint N.A., Amrein K.E., Autero M., Burn P., and Alitalo K. 1992. The human p50^{csk} tyrosine kinase phosphorylates p56^{lck} at Y505 and down regulates its catalytic activity. *EMBO J.* **11**: 2919-2924.
- Berkhout B., and Jeang K.T. 1992. Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* **66**: 139-149.
- Berman P.W., Gregory T.J., Riddle L., Nakamura G.R., Champe M.A., Porter J.P., Wurm F.M., Hershberg R.D., Cobb E.K., Eichberg J.W. 1990. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature* **345**:622-625.
- Berman P.W., Nunes W., Haffar O.K. 1988. Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro* and in continuous cell lines. *J. Virol.* **62**:3135-3142.

Bertoletti, A., Sette, A., Chisari, F.V., Penna, A., Levrero, M., De Carli, M., Flaccadori, F. and Ferrari, C. 1994. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* **369**: 407-410.

Berzofsky J.A., Cease K.B., Cornette J.L., Spouge J.L., Margalit H., Berkower I.J., Good M.F., Miller L.H., and DeLisi C. 1987. Protein antigenic structures recognized by T cells: potential application to vaccine design. *Immunol. Rev.* **98**: 9-52.

Beverly, B., L. Chiodetti., K. Brorson, R.H.Schwartz., and D.L. Mueller. 1993. T cell anergy. *In molecular mechanisms of immunological self-recognition*. Edited by Alt, F.W., Vogel, H.J. New York: academic press, inc; 1993:39-53.

Beverly, B., S. M. Kang, M. J. Lenardo, and R. H. schwartz. 1992. Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation. *Int. Immunol.* **4**: 661-671.

Bhandoola, A., Cho, E.A., Yui, K., Saragovi, H.U., Greene, M.I. and Quill, H. 1993. Reduced CD3-mediated protein tyrosine phosphorylation in anergic CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* **151**: 2355-2367.

Biddison W.E., Rao P.E., talle M.A., Goldstein G., and Shaw S. 1984. Possible involvement of the T4 molecules in T cell recognition of class II HLA antigens: evidence from studies of CTL-target cell binding. *J. Exp. Med.* **159**: 783-797.

Bierer B.E., Hollander G., Fruman D., and Burakoff S.J. 1993. Cyclosporin A and FK506: Molecular mechanism of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr. Opin. immunol.* **5**: 763-773.

Blankson J., and Siliciano RF. 2000. Interleukin 2 treatment for HIV infection. *JAMA* **284** : 236-238.

Blumberg R.S., Paradis T., Hartshorn K.L., Vogt M., Ho D.D., Hirsch M.S., Leban J., Sato V.L., Schooley R.T. 1987. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against cells infected with the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* **156**:878-884.

Boise L.H., Minn A.J., Noel P.J., June C.H., Accavitti M.A., Lindsten T and Thompson C.B. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-X_L. *Immunity* **3**: 87-98.

Boise L.H., Petryniak B., Mao X., June C.H., Wang C.Y., Lindsten T., Bravo R., Kovary K., Leiden J.M., and Thompson C.B. 1993. The NFAT-1 DNA binding complex in activated T cells contains Fra-1 and JunB. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1911-1919.

Bolen J.B., Rowley R.B., Spana C., and Tsygankov A.Y. 1992. The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *FASEB J.* **6**: 3403-3409.

Bolognesi D.P. 1988. Natural immunity to HIV and its possible relationship to vaccine strategies. *Microbiol. Sci.* **8** : 236-241.

- Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. A. Oldstone. 1994. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **68**:6103-6110.
- Borrow, P., Lewicki, H., Wei, X., Horwitz, M.S., Peffer, N., Meyers, H., Nelson, J.A., Gairin, J.E., Hahn, B.H., Oldstone, M.B. and Shaw, G.M. 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* **3**: 205-211.
- Bouhdoud, L., Villain, P., Merzouki, A., Arella, M. and Couture, C. 2000. T-cell receptor-mediated anergy of a human immunodeficiency virus (HIV) gp120-specific CD4⁺ cytotoxic T cell clone, induced by a natural HIV type 1 variant peptide. *J. Virol.* **74**: 2121-2130.
- Boussiotis V.A., Freeman G.J., Griffen J.D., Gray G.S., Gribben J.G., and Nadler L.M. 1994. CD2 is involved in maintenance and reversal of human alloantigen-specific clonal anergy. *J. Exp. med.* **180**: 1665-1673.
- Boussiotis, V. A., D. L. Barber, T. Nakarai, G. J. Freeman, J. G. Gribben, G. M. Bernstein, A. O. D'Andrea, J. Ritz, and L. M. Nadler. 1994. Prevention of T cell anergy by signaling through the γ c chain of the IL-2 receptor. *Science (Wash. DC)* **266**: 1039-1042.
- Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, P. A. Taylor, A. Berezovskaya, I. Grass, B. R. Blazar, and L. M. Nadler. 2000. p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nature Medicine* **6**: 290.
- Boussiotis, V.A., D.L. Barber., B.J. Lee., J.G. Gribben, G.J. Freeman, and L.M. Nadler. 1996. Differential association of protein tyrosine kinases with the T cell receptor is linked to the induction of anergy and its prevention by B7 family-mediated costimulation. *J. Exp. Med.* **184**: 365-376.
- Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Barber, D.L. and Nadler, L.M. 1997. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* **278**: 124-128.
- Brabletz T., Pietrowski .I., and Serfling E. 1991. The immunosuppressives FK 506 and cyclosporin A inhibit the generation of protein factors binding to the two purine boxes of the interleukin 2 enhancer. *Nucleic Acids Res.* **19**: 61-67.
- Bram R.J., Hung D.T., Martin P.K., Schreiber S.L., and Crabtree G.R. 1993. Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: Roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol. Cell Biol.* **13**: 4760-4769.
- Bryant M., Ratner L. 1990. Myristylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:523-527.

Bushman F.D., Fujiwara T., Craigie R. 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* **249**:1555-8.

Callahan, K.M., Fort, M.M., Obah, E.A., Reinherz, E.L. and Siliciano, R.F. 1990. Genetic variability in HIV-1 gp120 affects interactions with HLA molecules and T cell receptor. *J. Immunol.* **144**: 3341-3346.

Cameron P.U., Freudenthal. P.S., Barker J.M., Gezelter S., Inaba K., and Steinman R.M. 1992. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4⁺ cells. *Science* **257**: 383-387.

Camps M, Nichols A, Arkininstall S. 2000 Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* **14**:6-16.

Cann A.J., Zack J.A., Go A.S., Arrigo S.J., Koyanagi Y., Green P.L., Koyanagi Y., Pang S., Chen I.S. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 T-cell tropism is determined by events prior to provirus formation. *J. Virol.* **64**:4735-4742.

Cantrell D. 1994. G proteins in lymphocyte signalling. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 380-384.

Cantrell D. 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **14**: 259-274.

Caruso A, Cantalamessa A, Licenziati S, Peroni L, Prati E, Martinelli F, Canaris AD, Folghera S, Gorla R, Balsari A, et al. 1994. Expression of CD28 on CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes during HIV infection. *Cell* **78**:373-387.

Cease K.B., Margalit H., Cornette J.L., Putney S.D., Robey W.G., Ouyang C., Streicher H.Z., Fischinger P.J., Gallo R.C., DeLisi C., and Berzofsky J.A. 1987. Helper T-cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency syndrome virus gp120 envelope protein and induction of immunity in mice to the native protein using a 16 residue synthetic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 4249-4253.

Chan A.C., Dalton M., Johnson R., Kong G-H., Wang T., Thoma R., and Kurosaki T. 1995. Activation of Zap-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* **14**: 2199-2508.

Chan A.C., Desai D.M., and Weiss A. 1994a. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **12**: 555-592.

Chan A.C., Kadlecsek T.A., Elder M.E., Filipovich A.H., Kuo W-L., Iwashima M., Parslow T.G., and Weiss A. 1994b. Zap-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* **264**: 1599-1601.

Chan, A. C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.-H., Wang, T., Thoma, R. and Kurosaki, T. 1995. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* **14**: 2499-2508.

- Chan, A. C., Irving, B. A., Fraser, J. D. and Weiss, A. 1991. The TCR ζ chain associates with a tyrosine kinase and upon TCR-stimulation associates with ZAP-70, a 70K Mr tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9166-9170.
- Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. and Weiss, A. 1992. ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. *Cell* **71**: 649-662.
- Chau, L. A., J.A. Bluestone, and J. Madrenas. 1998. Dissociation of intracellular signaling pathways in response to partial agonist ligands of the T cell receptor. *J. Exp. Med.* **187**:1699-1709.
- Chehimi J., Bandyopadhyay S., Prakash K., Perussia B., Hassan N.F., Kawashima H., Campbell D., Kornbluth J., Starr S.E. 1991. *In vitro* infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* **65**: 1812-1822.
- Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* **9**:1586-1597.
- Chen, C.-Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z. and Karin, M. 1998. Stabilization of the interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway. *Science* **280**: 1945-1949.
- Chen, Y.-Z., Lai, Z.-F., Nishi, K. and Nishimura, Y. 1998. Modulation of calcium responses by altered peptide ligands in a human T cell clone. *Eur. J. Immunol.* **28**: 3929-3939.
- Cheng-Mayer C., Quiroga M., Tung J.W., Dina D., Levy J.A. 1990. Viral determinants of human immunodeficiency virus type-1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity and CD4 antigen modulation. *J. Virol.* **64**:4390-4398.
- Cheynier R, Henrichwark S, Hadida F, Pelletier E, Oksenhendler E, Autran B, Wain-Hobson S. 1994. HIV and T cell expansion in splenic white pulps is accompanied by infiltration of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Cell* **78**:373-387.
- Cho E.A., Riley P., Sillman A.L., and Quill H. 1993. Altered protein tyrosine phosphorylation in anergic Th1 cells. *J. Immunol.* **151**: 20-28.
- 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., and Sodroski J. 1996. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**: 1135-1148.
- Chu, D. H., H. Spits, J.-F. Peyron, R. B. Rowley, J. B. Bolen, and A. Weiss. 1996. The Syk protein tyrosine kinase can function independently of CD45 or Lck in T cell antigen receptor signaling. *EMBO J.* **15**: 6251-6261.
- Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M.-A., Santos-Ferreira M.O., Laurent A.G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C., Klatzmann D., Champalimaud J.L.,

Montagnier L. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**: 343-346.

Clavel F., Mansinho K., Chamaret S., Guetard D., Favier V., Nina J., Santos-Ferreira M.D., Champalimaud J.L., Montagnier L. 1987. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* **316**: 1180-1185.

Clayton L.K., D'Adamio L.D., Howard F.D., Sieh M., Hussey R.E., Koyasu S., and Reinherz E.L. 1991. CD3 η and CD3 ζ are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** : 5202.

Clements G.J., Price-Jones M. J., Stephans P.E. *et al.* 1991. The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contain proteolytic cleavage sites: A possible function in viral fusion? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**: 3-16.

Clements J.L., Boerth N.J., Lee J.R., and Koretzky G.A. 1999. Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 89-108.

Clerici M., Giorgi J.V., Chou C.C., Gudeman V.K., Zack J.A., Gupta P., Ho H.N., Nishanian P.G., Berzofsky J.A., Shearer G.M. 1992. Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *J.Infect. Dis.***165**: 1012-1019.

Clerici M., Levin J.M., Kessler H.A., Harris A., Berzofsky J.A., Landay A.L., Shearer G.M. 1994. HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood. *JAMA* **271**:42-46.

Clerici M., Lucey D.R., Zajac R.A., Boswell R.N., Gebel H.M., Takahashi H., Berzofsky J.A., Shearer G.M., 1991. Detection of cytotoxic T lymphocytes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *J. Immunol.* **146**:2214-2219.

Clerici M., Shearer G.M. 1993. A TH1 to TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* **14**:107-111.

Clevers H., Alarcon B., Willeman T., and Terhorst C. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: A dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 629-662.

Cobb, M.H., and E.J. Goldsmith. 1995. How MAP Kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* **270**: 14843-14846.

Coffin J.M. 1986. Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* **46**: 1-4.

Coffin, J.M. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science* **267**: 483-489.

Cohen E.A., Dehni G., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1990 a. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**:3097-3099.

- Colette Y., Razanajaona D., Ghiotto M., and Olive D. 1997. CD28 can promote T cell survival through a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism. *Eur. J. Immunol.* **27**: 3283-3289.
- Collins K.L., B Chen K., Kalams S.A., Walker B.D., and Baltimore D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* **391**: 397-401.
- Cooke MP, Abraham KM, Forbush KA, Perlmutter RM. 1991. Regulation of T cell receptor signaling by a src family protein-tyrosine kinase (p59fyn). *Cell* **65**:281-291.
- Cooney A.J., Tsai S.Y., O'Malley B.W., and Tsai M.J. 1991. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor binds to a negative regulatory region in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* **62**: 2853-2860.
- Cooper D.A., Gold J., Maclean P., Donovan B., Finlayson R., Barnes T.G., Michelmore H.M., Brooke P., Penny R. 1985. Acute AIDS retrovirus infection: definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* **i**: 537-540.
- Cordingley M.G., La Femina R.L., Callahan P.L, Condra J.H., Sardana V.V., Graham D.J., Nguyen T.M., LeGrow K., Gotlib L., Schlabach A.J., *et al.* 1990. Sequence-specific interaction of Tat proteins and Tat peptides with the transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro*. *Proc . Natl. Acad. Sci. USA* **87**:8985-8989.
- Coso O.A., Chiariello M., Yu J-C., Teramoto H., Crespo P., Xu N., Miki T., and Gutkind J.S. 1995. The small GTP-binding proteins Rac-1 and Cdc 42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**: 1137-1146.
- Couillin, I., Culmann-Penciolelli, B., Gomard, E., Levy, J-P., Guillet, J-G. and Saragosti, S. 1994. Impaired CTL recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of HIV-1 nef protein. *J. Exp. Med.* **180**: 1129-1136.
- Couture C, Deckert. M, Williams S, Russo.F. 1996. Identification of the site in the Syk protein tyrosine kinase that binds the SH2 domain of Lck. *J Biol Chem.* **271**:24294-24299.
- Couture, C. and Mustelin T. 1996a. The Src family of protein tyrosine kinases. In: *Signal transduction in testicular cells*. V. Hansson, F.O. Levy and K. Taskén Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 219-246.
- Couture, C. and Mustelin, T. 1996b. Regulation of src-family PTKs during T cell activation. In: *Signal Transduction in Leukocytes: G protein-related and other pathways*. Lad, P.M., Kaptein, J.S. Lin, C.-K. E (ed.), CRC Press Inc. Boca Raton, FL, USA. pp. 173-207.
- Couture, C., Baier G., Altman A., and Mustelin T. 1994a. p56^{lck}-independent activation and tyrosine phosphorylation of p72^{syk} by T-cell antigen receptor/CD3 stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:5301-5305.

- Couture, C., Baier, G., Oetken, C., Williams, S., Telford, D., Marie-Cardine, A., Baier-Bitterlich, G., Fischer, S., Burn, P., Altman, A. and Mustelin, T. 1994b. Activation of p56^{lck} by p72^{syk} through physical association and N-terminal tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol* **14**: 5249-5258.
- Couture, C., Williams, S., Gauthier, N., Taylor, P. and Mustelin, T. 1997. Role of tyrosines 518 and 519 in the regulation of catalytic activity and substrate phosphorylation by the Syk protein tyrosine kinase. *Eur. J. Biochem.* **246**: 447-451.
- Crabtree G.R., and Clipstone N.A. 1994. Signal transduction between the plasma membrane and nucleus of T-lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 1045-1083.
- Cullen B.R. 1998. HIV-1 auxiliary proteins: making connection in a dying cell. *Cell* **93**: 685-692.
- Curiel, T. J., J. T. Wong, P. F. Gorczyca, R. T. Schooley, and B. D. Walker. 1993. CD4⁺ human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope-specific cytotoxic T lymphocytes derived from the peripheral blood cells of an HIV-1 infected individual. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **9**:61-68.
- Curran J.F. 1993. Analysis of effects of tRNA:message stability on frameshift frequency at the Escherichia coli RF2 programmed frameshift site. *Nucleic Acids Res.* **21**:1837-1843.
- Da Silva A.J., Yamamoto M., Zalvan C.H., and Rudd C.E. 1992. *Mol. Immunol.* **29**: 1417-1425.
- Daar E.S., Mohri H., and Ho D.D. 1991. Virologic markers in the assessment of antiretroviral therapy. *AIDS 5 Suppl 2*: S175-S179.
- Daar E.S., Moudgil T., Meyer R.D., Ho D.D. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **325**:733-735.
- Darlix J.-L., Gabus C., Nugeyre M.-T., Clavel F., Barre-Sinoussi F. 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J. Mol. Biol.* **216**:689-699.
- Dasgupta J.D., Granja C., Druker B., Lin L-L., Yunis E.J., and Relias V. 1992. Phospholipase C- γ 1 association with CD3 structure in T cells. *J. Exp. Med.* **175**: 285-288.
- Dasgupta P., Saikumar P., Reddy C.D., and Reddy E.P. 1990. Myb protein binds to human immunodeficiency virus 1 long terminal repeat (LTR) sequences and transactivates LTR-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 8090-8094.
- Davey RT., and Capra W.B. 2000. Viral load in treatment with antiretroviral therapy and interleukin 2. *JAMA* **284** : 2055-2056.
- Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**: 239-252.

- Dayton A.I., Terwilliger E. F., Potz J., Kowalski M., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1988. Cis-acting sequences responsive to the *rev* gene product of the human immunodeficiency virus. *J. AIDS* **1**: 441-452.
- Dayton A.J., Sodroski J.G., Rosen C.A. 1986. The trans-activator gene of the human T-cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **4**: 941-947.
- de Waal Malefyt R., Yssel H., and de Vries J.E. 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.* **150**: 4754-4765.
- Debouck C., Gorniak J.G., Strickler J.E., Meek T.D., Metcalf B.W., Rosenberg M. 1987. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the *gag* precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:8903-8906.
- Deckert, M., Tartare-Deckert, M., Couture, C., Mustelin, T., and Altman, A. 1996. Functional and physical interactions of Syk family kinases with the Vav proto-oncogene product. *Immunity* **5**: 591-604.
- Del Prete G.F., De Carli M., Ricci M., Romagnani S. 1991. Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *J. Exp. Med.* **174**:809-813.
- Dembic Z., Haas W., Weiss S., McCubrey J., Kiefer H., von Boehmer H., and Steinmetz M. 1986. Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. *Nature* **320**: 232-238.
- Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., DiMarzio P., Marmon S., Sutton R.E., Hill C.M., Davis C.B., Peiper S.C., Schall T.J., Littman D.R., and Landau N.R. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**: 661-666.
- Deng T, Karin M. 1994. c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* **371**:171-175.
- Dent P., Haser W., Haystead T.A., Vincent L.A., Robert T.M., and Sturgill T.W. 1992. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and *in vitro* (comments). *Science* **257**: 1404-1407.
- Derijard B., Hibi M., Wu I., et al. 1994. JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**: 1025-1037.
- Derijard B., Raingeaud J., Barrett T et al. 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**: 682-685.

- DeSilva, D. R., E. A. Jones, M. F. Favata, B. D. jaffee, R. L. Magolda, J. M. Trzaskos, and P. A. Scherle. 1998. Inhibition of mitogen-activated protein kinase blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. *J. Immunol.* **160**: 4175-4181.
- DeSilva, D. R., W. S. Feeser, E. J. tancula. and P. A. Scherle. 1996. Anergic T cells are defective in both Jun NH2-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Exp. Med.* **183**: 2017-2023.
- Dewar R.L., Vasudevachari M.B., Natarajan V., Salzman N.P. 1989. Biosynthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: Effect of monensin on glycosylation and transport. *J. Virol.* **63**:2452-2456.
- Ding L., and Shevach E.M. 1992. IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J. Immunol.* **148**: 3133-3139.
- Ding L., Linsley P.S., Huang L.Y., Germain R.N., and Shevach E.M. 1993. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J. Immunol.* **15**: 1224-1234.
- Doms R.W., and Peiper S.C. 1997. Unwelcomed guests with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virol.* **235**: 179-190.
- Doranz B.J., Rucker J., Yi Y., Smyth R.J., Samson M., Peiper S.C., Parmentier M., Collman R.G., and Doms R.W. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2 β as fusion cofactors. *Cell* **85**: 1149-1158.
- Downward J., Graves J., and cantrell D. 1992. The regulation and function of p21^{ras} in T cells. *Immunol. Today* **13**: 89-92.
- Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y., Nagashima K.A., Cayanan C., Maddon P.J., Koup R.A., Moore J.P., and Paxton W.A. 1996. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the kemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**: 667-673.
- e Sousa, C.R., Levine, E.H., and Germain, R.N. 1996. Partial signaling by CD8⁺ T cells in response to antagonist ligands. *J. Exp. Med.* **184**: 149-157.
- Earl P.L, Doms R.W., Moss B. 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:648-652.
- Earl P.L, Moss B., Doms R.W. 1991. Folding, interaction with GRP78-BIP, assembly and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65**:2047-2055.
- Elder M.E., Lin D., Clever J., Chan A.C., Hope T.J., Weiss A., and Parslow T.G. 1994. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in Zap-70, a T cell tyrosine kinase. *Science* **264**: 1596-1599.
- Emerman M. 1996. HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Current Biology* **6**: 1096-1103.

Emini E.A., Nara P.L., Scleif W.A., Lewis J.A., Davide J.P., Lee D.R., Kessler J., Conley S., Matsushita S., Putney S.D., *et al.* 1990. Antibody-mediated *in vitro* neutralization of human immunodeficiency virus type 1 abolishes infectivity for chimpanzees. *J. Virol.* **64**:3674-3678.

Ennen J., Seipp I., Norley S.G., and Kurth R. 1990. Decreased accessory cell function of macrophages after infection with human immunodeficiency virus type 1 *in vitro* *Eur. J. Immunol.* **20**: 2451-2456.

Estable, M.C., Bell, B., Merzouki, A., Montaner, J.S.G., O'Shaughnessy, M.V. and Sadowski, I.J. 1997. Human immunodeficiency type 1 long terminal repeat variants from 42 patients representing all stages of infection display a wide range of sequence polymorphism and transcription activity. *J. Virol.* **70**: 4053-4062.

Evans L.A., Moreau J., Odehouri K., Seto D., Thomson-Honnebier G., Legg H., Barboza A., Cheng-Mayer C., Levy J.A. 1988. Simultaneous isolation of HIV-1 and HIV-2 from an AIDS patient. *Lancet* **2**: 1389-1391.

Evavold, B.D. and Allen, P.M. 1991. Separation of IL-4 production from Th1 cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* **252**: 1308-1310.

Evavold, B.D., Sloan-Lancaster, J., Hsu, B.L. and Allen, P.M. 1993. Separation of T helper 1 cytotoxicity from proliferation and lymphokine production using analog peptides. *J. Immunol.* **150**: 3131-3140.

Faith, A., Akdis, C.A., Akdis, M., Simon, H.-U. and Blaser, K. 1997. Defective TCR stimulation in anergized type 2 T helper cells correlates with abrogated p56^{lck} and ZAP-70 tyrosine kinase activities. *J. Immunol.* **159**: 53-60.

Faris M., Kokot N., Lee L., and Nel A.E. 1996. Regulation of interleukin-2 transcription by inducible stable expression of dominant negative and dominant active mitogen-activated protein kinase kinase in jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 27366--27373.

Fauci A.S 1988. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**: 617-622.

Fauci A.S. 1984. Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Res.* **32**:491-499.

Feig L.A., and Schaffhausen B. 1994. Signal transduction: The hunt for Ras targets. *Nature* **370**: 508-509.

Feinberg M.B., Jarrett R.F., Aldovini A., Gallo R.C., Wong-Staal F. 1986. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* **46**:807-817.

Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E., and Berger E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**: 872-877.

Fenyo E.M., Morfeldt-Manson L., Chiodi F., Lind B., Von Gegerfelt A., Albert J., Olausson E., and asjo B. 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J. Virol.* **62**: 4414-4419.

Fields, P.E., Gajewski, T.F. and Fitch, F.W. 1996. Blocked Ras activation in anergic CD4⁺ T cells. *Science* **271**: 1276-1278.

Fink P.J., Shimonkevitz R.P., and Bevan M.J. 1988. Veto cells. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 115-137.

Finzi D., and Siliciano R.F. 1998. Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* **93**: 665-671.

Fischl M., Richman D., Grieco M., Gottlieb M., Volberding P., Laskin O., Leedom J., Groopman J., Mildvan D., Schooley R., Jackson G., Durack D., King D., and The AZT Collaborative Working Group. 1987. The efficacy of AZT in the treatment of patients with AIDS and ARC. *N. Eng. J. Med.* **317**: 185-189.

Fischl M.A., Richman D.D., Hansen N., Collier A.C., Carey J.T., Para M.F., Hardy W.D., Dolin R., Powderly W.G., and Allan J.D. 1990. The safety and efficacy of zidovudine (AZT) in the treatment of subjects with mildly symptomatic HIV-1 infection. a double-blind, placebo controlled trial. *The AIDS Clinical Trials Group. Ann. Int. Med.* **112**: 727-737.

Fisher A.G., Feinberg M.B., Josephs S.F. 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**:2367-2371.

Fisher R.A., Bertonis J. M., Meier W., Johnson V.A., Costopoulos D.S., Liu T., Tizard R., Walker R.D., Hirsch M.S., Schooley R.T., *et al.* 1988. HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* **331**:76-78.

Foletta V.C., Segal D.H., and Cohen D.R. 1998. Transcriptional regulation in the immune system: All roads lead to AP-1. *J. Leukoc. Biol.* **63**: 139-152.

Fournel M., Davidson D., Weil R., and Veillette A. 1995. Association of tyrosine protein kinase Zap-70 with the protooncogene product p120c-cbl in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **183**: 301-306.

Frankel, A.D. 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **67**: 1-25.

Franklin R.A., Tordai A., Patel H., Gardner A.M., Johnson G.L., and Gelfand E.W. 1994. Ligation of the T cell receptor complex results in activation of the Ras/Raf-1/MEK/MAPK cascade in human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* **93**: 2134-2140.

Franza B.R., Raucher F.J., Josephs S.F., and Curran T. 1988. The *fos* complex and *fos*-related antigens recognize sequence elements that contains AP-1 binding sites. *Science* **239**: 1150-1153.

Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. 1991 Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* **251**:313-316.

- Freeman G.J., Gribben J.G., Boussiotis V.A., Restivo Ng, V.A.J., Lombard L.A., Gray G.S., and Nadler L.M. 1993. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science (Wash. DC)*. **262**: 909-911.
- Frost J.A., Geppert T.D., Cobb M.H., and Feramisco J.R. 1994. A requirement for extracellular signal-regulated kinase (ERK) function in the activation of AP-1 by Ha-Ras, phorbol 12-myristate 13-acetate, and serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 3844-3848.
- Furuzawa, T., M. Itoh, N. X. Krueger, M. Streuli, and H. Saito. 1994. Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with the tyrosine-phosphorylated CD3 ζ chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10928-10932.
- Gaines H., Albert J., von Sydow M., Sonnerberg A., Chiodi F., Ehrnst A., Strannegard O., Asjo B. 1987. HIV antigenaemia and virus isolation from plasma during primary HIV infection. *Lancet* **1**: 1317-1318.
- Gaines H., von Sydow M., Parry J.V., Forsgren M., Pehrson P.O., Sonnerborg A., Mortimer P.P., Strannegard O. 1988. Detection of immunoglobulin M antibody in primary human immunodeficiency virus infection. *AIDS*. **2**: 11-15.
- Gajewski TF., Qian D., Fields P., and Fitch F.W. 1994. Anergic T lymphocyte clones have altered inositol phosphate, calcium, and tyrosine kinase signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 38-42..
- Garcia J.V., and Miller A.D. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell surface CD4 by nef. *Nature* **350**: 508-511.
- Gardner MB, Luciw PA. 1989. Animal models of AIDS. *FASEB. J.* **3**:2593-2606.
- Garrity P.A., Chen D., Rothenberg E.V., and Wold B.J. 1994. IL-2 transcription is regulated *in vivo* at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 2159-2169.
- Gassman M., Guttinger M., Amrein K.E., and Burn P. 1992. Protein tyrosine kinase p59^{fyn} is associated with the T cell receptor-CD3 complex in functional human lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **22**: 283-286.
- Gauen L.K.T., Kong A.N.T., Samelson L.E., and Shaw A.S. 1992. p59Fyn tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* **12** : 5438-5446.
- Gaynor, R. 1992. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* **6**:347-363.
- Gearing AJ, Johnstone AP, Thorpe R. 1985. Production and assay of the interleukins. *J Immunol. Methods.***83**:1-27.

Gelderblom H.R., Hausmann E.H.S., Ozel M., Pauli G., Koch M.A. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**:171-176.

Gelderblom H.R., Ozel M., Pauli G. 1989. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch. Virol.* **106**:1-13.

Genetta T., Ruezinsky D., and Kadesch T. 1994. Displacement of an E-box-binding repressor by helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6153-6163.

George J.R., Ou C.Y., Parekh B., Brattegaard K., Brown V., Boateng E., De Cock K.M. 1992. Prevalence of HIV-1 and HIV-2 mixed infections in Cote d'Ivoire. *Lancet* **340**: 337-339.

Germain RN., and Stefanova I. 1999. The dynamics of T cell receptor signaling: complex

Gibson S., August A., Branch D., Dupont B., and Mills G.B. 1996. Functional LCK is required for optimal CD28-mediated activation of the TEC family tyrosine kinase EMT/ITK. *J. Biol. Chem.* **271**: 7079-7083.

Gimmi, C.D., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Gray, G. and Nadler, L.M. 1993. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6586-6590.

Girard M., Kieny M.P., Pinter A., Barre-Sinoussi F., Nara P., Kolbe H., Kusumi K., Chaput A., Reinhart T., Muchmore E., *et al.* 1991. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:542-546.

Gnann J.W., Jr., McCormick J.B., Mitchell S., Nelson J.A., Oldstone M.B.A. 1987. Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections. *Science* **237**: 1346-1349.

Goh W.C., Rogel M.E., Kinsey C.M., Michael S.F., Fultz P.N., Nowak M.A., Hahn B.H., and Emerman M. 1998. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr *in vivo*. *Nature Med.* **4**: 65-71.

Goh W.C., Sodroski J.G., Rosen C.A., and Haseltine W.A. 1987. Trans-activator gene of HTLV-II : interpretation. *J. Virol.* **61**: 633-637.

Gold MR, Matsuuchi L. 1995. Signal transduction by the antigen receptors of B and T lymphocytes. *Int Rev Cytol.* **157**:181-276.

Gorelick R.J., Nigida S. M. Jr., Bess J.W. Jr., Arthur L.O., Henderson L.E., Rein A. 1990. Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J. Virol.* **64**:3207-3211.

- Gottlinger H.G., Dorfman T., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3195-3199.
- Goudsmit J, Ljunggren K, Smit L, Jondal M, Fenyo EM, Jonda M. 1988. Biological significance of the antibody response to HIV antigens expressed on the cell surface. *Arch Virol* .**103**:189-206.
- Goudsmit J., Debouck C., Melen R.H., Smit L., Bakker M., Asher D.M., Wolff A.V, Gibbs C. Jr., Gajdusek D.C. 1988a. Human immunodeficiency virus type 1 neutralizing epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4478-4482.
- Goulder P.J.R., Phillips R.E., Colbert R.A., McAdam S., Ogg G., Nowak M.A., Giangrande P., Luzzi G., Morgan B., Edwards A., McMichael A.J., and Rowland-Jones S. 1997. Late escape from an immunodominant cytotoxic T- lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* **3**: 212-217.
- Graham F.L., and Van Der Eb J.A. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**:456-467.
- Grakoui, A., VanDyk, L.F., Dowdy, S.F. and Allen, P.M. 1988. Molecular basis for the lack of T cell proliferation induced by an altered peptide ligand. *Int. Immunol.* **10**: 969-979.
- Gray F. 1989. Les lésions du système nerveux central au cours du SIDA. *Médecine/Science* **5**: 145-151.
- Graziosi C., Soudeyins H., Rizzardi G.P., Bart P.A., Chapius A., and Pantaleo G. 1998. Immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **14**: S-135-S-142.
- Greene W.C., 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**:308-317.
- Grez M., Dietrich U., Balfe P., von Briesen H., Maniar J.K., Mahambre G., Delwart E.L., Mullins J.I., Rubsamen-Waigmann H. 1994. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses. *J. Virol.* **68**: 2161-2168.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. 1996. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med.* **184**:19-29.
- Guy B., Kieny M.P., Riviere Y., Le Peuch C., Dott K., Girard M., Montagnier L., and Lecocq J.P. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**: 266-269.
- Haffar O.K, Dowbenko D. , Berman P.W. 1988. Topogenic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160, in microsomal membranes. *J. Cell. Biol.* **107**:1677-1687.

Hahn B.H., Gonda M.A., Shaw G.M., Popovic M., Hoxie J.A., Gallo R.C., and Wong-Staal F. 1985. Genomic diversity of the acquired immune deficiency syndrome virus HTLV-III: different viruses exhibit greatest divergence in their envelope genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 4813-4817.

Hahn B.H., Shaw G.M., Arya S.K., Popovic M., Gallo R.C.' and Wong-Staal F. 1984. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. *Nature* **312**: 166-169.

Hall, C.G., Sancho, J. and Terhorst, C. 1993. Reconstitution of T cell receptor ζ -mediated calcium mobilization in nonlymphoid cells. *Science* **261**: 915-918.

Hammond S.A., Bollinger R.C., Stanhope P.E., Quinn T.C., Schwartz D., Clements M.L., Siliciano R.F. 1993. Comparative clonal analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4⁺ and CD8⁺ cytolytic T lymphocytes isolated from seronegative humans immunized with candidate HIV-1 vaccines. *J. Exp. Med.* **176**: 1531-1542.

Harding F.A., McArthur J.G., Gross J.A., Raulet D.H., and Allison J.P. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* **356**: 607-609.

Hardy K., and Chaudhri G. 1997. Activation and signal transduction via mitogen-activated protein (MAP) kinases in T lymphocytes. *Immunol. Cell. Biol.* **75**: 528-545.

Harrich D., Garcia J., Wu F., Mitsuyasu R., Gonzalez J and Gaynor R. 1989. Role of Sp1 binding domains *in vivo* transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* **63**: 2585-2591.

Hatada, M. H., L. Xiaode, E. R. Laird, J. Green, J. P. Morgenstern, M. Lou, C. S. Marr, T. B. Phillips, M. K. Ram, K. Theriault, M. J. Zoller, and J. L. Karas. 1995. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* **377**:32-38.

Heinzinger N.K., Bukrinsky M.I., Haggerty S.A., Ragland A.M., Kevalramani V., Lee M.-A., Gendelman H.E., Ratner L., Stevenson M., and Emerman M. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localisation of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 7311-7315.

Hemmer, B., I. Stefanova, M. Vergelli, R. N. Germain, and R. Martin. 1998. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J. Immunol.* **160**: 5807.

Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A., and Karin M. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**: 2135-2148.

Hibi M., Lin A., Smeal T., Minden A., and Karin M. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that bind and potentiate the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* **7**: 2135-2148.

Ho D.D., Moudgil T., and Alam M. 1989. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Eng. J. Med.* **321**: 1621-1625.

Ho D.D., Rota T.R., and Hirsch G.A., 1986. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J. Clin. Invest.* **77**: 1712-1715.

Hoey T., Sun Y., Williamson K., and Xu X. 1995. Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity.* **2**: 461-472.

Hoffenbach A., Langlade-Demoyen P., Dadaglio G., Vilmer E., Michel F., Mayaud C., Autran B., Plata F. 1989. Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* **142**:452-462.

Hollberg P., Weber W.E.J., Dangond F., Batra V., Sette A and Hafler D. 1995. Differential activation of proliferation and cytotoxicity in human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax-specific CD8 T cells by an altered peptide ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4036-4040.

Horsburgh C.R., Jr., Ou C.-Y., Jason J., Holmberg S.D., Longini I.M., Jr., Schable C., Mayer K.H., Lifson A.R., Schochetman G., Ward J.W., Rutherford G.W., Evatt B.L., Seage III G.R., Jaffe H.W. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **ii**: 637-640.

Hosmalin A., Clerici M., Houghten R., Pendleton C.D., Flexner C., Lucey D.R., Moss B., Germain R.N., Shearer G.M., Berzofsky J.A. 1990. An epitope in human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase recognized by both mouse and human cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2344-2348.

Howe L.R., Leever S.J., Gomez N., Nakielny S., Cohen P., and Marshall C.J. 1992. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* **71**: 335-342.

Hoyer D., and Boddeke H.W. 1993. Partial agonists, full agonists, antagonists : dilemmas of definition. *Trends Pharmacol. Sci.* **14** : 270-275.

Hu Q., Klippel A., Muslin A.J., Fanti W.J., and Williams L.T. 1995. Ras dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* **268**: 100-102.

Hu, W.-S., and H. M. Temin. 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**:1227-1232.

Huang L, Bosch I, Hofmann W, Sodroski J, Pardee AB. 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.

Hutchcroft J.E., Geahlen R.L., Deanin G.G., and Oliver J.M. 1992a. FcεRI-mediated tyrosine phosphorylation and activation of the 72-kDa protein-tyrosine kinase, PTK72, in RBL-2H3 rat tumor rat tumor mast cells. *Proc. Natl. Acad. SciUSA.* **89** : 9107-9111.

Hutchcroft J.E., Harrison M.L., and Geahlen R.L. 1992b. Association of the 72-kDa protein-tyrosine kinase PTK72 with the B cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* **267**: 8613-8617.

Irving B.A., and Weiss A. 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* **64**: 891-901.

Irving B.A., Chan A.C., and Weiss A. 1993. Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor ζ chain. *J. Exp. Med.* **177** : 1093-1103.

Isakov N. 1993. Tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in T lymphocyte activation. *Mol Immunol.* **30**:197-210.

Iwashima M., Irving B.A., van Oers N.S.C., Chan A.C., and Weiss A. 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**: 1136-1139.

Izquierdo M., Leever S.J., Leever S.J., Williams D.H., Marshall C.J., Weiss A., and Cantrell D. 1994. The role of protein kinase C in the regulation of extracellular signal-regulated kinase by the T cell antigen receptor. *Eur. J. Immunol.* **24**: 2462-2468.

Izquierdo M., Leever S.J., Marshall C.J., and Cantrell D. 1993. p21ras couples the T cell antigen receptor to extracellular signal-regulated kinase 2 in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **178**: 1199-1208.

Izquierdo Pastor M., Reif K., and Cantrell D. 1995. The regulation and function of p21^{ras} during T-cell activation and growth. *Immunol. Today* **16**: 159-164.

Jabbar MA. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: roles in virus release and CD4 downregulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **193**:107-120.

Jacinto E., Werlen G., and Karin M. 1998. Cooperation between Syk and rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes. *Immunity* **8**: 31-41.

Jackman, J. K., D. G. Motto, Q. Sun, M. Tanemoto, C. W. Turck, G. A. Peltz, G. A. Koretzky, and P. R. Findell. 1995. Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J. Biol. Chem.* **270**:7029-7032.

Jain J., Loh C., and Rao A. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 333-342.

Jain J., McCaffrey P.G., Miner Z., Kerppola T.K., Lambert J.N., verdine G.L., Curran T., and Rao .A. 1993. The T-cell transcription factor NFAT_p is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**: 352-355.

Jain J., McCaffrey P.G., Valge-Archer V.E., and Rao A. 1992b. Nuclear factor of activated T-cells contains Fos and Jun. *Nature* **356**: 801-804.

- Jain J., Valge-Archer V.E., and Rao A. 1992a. Analysis of the AP-1 sites in the IL-2 promoter. *J. Immunol.* **148**: 1240-1250.
- Jameson S.C., and Bevan M.J. 1995. T cell receptor antagonists and partial agonists. *Immunity* **2**: 1-11.
- Jameson S.C., Carbone F.R., and Bevan M.J. 1993. Clone-specific T cell receptor antagonists of major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.* **177**: 1541-1550.
- Jans DA. 1995. The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *Biochem J.* **311**:705-716.
- Jassey C, Johnson RP, Navia BA, Worth J, Walker BD. 1992. Detection of a vigorous HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte response in cerebrospinal fluid from infected persons with AIDS dementia complex. *J Immunol.* **149**:3113-3119.
- Jenkins M.K. 1994. The ups and downs of T cell costimulation. *Immunity.* **1**: 443-446.
- Jenkins M.K., and Schwartz. R.H. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* **165**: 302-319.
- Jenkins, M. K., C. A. Chen, G. Jung, D. L. Mueller, and R. H. Schwartz. 1990. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **144**: 16-22.
- Jenkins, M. K., D. M. Pardoll, J. Mizuguchi, T. M. Chused, and R. H. Schwartz. 1987. Molecular events in the induction of a nonresponsive state in IL-2-producing T-lymphocyte clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5409-5413.
- Jenkins, M. K., D. Mueller, R. H. Schwartz, S. Carding, K. Bottomly, M. J. Staderker, K. B. Urdahl, and S. D. Norton. 1991. Induction and maintenance of anergy in mature T cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **292**: 167-176.
- Jin Y.J., Clayton L.K., Howard F.D., Koyasu S., Sieh M., Steinbrich R., Tarr G.E., and Reinherz E.L. 1990. Molecular cloning of the CD3 η subunit identifies a CD3 ζ -related product in thymus-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 3319-3323.
- Johnson, K. G., F. G. Leroy, L. K. Borysiewicz, and R. J. Matthews. 1999. TCR signaling thresholds regulating T cell development and activation are dependent upon SHP-1. *J. Immunol.* **162**:3802-3813.
- Johnson, R. P., A. Trocha, T. M. Buchanan, and B. D. Walker. 1992. Identification of overlapping HLA class I-restricted cytotoxic T cell epitopes in a conserved region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: Definition of minimum epitopes and analysis of the effects of sequence variation. *J. Exp. Med.* **175**:961-971.

- Johnson, R. P., S. A. Hammond, A. Trocha, R. F. Siliciano, and B. D. Walker. 1994. Induction of a major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte response to a highly conserved region of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 in seronegative humans immunized with a candidate HIV-1 vaccine. *J. Virol.* **68**:3145-3153.
- Jones K.A., Kadonaga P.A., Luciw P.A., and Tjian R. 1986. activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor Sp1. *Science* **232**: 755-759.
- Jones K.A., Luciw P.A., and Durance N. 1988. Structural arrangements of transcription control domains within the 5'untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters. *Genes Dev.* **2**: 1101-1114.
- June C.H., Bluestone J.A., Nadler L.M., and Thompson C.B. 1995. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today* **15**: 321-331.
- June, C. H., Fletcher, M. C., Ledbetter, J. A. and Samelson, L.E. 1990. Increases in tyrosine phosphorylation are detected before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* **144**: 1591-1598.
- Kallunki T., Su B., Tsigelny I., et al. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* **8**: 2996-3007.
- Kan N.C., Franchini G., Wong-Staal F., DuBois G.C., Robey W.G., Lautenberger J.A., Papas T.S., 1986. Identification of HTLV-III/LAV *src* gene product and detection of antibodies in human sera. *Science* **231**:1553-1555.
- Kang, S.-M., Beverly, B., Tran, A.-C., Brorson, K., Schwartz, R.H. and Lenardo, M.J. 1992. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* **257**: 1134-1138.
- Karin M, Smeal T. 1992. Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem Sci.***10**:418-422.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**: 16483-16486.
- Kato H., Horikoshi M., and Roeder R.G. 1991. Repression of HIV-1 transcription by a cellular protein. *Science* **251**: 1476-1479.
- Katzav S., Sutherland M., Packham G., Yi T., and Weiss A. 1994. The protein tyrosine kinase Zap-70 can associate with the SH2 domain of proto-vav. *J. Biol. Chem.* **269**: 32579-32585.
- Kawakami T., Pennington C.Y., and Robbins K.C. 1986. Isolation and oncogenic potential of a novel human *src*-like gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 4195-4201.

- Kawazaki, H., Nakata, Y., Suzuki, G., Chihara, K., Tokuhisa, T. and Shiozawa, S. 1999. Increased c-Fos/activator protein-1 confers resistance against anergy induction on antigen-specific T cells. *Int. Immunol.* **11**: 1873-1880.
- Kearney E.R., Pape K.A., Loh D.Y., and Jenkins M.K. 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction *in vivo*. *Immunity* **1**: 327-339.
- Kent S.J., Greenberg P.D., Hoffman M.C., Akridge R.E., and McElrath M.J. 1997. Antagonism of vaccine-induced HIV-1-specific CD4⁺ T cells by primary HIV-1 infection. *J. Immunol.* **158**: 807-815.
- Kerkau, T., I. Bacik, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, T. Hünig, A. Schimpl, and U. Schubert. 1997. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J. Exp. Med.* **185**:1295-1305.
- Kersh, E. N., A. S. Shaw, and P. M. Allen. 1998. Fidelity of T cell proliferation through multistep T cell receptor ζ phosphorylation. *Science* **281**:572-575.
- Kido H., Fukutomi A., Katanuma N. 1990. A novel membrane-bound serine esterase in human T4⁺ lymphocytes immunologically reactive with antibody inhibiting syncytia induced by HIV-I. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **265**:21979-21985.
- Kido, H., Fukutomi A., Katanuma N. 1991 Tryptase TL₂ in the membrane of human T4⁺ lymphocytes is a novel binding protein of the V3 domain of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *FEBS Lett.* **286**: 233-236.
- Kim S.Y., Byrn R., Groopman J., Baltimore D. 1989. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infections: Evidence for differential gene expression. *J. Virol.* **63**:3708-3713.
- King P.D., Sadra A., Teng J.M.C., Liu X-R., Han A., Selvakumar A., August A., and Dupont B. 1997. Analysis of CD28 cytoplasmic tail residues as regulators and substrates for the protein tyrosine kinases, EMT and Lck. *J. Immunol.* **158**: 580-590.
- Kinoshita S., Chen B.K., Kaneshima H., and Nolan G.P. 1998. Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell* **95** : 595-604.
- Kitagawa-Sakakida, S., and R.H. Schwartz. 1996. Multifactor cis-dominant negative regulation of IL-2 gene expression in anergized T cells. *J. Immunol.* **157**: 2328-2339.
- Kleiman L., Gaudry S., Soulerice F. *et al.* 1991. Incorporation of tRNA into normal and mutant HIV-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 1272-1280.
- Klenerman P., Meier U-C., Phillips R.E., and McMichael A.J. 1995. The effects of natural altered peptide ligands on the whole blood cytotoxic T lymphocyte response to human immunodeficiency virus. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1927-1931.

Klenerman, P., Rowland-Jones, S., McAdam, S., Edwards, J., Daenke, S., Laloo, D., Koppe, B., Rosenberg, W., Boyd, D., Edwards, A., Giangrande, P., Phillips, R.E. and McMichael, A.J. 1994. Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature* **369**: 403-407.

Klimkait T., Strebel K., Hoggan M.D., Martin M.A., and Orenstein J.M. 1990. The human immunodeficiency virus type1-specific protein Vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* **64**: 621-629.

Klohe E., Watts R., Bahle M., Alber C., Yu W-Y., Andersen R., Silver J., Gregersen P.K., and Karr R.W. 1988. Analysis of the molecular specificities of anti-class II monoclonal antibodies using L cell transfectants expressing human class II molecules. *J. Immunol.* **141**: 2158-2164.

Kmieciak, D., Wasik, T.J., Tepler, H., Pientka, J., Hsu, S.H., Takahashi, H., Okumura, K., Kaneko, Y. and Kozbor, D. 1998. The effect of deletion of the V3 loop of gp120 on cytotoxic T cell responses and HIV gp120-mediated pathogenesis. *J. Immunol.* **160**: 5676-5683.

Knight S.C., Elsew W., and Wang H. 1997. Mechanisms of loss of functional dendritic cells in HIV-1 infection. *J. Leuk. Biol.* **62**: 78-81.

Koenig S., Conley A.J., Brewah Y.A., Jones G.M., Leath S., Boots L.J., Davey V., Pantaleo G., Demarest J.F., Carter C., Wannebo C., Yannelli J.R., Rosenberg S.A., and Lane H.C. 1995. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat. Med.* **1**: 330-336.

Koenig S., Earl P. , Powell D., Pantaleo G., Merli S., Moss B., Fauci A.S., 1988. Group-specific, major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic responses to human immunodeficiency virus I (HIV-1) envelope proteins by cloned peripheral blood T cells from an HIV-1 infected individual. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:8638-8642.

Koenig S., Fuerst T. R., Wood L.V, Suzich J.A., Jones G.M., de la Cruz V.F., Daley R.. Jr., Venkatesan S., Moss B., et al. 1990. Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 nef protein. *J. Immunol.* **145**:127-135.

Kong, G., Dalton, M., Wardenburg, J.B., Strauss, D., Kurosaki, T. and Chan, A.C. 1996. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5026-5035.

Kong, G.-H., Bu, J.-Y., Kurosaki, T., Shaw, A. S. and Chan, A. C. 1995. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity* **2**: 485-492.

Koretzky G.A. 1997. The role of Grb2-associated proteins in T cell activation. *Immunol. Today.* **18**: 401-406.

Kortenjann M., Thomae O., and Shaw P.E. 1994. Inhibition of v-raf-dependent c-fos expression and transformation by a kinase-defective mutant of the mitogen-activated protein kinase Erk2. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4815-4824.

Koup R.A., and Ho D.D. 1994a. Shutting down HIV. *Nature* **370**: 416.

Koup R.A., Sullivan J.L., Levine P.H., Brewster F., Mahr A., Mazzara G., McKenzie S., Panicali D., 1989. Antigenic specificity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity directed against human immunodeficiency virus in antibody positive sera. *J. Virol.* **63**:584-590.

Koup, R. A. 1994b. Virus escape from CTL recognition. *J. Exp. Med.* **180**:779-782.

Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLoed, G., Borkowski, W., Farthing, C. and Ho, D.D. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**: 4650-4655.

Kozarsky K., Penman M., Basiripour L., Haseltine W., Sodroski J., Kreiger M. 1989. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. AIDS* **2**:163-169.

Kurane, I., L. Zeng, M. A. Brinton, and F. A. Ennis. 1998. Definition of an epitope on NS3 recognized by human CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte clones cross-reactive for dengue virus types 2, 3, and 4. *Virology* **240**: 169-174.

Kuwano K, Akashi A, Arai S. 1998. An anergic cytotoxic T lymphocyte clone exhibits granule exocytosis-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol* **185**:114-122.

Kyriakis J.M., App H., Zhang X.F., et al. 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* **358**: 417-421.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** : 680-685.

LaFace, D.M., Couture, C., Anderson, K., Shih, G., Alexander, J., Sette, A., Mustelin, T., Altman, A. and Grey, H.M. 1997. Differential T cell signaling induced by antagonist peptide-MHC complexes and the associated phenotypic responses. *J. Immunol.* **158**: 2057-2064.

Lake R.A., O'Hehir R.E., Verhoef A., and Lamb J.R. 1993. CD28 mRNA rapidly decays when activated T cells are functionally anergized with specific peptide. *Int. Immunol.* **5**: 461-466.

Lamb J.R., Skidmore B.J., Green N., Chiller J.M., and Feldmann M. 1983. Induction of tolerance in influenza virus-immune T lymphocytes clones with synthetic peptides of influenza hemagglutinin. *J. Exp. Med.* **157**: 1434-1447.

Lane H.C., and Fauci A.S. 1985. Immunologic abnormalities in the AIDS. *Ann. Rev. Immunol.* **3**: 477-500.

LaSalle J.M., and Hafler D.A. 1994. T cell anergy. *FASEB. J.* **8**: 601-608.

Lasky L., Groopman J., Feenei C., Benz P., Capon D., Dowbenko D., Nakamura G., Nunes W., Renz M., and Berman P. 1986. Neutralization of AIDS retrovirus by antibodies to a recombinant envelope glycoprotein. *Science* **233**: 209-212.

Lasky L.A., Nakamura G., Smith D.H., Fennie C., Shimasaki C., Patzer E., Berman P., Gregory T., Capon D.J. 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**:975-985.

Laspia M.F., Rice A.P., Matthews M.B. 1989. HIV-1 tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* **59**:283-292.

Latour, S., Fournier, M. and Veillette, A. 1997. Regulation of T-cell antigen receptor signalling by Syk tyrosine protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 4434-4441.

Lauritsen, J. P. H., M. D. Christensen, J. Dietrich, J. Kastrup, N. Odum, and C. Geisler. 1998. Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J. Immunol.* **161**:260-267.

Le Gall S., Erdtmann L., Benichou S., Berlioz-Torent C., Liu L., Benarous R., Heard J.-M., and Shwartz O. 1998. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* **8**: 483-495.

Ledbetter J.A., and Linsley P.S. 1992. CD28 receptor crosslinking induces tyrosine phosphorylation of PLC γ 1. *Adv. Exp. Med. Biol.* **323**: 23-27.

Lee T.H., Coligan J. E., Allan J.S., McLane M.F., Groopman J.E., Essex M., 1986. A new HTLV-III/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses. *Science* **231**:1546-1549.

Lekutis, C. and N. L. Letvin. 1998. Substitution in a major histocompatibility complex class II-restricted human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitope can affect CD4⁺ T-helper-cell function. *J. Virol.* **72**:5840-5844.

Lenormand P., Pages G., Sardet C., L'Allemain G., Meloche S., and Pouyssegur J. 1993. MAP kinases: Activation, subcellular localization and role in the control of cell proliferation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **28**: 237-244.

Lenschow D.J., Walunas T.L., and Bluestone J.A. 1996. CD28/B7 system of T costimulation. *Immunol. Rev.* **14**: 233-258.

Leonard R., Zagury D. , Desportes I., Bernard J., Zagury J.F., Gallo R.C., 1988. Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:3570-3574.

- Letourneur F., and Klausner R.D. 1992. Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ . *Science* **255** : 79-82.
- Lever A., Gottlinger H. , Haseltine W., Sodroski J. 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* **63**:4085-4087.
- Levy J.A., Shimabukuro J., Mc Hugh T., Casavant C., Stites D., and Oshiro L. 1985. AIDS associated retrovirus (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. *Virology* **147**: 441-448.
- Lewinsohn, D. M., T. T. Bement, J. Xu, D. H. Lynch, K. H. Grabstein, S. G. Reed, and M. R. Alderson. 1998. Human purified protein derivative-specific CD4⁺ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms. *J. Immunol.* **160** : 2374-2379.
- Li, W., Whaley, C.D., Mondino, A., Mueller, D.L. 1996. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4⁺ T cells. *Science* **271**: 1272-1276.
- Lifson J.D., Reyes G.R., McGrath M.S., Stein B.S., Engleman E.G. 1986. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* **232**: 1123-1127.
- Lightfoote M.M., Coligan J. E., Folks T.M., Fauci A.S., Martin M.A., VenKatesan S., 1986. Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *J. Virol.* **60**:771-775.
- Linsley P.S. 1995. Distinct roles for CD28 and cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 receptors during T cell activation? *J.Exp. Med.* **182**: 289-292.
- Linsley P.S., Brady W., Grosmarie L., Aruffo A., Damle N.K., and Ledbetter J.A. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**: 721-730.
- Littaua, R. A., M. B. Oldstone, A. Takeda, and F. A. Ennis. 1992. A CD4⁺ cytotoxic T-lymphocyte clone to a conserved epitope on human immunodeficiency type 1 p24: cytotoxic activity and secretion of interleukin-2 and interleukin-6. *J. Virol.* **66** :608-611.
- Littman D.R. 1987. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu. Rev. Immunol.* **5**: 561-584.
- Littman D.R. 1998. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* **93**: 677-680.
- Ljunggren K., Broliden P.A., Morfeldt, Manson L., Jondal M., Wahren B. 1988. IgG subclass response to HIV in relation to antibody dependent cytotoxicity at different clinical stages. *Clin Exp. Immunol.* **73**:343-347.

- Louwagie J., Janssens W., Mascola J., Heyndrickse L., Hegerich P., Groen G.V.D., McCutchan F.E., and Burke D.S. 1995. Genetic diversity of the envelope glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1 isolates of African origin. *J. Virol.* **69**: 263-271.
- Lu Y.C., Touzjian N., Stenzel M., Dorfman T., Sodroski J., and Haseltine W.A. 1990. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**: 5226-5229.
- Lu Y.Y., Koga Y., Tanaka K., Sasaki M., Kimura G., Nomoto K. 1994. Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**:390-399.
- Luciw P.A., Cheng-Meyer C., Levy J.A. 1987. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: The orf-E region down-regulates virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:1434-1438.
- Lupher M.L.J., Reedquist K.A., Miyake S., Langdon W.Y., and Band H. 1996. A novel phosphotyrosine-binding domain in the N-terminal transforming region of Cbl interacts directly and selectively with Zap-70 in T cells. *J. Biol. Chem.* **271**: 24063-24068.
- Macatonia S.E., Patterson S., and Knight S.C. 1989. Suppression of immune responses by dendritic cells infected with HIV. *Immunology* **67**: 285-289.
- 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**: 93-104.
- Madrenas, J. and Germain, R.N. 1996. Variant TCR ligands: New insights into the molecular basis of antigen-dependent signal transduction and T-cell activation. *Sem. Immunol.* **8**: 83-101.
- Madrenas, J., Schwartz, R.H. and Germain, R.N. 1996. Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9736-9741.
- Madrenas, J., Wange, R.L., Wang, J.L., Isakov, N., Samelson, L.E. and Germain, R.N. 1995. ζ phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* **267**: 515-518.
- Maier, C.C., Bhandoola, A., Borden, W., Yui, K., Hayakawa, K and Greene, M.I. 1998. Unique molecular surface features of *in vivo* tolerized T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4499-4503.
- Malim M.H., Hauber J., Le S.Y., Maizel J.V., Cullen B.R. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**: 254-257.

- Mangasarian A., and Trono D. 1997. The multifaceted role of HIV Nef. *Vir. Res.* **148**: 30-33.
- Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. 1993. The SRS accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**: 381-393.
- Marciniak R.A., Calnan B. J., Frankel A.D., Sharp P.A. 1990. HIV Tat protein trans-activates transcription *in vitro*. *Cell* **63**:791-802.
- Marrack P., Endres R., Shiminkevitz R., Zlotin A., Dialynas D., Fitch F., and Kappler J. 1983. The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. *J. Exp. Med.* **158**: 1077-1091.
- Marth J.D., Peet R., Krebs E.G., and Perlmutter R.M. 1985. A lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase is rearranged and overexpressed in the murine T cell lymphoma LSTRA. *Cell* **43**: 393-404.
- Matsuda Z., Chou M. J., Matsuda M., Huang J.H., Chen Y.M., Redfield R., Mayer K., Essex M., Lee T.H. 1988. Human immunodeficiency virus type 1 has an additional coding sequence in the central region of the genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:6968-6972.
- Matthews T.J., Langlois A.J., Robey W.G., Chang N.T., Gallo R.C., Fichinger P.J., and Bolognesi D.P. 1986. Restricted neutralisation of divergent human T-lymphotropic virus type III isolates by antibodies to the major envelope glycoprotein. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 9709-9713.
- Matthews T.J., Weinhold K. J., Lyerly H.K., Langlois A.J., Wigzell H., Bolognesi D.P. 1987. Interaction between the human T-cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: Role of carbohydrate in binding and cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5424-5428.
- McAdam S., Klenerman P., Tussey L., Rowland-Jones S., Lalloo D., Phillips R., Edwards A., Giangrande P., Leigh-brown A., Gotch F., and McMichael A. 1995. Immunogenetic HIV variant peptides that bind to HLA-B8 can fail to stimulate cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Immunol.* **155**: 2729-2736.
- McCormick F. 1993 Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* **363**:15-16.
- McCune J. 1995. Viral latency in HIV disease. *Cell* **82**: 183-188.
- McCune J.M., Rabin L.B., Feinberg M.B., Lieberman M., Kosek J.C., Reyes G.R., Weissman I.L., 1988. Endoproteolytic cleavage of gp 160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**:55-67.
- McKeating J.A., Gow J. , Goudsmit J., Pearl L.H., Mulder C., Weiss R.A. 1989. Characterization of HIV-1 neutralization escape mutants. *AIDS* **3**:777-784.
- McMichael A. 1998. Preparing for HIV vaccines that induce cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol* **10**:379-381.

- McMichael A. 1998. T cell responses and viral escape. *Cell* **93**: 673-676.
- McMichael, A. J., and R. E. Phillips. 1997. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Ann. Rev. Immunol.* **15**:271-296.
- Mege, D., Di Bartolo, V., Germain, V., Tuosto, L., Michel, F. and Acuto, O. 1996. Mutation of tyrosines 492/493 in the kinase domain of ZAP-70 affects multiple T-cell receptor signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **271**: 32644-32652.
- Meier, U.-C., Klenerman, P., Griffin, P., James, W., Koppe, B., Larder, B., McMichael, A.J. and Phillips, R. 1995. T cell receptor antagonism by variable human immunodeficiency viruses. *Science* **270**: 1360-1362.
- Merrifield R.B. 1963. Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide. *J. Amer. Chem. Soc.* **85** : 2149-2154.
- Mervis R.J., Ahmad N., Lillehoj E.P., Raum M.G., Salazar F.H.R., Chan H.W., and Venkatesan S. 1988. The gene gag products of human immunodeficiency virus type 1: alignment within the gag open reading frame, identification of posttranslational modifications, and evidence for alternative gag precursors. *J. Virol.* **62**: 3993-4002.
- Merzouki A., Patel P., Cassol S., O'Shaughnessy M., Gill J., Arella M. 1994. HIV-1 gp 120/160 expressing transfected cell clones to evaluate the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) during the course of HIV-1 infection. *J Virol. Meth.* **48**:9-22.
- Meyaard L., Kuiper H., Otto S.A., Wolthers K.C., van Lier R.A.W., and Miedema F. 1995. Evidence for intact costimulation via CD28 and CD27 molecules in hyporesponsive T cells from human immunodeficiency virus-infected individuals. *Eur. J. Immunol.* **25**: 232-237.
- Meyaard L., Otto S.A., Schuitemaker H., and Miedema F. 1992. Effect of HIV-1 Tat protein on human T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* **22**: 2729-2732.
- Meyaard L., Schuitemaker H., and Miedema F. 1993. T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function? *Immunol. Today* **14**: 161-164.
- Michael, N.L., Mo, T., Merzouki, A., O'Shaughnessy, M., Oster, C., Burke, D.S., Redfield, R.R., Birx, D.L. and Cassol, S.A. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 cellular RNA load and splicing patterns predict disease progression in a longitudinally studied cohort. *J. Virol.* **69**: 1868-1877.
- Migita, K., Eguchi, K., Kawabe, Y., Tsukada, T., Ichinose, Y. and Nagataki, S. 1995. Defective TCR signaling in anergic T cells. *J. Immunol.* **155**: 5083-5087.
- Mikloska, Z. and A. L. Cunningham. 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J. Gen. Virol.* **79**: 353-361.

Min, B., Legge, K.L., Pack, C. and Zaghouani, H. 1998. Neonatal exposure to a self-peptide-immunoglobulin chimera circumvents the use of adjuvant and confers resistance to autoimmune disease by a novel mechanism involving interleukin 4 lymph node deviation and interferon γ -mediated splenic anergy. *J. Exp. Med.* **188**: 2007-2017.

Minami, Y., and T. Taniguchi. 1995. IL-2 signaling: recruitment and activation of multiple protein tyrosine kinases by the components of the IL-2 receptor. *Curr Opin Cell Biol.* **7** : 156-162.

Minden A., Lin A., Claret F.X., Abo A., and Karin M. 1995. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**: 1147-1157.

Minden A., Lin A., McMahon M., et al. 1994a. Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science* **266**: 1719-1723.

Minden A., Lin A., Smeal T et al. 1994b. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6683-6688.

Modrow S., Hahn B.H., Shaw G.M., Gallo R.C., Wong-Staal F., Wolf H. 1987. Computer assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates : prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* **61** :570-578.

Molina J.M. 1993. Rôle des cytokines dans la régulation de l'expression du HIV. *Path. biol.* **41**: 777-780.

Molina T.J., Kishihara K., siderowski D.P., van Ewijk W., Narendan A., Timms E., Wakeham A., Paige C.J., Hartman K.-U., Veillette A., davidson D., and mak T.W. 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56Lck. *Nature* **357**: 161-164.

Mondino, A., C.D. Whaley., D.R. DeSilva., W. Li., M.K. Jenkins., and D.L. Mueller. 1996. Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expressio of c-Fos, Fos B, and JunB in anergic T helper 1 cells. *J.Immunol.* **157**: 2048-2057.

Montaner J.S., Reiss P., Cooper D., Vella S., Harris M., Conway B., Wainberg M.A., Smith D., Robinson P., Hall D., Myers M., and Lange J.M. 1998. A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for HIV-infected patients: the INCAS Trial. Italy, The Netherlands, canada and Australia Study. *J. Am. Med. Assoc.* **279**: 930-937.

Montano M.A., Kripke K., Norina C.D., Achacoso P., Herzenberg L.A., Roy A.L., and Nolan G.P. 1996. NF- κ B homodimer binding within the HIV-1 initiator region and interactions with TFII-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93** : 12376-12381.

Mordret G. 1993. MAP kinase kinase: A node connecting multiple pathways. *Biol. Cell.* **79**: 193-207.

- Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., and Coffman R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. *J. Immunol.* **136**: 2384-2357.
- Mous J., Heimer E.P., Le Grice S.F. 1988. Processing protease and reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 polyprotein in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **62**:1433-1436.
- Mueller D.L., Jenkins M.K., and Schwartz R.H. 1989. An accessory cell-derived costimulatory signal acts independently of protein kinase C activation to allow T cell proliferation and prevent the induction of unresponsiveness. *J. Immunol.* **138**: 3704-3712.
- Muesing M., Smith D., Cabradilla C., Benton C., Lasky L., and Capon D. 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**: 450-458.
- Murakami T., Hattori T., Takatsuki K. 1991. A principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 interacts with proteinase-like molecule(s) at the surface of Mole-4 clone 8 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**:279-284.
- Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., and Summers M.D. 1995. Virus Taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* **10**, Springer-Verlag, Wien.
- Mustelin T. 1994. T cell antigen receptor signaling: three families of tyrosine kinases and a phosphatase. *Immunity* **1**: 351-356.
- Mustelin T., and Burn P. 1993. Regulation of the src family tyrosine kinases in lymphocytes. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 215-220.
- Mustelin T., Coggeshall M.K., and Altman A. 1989. Rapid activation of the T cell tyrosine protein kinase pp56^{lck} by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 6302-6306.
- Mustelin T., Pessa-Morikawa T., Autero M., Gassman M., Gahmberg C.G., Andersson L.C., and Burn P. 1992. Regulation of the p59^{lyn} protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur. J. Immunol.* **22**: 1173-1178.
- Mustelin, T. 1994. T cell antigen receptor signaling: three families of tyrosine kinases and a phosphatase. *Immunity* **1**: 351-356.
- Mustelin, T., Coggeshall, K. M., Isakov, N. and Altman, A. 1990. Tyrosine phosphorylation is required for T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C. *Science* **247**: 1584-1587.
- Mustelin, T., S. Williams, P. Tailor, C. Couture, G. Zenner, P. Burn, J. D. Ashwell, and A. Altman. 1995. Regulation of the p70^{zap} tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur. J. Immunol.* **25**:942-946.

Myers G., Korber B., Jeang K.T., Henderson L., Wain-Hobson S., and Pavlakis G.N., eds. 1994. Human retroviruses and AIDS, 1994. Los Alamos, New Mexico: *Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos National Laboratory*.

Nabel G., and Baltimore D. 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**: 711-713.

Nada S., Okada M., MacAuley, A., Cooper J.A., and Nakagawa H. 1991. Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60^{c-src}. *Nature* **351**; 69-72.

Nagal, K., Wong, A.H-T., Li, S., Tam, N.W.N., Cuddihy, A.R., Sonenberg, N., Mathews, M.B., Hiscott, J., Wainberg, M. and Koromilas, A.E. 1997. Induction of CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication by mutants of the interferon-inducible protein kinase PKR. *J. Virol.* **71**: 1718-1725.

Nara P. Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases, pages, journal et maison d'édition 1991.

Nara P.L., Smit L., Dunlop N., Hatch W., Merges M., Waters D., Kelliher J., Gallo R.C., Fischinger P.G., Goudsmit J. 1990. Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIIB infection of chimpanzees. *J. Virol.* **64**:3779-3791.

Navia M.A., Fitzgerald P.M., McKeever B.M., Leu C.T., Heimbach J.C., Herber W.K., Sigal I.S., Darke P.L., Springer J.P., 1989. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**:615-620.

Nel A.E., Hanekom C., and Hultin L. 1991. Protein kinase C plays a role in the induction of tyrosine phosphorylation of lymphoid microtubule-associated protein-2 kinase. *J. Immunol.* **147**: 1933-1939.

Neumeister E.N., Zhu Y., Richard S., Terhorst C., Chan A.C., and Shaw A.S. 1995. Binding of zap-70 to phosphorylated T-cell receptor ζ and η enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3171-3178.

Neumeister Kersh, E., Shaw, A.S. and Allen, P. 1998. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor ζ phosphorylation. *Science* **281**: 572-575.

NIH Publication, No. 94-1536. 1994. AIDS research and reference Reagent Program Catalog.

Nixon D.F., Townsend A.R., Elvin J.G., Rizza L.R., Gallwey J., McMichael A.J. 1988. HIV-I gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature* **336**:484-487.

Noh D.Y., Shin S.H., and Rhee S.G. 1995. Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1242**: 99-113.

Nolan G.P., Ghosh S., Liou H.C., Tempst P., Baltimore D. 1991. DNA binding and I κ B inhibition of the cloned p65 subunit of NF- κ B, rel-related polypeptide. *Cell* **65**:961-969.

Northrop J.P., Ho S.N., Chen L., Thomas D.J., Timmerman L.A., Nolan G.P., Admon A., and Crabtree G.R. 1994. NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature.* **369**: 497-502.

Nunès J.A., Collette Y., Truneh A., Olive D., and Cantrell D.A. 1994. The role of p21^{ras} in CD28 signal transduction: triggering of CD28 antibodies, but not the ligand B7-1, activates p21^{ras}. *J. Exp. Med.* **180**: 1067-1076.

Nutt R.F., Brady S.F., Darke P.L., Ciccarone T.M., Colton C.D., Nutt E.M., Rodkey J.A., Bennett C.D., Waxman L.H., Sigal I.S., *et al.*, 1988. Chemical synthesis and enzymatic activity of a 99-residue peptide with a sequence proposed for the human immunodeficiency virus protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7129-7133.

O'Brien W.A., Koyanagi Y., Namazie A., Zhao J.Q., Diagne A., Idler K., Zack J.A., Chen I.S. 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* **348**: 69-73.

Odum N., Ledbetter J.A., Skindhoj P., Dickmeiss E., and Svejgaard A. 1992. *VIII Int. Conf. AIDS II, PoA 2395* (Abstr.).

Oetken C., Couture C., Bergman M., Bonnefoy-Bérard N., Williams S., Alitalo K., burn P., and Mustelin T. 1994. TCR/CD3 triggering causes increased activity of the p50^{csk} tyrosine kinase and engagement of its SH2 domain. *Oncogene* **9**; 1625-1631.

O'Hehir R.E., Yssel H., Verma S., de Vries J., Spits H., and Lamb J.R. 1991. Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced T cell anergy. *Int. Immunol.* **3**: 819-826.

Ojo-Amaize E.A., Nishanian P., Keith D.E. Jr., Houghton R.L., Heitjan D.F., Fahey J.L., Giorgi J.V., 1987. Antibodies to human immunodeficiency virus in human sera induce cell-mediated lysis of human immunodeficiency virus-infected cells. *J. Immunol.* **139**:2458-2463.

Okayama H., and Berg P. 1983. A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 280-289.

Olshevsky U., Helseth E., Furman C., Li J., Haseltine W.A., Sodroski J. 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acid important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* **64**:5701-5707.

Olson, R.R., Reuter, J.J., McNicholl, J., Alber, C., Klohe, E., Callahan, K., Siliciano, R.F. and Karr, R.W. 1994. Acidic residues in the DR β chain third hypervariable region are

required for stimulation of a DR(α , β 1*0402)-restricted T-cell clone. *Hum. immunol.* **41**: 193-200.

Orentas, R. J., J. E. Hildreth, E. Obah, M. Ploydefkis, G. E. Smith, M. L. Clements, and R. F. Siliciano. 1990. Induction of CD4⁺ human cytolytic T cells specific for HIV-infected cells by a gp160 subunit vaccine. *Science* **248**:1234-1237.

Orloff D.G., Frank S.J., Robey F.A., Weissman A.M., and Klausner R.D. 1989. Biochemical characterization of the η chain of the T-cell receptor: A unique subunit related to ζ . *J. Biol. Chem.* **264**: 14812-14817.

Orloff D.G., Ra C., Frank S.J., Klausner R.D., and Kinet J-P. 1990. Family of disulphide-linked dimers containing ζ and η chains of the T-cell receptor and the γ chain of Fc receptors. *Nature* **347**: 189-191.

Ostergaard H.L., Shackelford D.A., Hurley T.R., Johnson P., Hyman R., Sefton B.M., and Trowbridge I.S. 1989. Expression of CD45 alters phosphorylation of the lck-encoded tyrosine protein kinase in murine lymphoma T-cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8959-8963.

Oth D, Mercier G, Perrin P, Joffret ML, Sureau P, Thibodeau L. 1987. The association of the rabies glycoprotein with liposome (immunosome) induces an in vitro specific release of interleukin 2. *Cell Immunol.* **108**:220-226.

Otten, G.R. and Germain, R.N. 1991. Split anergy in a CD8⁺ T cell: Receptor-dependent cytotoxicity in the absence of interleukin-2 production. *Nature* **251**: 1228-1231.

Ozel M., Pauli G., Gelderblom H.R. 1988. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* **100**:255-266.

Pages F., Ragueneau M., Rottapel R., Truneh A., Nunes J., Imbert J., and Olive D. 1994. Binding of phosphatidylinositol-2-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. *Nature* **369**: 327-329.

Pal R., Reitz M. S. Jr., Tschachler E., Gallo R.C., Sarngadharan M.G., Veronese F.D. 1990. Myristylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:721-730.

Palker T.J., Clark M.E., Langlois A.J., Matthew T.J., Weinhold K.J., Randall R.R., Bolognesi D.P., Haynes B.F. 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1932-1936.

Pantaleo G., DeMaria A., Koenig S, Butini L, Moss B, Baseler M, Lane HC, Fauci AS. 1990. CD8⁺ T lymphocytes of patients with AIDS maintain normal broad cytolytic function despite the loss of human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4818-4822.

- Pantaleo G., Graziosi C., and Fauci A.S. 1993a. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Eng. J. Med.* **328**: 327-335.
- Pantaleo G., Graziosi C., Demarest J.F., Butini L., Montroni M., Fox C.H., Orenstein J.M., Kotler D.P., and Fauci A.S. 1993b. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during clinically latent stage of disease. *Nature* **362**: 355-359.
- Pantaleo, G., Demarest, J.F., Soudeyns, H., Graziosi, C., Denis, F., Adelsberger, J.W., Borrow, P., Saag, M.S., Shaw, G.M., Sekaly, R.P. and Fauci, A.S. 1994. Major expansion of CD8⁺ T cells with a predominant V β usage during the primary immune response to HIV. *Nature* **370**: 463-467.
- Parker P. 1995. Intracellular signalling. PI3-kinase puts GTP on the Rac. *Curr. Biol.* **5**: 577-579.
- Parnes J.R. 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol.* **44**: 265-311.
- Partanen J., Armstrong E., Bergman M., Mäkelä T.P., Hirvonen H., Huebner K., and Alitalo K. 1991. *Cyl* encodes a putative cytoplasmic tyrosine kinase lacking the conserved tyrosine autophosphorylation site (Y416^{src}). *Oncogene* **6**: 2013-2018.
- Patterson S., Knight S.C. 1987. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* **68**:1177-1181.
- Peeters M., Gershy-Damet C.-Y., Fransen K., Koffi K., Coulibaly M., Delaporte E., Piot P., van der Groen. 1992. Virological and polymerase chain reaction studies of HIV-1/HIV-2 dual infection in Cote d'Ivoire. *Lancet* **340**: 339-340.
- Pelech S.L., and Sanghera J.S. 1992. MAp kinases: Charting the regulatory pathways. *Science* **257**: 1355-1356.
- Perez L.G., O'Donnell M.A., Stephens E.B. 1992. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J. Virol.* **66**:4134-4143.
- Petit A.J.C., Tersmette M., Terpstra F.G., et al. 1988. Decreased accessory cell function by human monocytic cells after infection with HIV. *J. Immunol.* **140**: 1485-1489.
- Phillips D.M., Tan X., Perotti M.E., and Zacharopoulos V.R. 1998. Mechanism of monocyte-macrophage-mediated transmission of HIV. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **14**: S67-S70.
- Phillips, R.E., Rowland-Jones, S., Nixon, D.F., Gotch, F.M., Edwards, J.P., Ogunlesi, A.O., Elvin, J.G., Rothbard, J.A., Bangham, C.R.M., Rizza, C.R. and McMichael, A.J. 1991. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**: 453-459.

- Pietrella D., Monari C., Retini C., Palazzetti B., Bistoni F., and Vecchiarelli A. 1998. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 impairs intracellular antifungal mechanisms in human monocytes. *J. infect. Dis.* **177**: 347-354.
- Plas D.R., Johnson R., Pingel J.T., Matthews R.J., Dalton M., Roy G., Chan A.C., and Thomas M. 1996. Direct regulation of Zap-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* **272**: 1173-1176.
- Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debre P. 1987. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* **328**:348-351.
- Polydefkis, M., Koenig, S., Flexner, C., Obah, E., Gebo, K., Chakrabarti, S., Earl, P.L., Moss, B. and Siliciano, R.F. 1990. Anchor sequence-dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4⁺ T cell recognition. *J. Exp. Med.* **171**: 875-887.
- Pomerance M., Schweighoffer F., Tocque B., and Pierre M. 1992. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by oncogenic Ras p21 in *Xenopus* oocytes: Requirement for Ras p21-GTPase-activating protein interaction. *J. Biol. Chem.* **267**: 16155-16160.
- Pope, M., Betjes, M.G., Romani, N., Hirmand, H., Cameron, P.U., Hoffman, L., Gezelter, S., Schuler, G. and Steinman, R.M. 1994. Conjugates of dendritic cells and memory lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* **78**: 389-398.
- Prasad K.V., Cai Y.C., Raab M., Duckworth B., Cantley L., Shoelson S.E., and Rudd C.E. 1994. T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(p)-Met-Xaa-Met motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2834-2838.
- Preckel T, Hellwig S, Pflugfelder U, Lappin MB, Weltzien HU. 2001. Clonal anergy induced in a CD8⁺ hapten-specific cytotoxic T-cell clone by an altered hapten-peptide ligand. *Immunology* **102**:8-14.
- Preckel, T., Grimm, R., Martin, S. and Weltzien, H.U. 1997. Altered hapten ligands antagonize trinitrophenyl-specific cytotoxic T cells and block internalization of hapten-specific receptors. *J. Exp. Med.* **185**: 1803-1813.
- Premack B.A., Schall T.J. 1996. Chemokines receptors: gateways to inflammation and infection. *Nature Med.* **2**: 1174-1178.
- Preston B.D., Poiesz B.J., Loeb L.A. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**:1168-1171.
- Price, D. L., P. J. Goulder, P. Klenerman, A. K. Sewell, P. J. Easterbrook, M. Troop, C. R. Bangham, and R. E. Phillips. 1997. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:1890-1895.

Prince H.E., Moody D.J., Shubin B.I., and Fahey J.L., 1985. Defective monocyte function in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) : evidence from a monocyte-dependent T cell proliferation system. *J. Clin. Immunol.* **5**: 21-25.

Purbhoo, M.A., Sewell, A.K., Klenerman, P., Goulder, P.J., Hilyard, K.L., Bell, J.I., Jakobsen, B.K. and Phillips, R.E, 1998. Copresentation of natural HIV-1 agonist and antagonist ligands fails to induce the T cell receptor signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4527-4532.

Purcell D.F., and Martin M.A. 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67** : 6365-6378.

Putney S.D., Matthews T. J., Robey W.G., Lynn D.L., Robert-Guroff M., Mueller W.T., Langois A.J., Ghayeb J., Petteway S.R. Jr., Weinhold K.J. 1986. HTLV-III/LAV-neutralization antibodies to an *E. coli*-produced fragment of the virus envelope. *Science* **234**: 1392-1395.

Qian D., and Weiss a. 1997. T cell antigen receptor signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**: 205-212.

Qian J., Bours V., Manischewitz J., Blackburn R., Siebenlist U., Golding H. 1994. Chemically selected subclones of the CEM cell line demonstrate resistance to HIV-1 infection resulting from a selective loss of NF- κ B DNA binding proteins. *J. Immunol.* **152**:4183-4191.

Quill H., Bhandoola A., Trinchieri G., Haluskey J., and Pritt D. 1994. Induction of interleukin 12 responsiveness is impaired in anergic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **179**: 1065-1070.

Quill, H., and R. H. Schwartz. 1987. Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes : specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J. Immunol.* **138**: 3704- 3712.

Quill, H., M.P. Riley., E.A.Cho, J.E. Casnellie., J.C. Reed., T. Torigoe. 1992. Anergic Th1 cells express altered levels of the protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *J. Immunol.* **149**: 2887-2893.

Raab M., Cai Y-C., Bunnell S.C., Heyeck S.D., Berg L.J. and Rudd C.E. 1995. p56^{lck} and p59^{fyn} regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: Implications for T-cell costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 8891-8895.

Raab, M., A. J. da Silva, P. R. Findell, and C. E. Rudd. 1997. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR ζ /CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* **6**:155-164.

Rabinowitz, J.D., Beeson, C., Wulfig, C., Tate, K., Allen, P.M., Davis, M.M. and McConnell, H.M. 1996. Altered T cell receptor ligands trigger a subset of early T cell signals. *Immunity* **5**: 125-135.

Racioppi L., Ronchese F., Matis L.A., and Germain R.N. 1993. Peptide-major histocompatibility complex and class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. *J. exp. Med.* **177**: 1047-1060.

Raingeaud J., Whitmarsh T., Barrett B., Derijard B., and Davis R.J. 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* **16** : 1247.

Rammensee H-G., Kroschewski R., and Frangoulis B. 1989. Clonal anergy induced in mature V beta 6⁺ T lymphocytes on immunizing Mls-1^b mice with Mls-1^a expressing cells. *Nature (Lond.)*. **339**: 541-544.

Rao A. 1994. NF-ATp: A transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol. Today* **15**: 274-281.

Rayter S.I., Woodrow M., Lucas S.C., Cantrell D., and Downward J. 1992. p21^{ras} mediates control of IL-2 gene promoter function in T cell activation. *EMBO J.* **11**: 4549-4556.

Redfield R.R., Birx D.L., Ketter N., Tramont E., Polonis V., Davis C., Brundage J.F., Smith G., Johnson S., and Fowler A. 1991. A phase I evaluation of the safety and immunogenicity of vaccination with recombinant gp160 in patients with early human immunodeficiency virus infection. Military Medical Consortium For Applied Retroviral research. *N. Eng. J. Med.* **324**: 1677-1684.

Reedquist, K.A. and Bos, J.L. 1998. Costimulation through CD28 suppresses T cell receptor-dependent activation of the Ras-like small GTPase Rap1 in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 4944-4949.

Reid S.W., McAdam S., Smith K.J., Klenerman P., O'Callaghan C.A., Harlos K., Jakobsen B.K., McMichael A.J., Bell J.I., Stuart D.I., and Jones E.Y. 1996. Antagonist HIV-1 Gag peptides induce structural changes in HLA B8. *J. Exp. Med.* **184**: 2279-2286.

Rellahan B.L., Jones L.A., Kruisbeek A.M., Fry A.M., and Matis L.A. 1991. In vivo induction of anergy in peripheral Vβ 8⁺ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J. Exp. Med.* **172**: 1091-1100.

Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* **388**:383-384.

Riviere Y., Tanneau-Salvadori F., Regnault A., Lopez O, Sansonetti P, Guy B, Kieny MP, Fournel JJ, Montagnier L., 1989. Human immunodeficiency virus-specific cytotoxic responses of seropositive individuals: Distinct types of effector cells mediate killing of targets expressing gag and env proteins. *J. Virol.* **63**:2270-2277.

- Robbins D.J., Cheng M., Zhen E., Vanderbilt C.A., Feig L.A., and Cobb M.H. 1992. Evidence for Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6924-6928.
- Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-1173.
- Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171-1173.
- Robey W.G. Safai B., Oroszlan S., Arthur LO, Gonda MA, Gallo RC, Fischinger PJ., 1985. Characterization of envelope and core structural gene products of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* **228**:593-595.
- Rocha B., Grandien A., and Freitas A.A. 1995. Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **181**: 993-1003.
- Rodriguez-Viciana P., Warne P.H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M.J., Waterfield M.D., and Downward J. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**: 527-532.
- Romeo, C., Amiot, M., and Seed, B. 1992. Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor ζ chain. *Cell* **68**: 889-897.
- Rook A.H., Lane H. C., Folks T., McCoy S, Alter H, Fauci AS., 1987. Sera from HTLV-III/LAV antibody-positive individuals mediate antibody-dependant cellular cytotoxicity against HTLV-III/LAV infected T cells. *J. Immunol.* **138**:1064-1067.
- Rosen C.A., Sodroski J. G., Haseltine W.A. 1985. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* **41**:813-823.
- Rosen C.A., Terwilliger E. , Dayton A., Sodroski J.G., Haseltine W.A., 1988. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2071-2075.
- Rosenberg E.S., Billingsley J.M., Caliendo A.M., Boswell S.L., Sax P.E., Kalams S.A., and Walker B.D. 1997. Vigorous HIV-1 specific CD4⁺ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**: 1447-1450.
- Rosenberg Z.F., and Fauci A.S. 1991. Immunopathogenesis of HIV infection. *FASEB J.* **5**: 2382-2390.
- Rothbard.J. 1986. Peptides and the cellular immune response. *Annu. Int. Past.* **137E**: 518-526.
- Roy S., Parkin N. T., Rosen C, Itovitch J, Sonenberg N. 1990. Structural requirements for trans-activation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-directed gene

expression by tat: Importance of base pairing, loop sequence, and bulges in the tat-responsive sequence. *J. Virol.* **64**:1402-1406.

Rucker J., and Doms R.W. 1998. Chemokine receptors as HIV coreceptors: implications and interactions. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**: S-241-S-246.

Rudd C.E. 1999. Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* **96**: 5-8.

Rudd C.E., Janssen O., Cai Y-C., da Silva A.J., Raab M., and Prasad K.V.S. 1994. Two-step TCR/CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. *Immunol. Today* **15**: 225-234.

Rudd C.E., Trevillyan J.M., dasgupta J.D., Wong L.L., and Schlossman S.F. 1988. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5190-5194.

Rudd, C. E. 1996. Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* **4**: 527-534.

Rusche J.R., Javaherian K., McDanal C., Petro J., Lynn D.L., Grimaila R., Langlois A., Gallo R.C., Arthur L.O., Fischinger P.S., Bolognesi D.P., Putney S.D., Matthews T.J. 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3198-3202.

Saag M.S., Hahn B. H., Gibbons J., Li Y, Parks ES, Parks WP, Shaw GM., 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 *in vivo*. *Nature* **334**:440-444.

Sabatier J.-M., Vives E., Mabrouk K., Benjouad A., Rochat H., Duval A., Hue B., Bahraoui E. 1991. Evidence for neurotoxic activity of *tat* from human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **65**:961-967.

Salojin, K. V., J. Zhang, J. Madrenas, and T. L. Delovitch. 1998. T-cell anergy and altered T-cell receptor signaling: effects on autoimmune disease. *Immunol. Today* **19**:468-473.

Samelson L.E., Fletcher M.C., Ledbetter J.A., and June C.H. 1990. Activation of tyrosine phosphorylation in human T cells via the Cd2 pathway. Regulation via the CD45 tyrosine phosphatase. *J. immunol.* **145**: 2448-2454.

Samelson L.E., Phillips A.F., Luong e.T., and Klausner R.D. 1990. Association of the *fyn* protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4358-4362.

Samelson, L. E., Harford, J. B. and Klausner, R. D. 1985. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* **43**: 223-231.

Samelson, L. E., M. D. Patel, A. M. Weissman, J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1986. antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor. *Cell* **46**: 1083- 1090.

Sanchez, I., R. T. Hughes, B.J. Mayer, K. Yee, J.W. Woodgett, J. Avruch, J. M. Kyriakis, and L.I. Zon. 1994. Role of SAPK/ERK kinase in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature (Lond.)* **372**: 794-798.

Sarosi G.P., Thomas P.M., Egerton M., Phillips A.F., Kim K.W., Bonvini E., and Samelson L.E. 1992. Characterization of the T cell antigen receptor-p60fyn protein tyrosine kinase association by chemical cross-linking. *Int. Immunol.* **4** : 1211-1217.

Sattentau Q.J., Moore J.P. 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* **174**:407-415.

Saxena M, Williams S, Brockdorff J, Gilman J, Mustelin T. 1999. Inhibition of T cell signaling by mitogen-activated protein kinase-targeted hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP). *J Biol Chem.* **274**:11693-11700.

Schneider H., Cai Y-C., Prasad K.V.S., Schoelson S.E., and Rudd C.E. 1995. T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21^{ras}. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1044-1050.

Schnittman S.M., Fauci A.S., Psallidopoulos M.C., Lane H.C., Thompson L., Baseler M., Massari F., Fox C.H., Salzman N.P., and Fauci A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**: 305-308.

Schnittman S.M., Greenhouse J.J., Psallidopoulos M.C., Lane M., Baseler H.C., Salzman N.P., and Fauci A.S. 1990. Increasing viral burden in CD4⁺ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann. Int. Med.* **113**: 438-443.

Schols D., and DeClercq E. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces anergy in human peripheral blood lymphocytes by inducing interleukin-10 production. *J. Virol.* **70**: 4953-4960.

Schreiber S.L., and Crabtree G.R. 1992. The mechanism of action of cyclosporin A and FK 506. *Immunol. Today* **13**: 136-142.

Schuitmaker H., Kootstra N.A., Koppelman M.H.G.M et al. 1992. Proliferation-dependent HIV-1 infection of monocytes occurs during differentiation into macrophages. *J. Clin. Invest.* **89**: 1154-1160.

Schwartz S., Felber B.K., and Pavlakis G.N. 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* **183** : 677-686.

Schwartz S., Felber B.K., Benko D.M, Fenyo EM, Pavlakis GN. 1990a. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **64**:2519-2529.

- Schwartz S., Felber B.K., Fenyö E.M., and Pavlakis G.N. 1990b. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* **64**: 5448-5456.
- Schwartz, O., V. Maréchal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J.-M. Heard. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**:338-342.
- Schwartz, R. H. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* **248**: 1349-1356.
- Schwartz, R. H. 1996. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* **184**: 1-8.
- Schwartz, R. H. 1997. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol.* **9** : 351-357.
- Secrist J.P., Karnitz L., and Abraham R.T. 1991. T-cell antigen receptor ligation induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *J. Biol. Chem.* **266**: 12135-12139.
- Seger R., and Krebs E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**: 726-735.
- Selin, L.K. and Welsh, R.M. 1994. Specificity and editing by apoptosis of virus-induced cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Opin. immunol.* **6**: 553-559.
- Semba K., Nishizawa M., Miyajima N., Yoshida M.C., sukegawa J., Yamanishi Y., Sasaki M., Yamamoto T., and Toyoshima K. 1986. *Yes*-related protooncogene, *syn*, belongs to the protein-tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5459-5463.
- Serfling E., Barthelmäs R., Pfeuffer I., Schenk B., Zarius S., Swoboda R., Mercurio F., and Karin M. 1989. Ubiquitous and lymphocyte-specific factors are involved in the induction of the mouse interleukin 2 gene in T lymphocytes. *EMBO J.* **8**: 465-473.
- Serfling, E., Avots, A. and Neumann, M. 1995. The architecture of the IL-2 promotor: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1263**: 181-200.
- Sewell, A.K., Harcourt, G.C., Goulder, P.J., Price, D.A. and Phillips, R.E. 1997. Antagonism of cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis by natural HIV-1 altered peptide ligands requires simultaneous presentation of agonist and antagonist peptides. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2323-2329.
- Shaw A.S., Amrein K.E., Hammond C., Stern D.F., Sefton B.M., and Rose J.K. 1989. The *lck* tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* **59**: 627-636.
- Shaw A.S., Chalupny J., Whitney J.A., Hammond C., Amrein K.E., Kavathas P., Sefton B.M., and Rose J.K. 1990. Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56^{*lck*} tyrosine protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1853-1862.

Shaw, A. S., and M. L. Dustin. 1997. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* **6**: 361-369.

Sher A., Gazzinelli R.T., Oswald I.P., Clerici M., Kullberg M., Pearce E.J., Berzofsky J.A., Mosmann T.R., James S.L., Morse III H.C., Shearer G.M. 1992. Role of T cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol. Rev.* **127**:183-204.

Shirai M, Akatsuka T, Pendleton CD, Houghten R, Wychowski C, Mihalik K, Feinstone S, Berzofsky JA. 1992. Induction of cytotoxic T cells to a cross-reactive epitope in the hepatitis C virus nonstructural RNA polymerase-like protein. *J Virol.* **66**:4098-4106.

Siliciano, R.F., Lawton, T., Knall, C., Karr, R.W., Berman, P., Gregory, T., and Reinherz, E.L. 1988. Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: Effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4⁺ T cell depletion. *Cell* **54**: 561-575.

Sloan-Lancaster J., Evavold B.D. and Allen P.M. 1994. Th2 cell clonal anergy as a consequence of partial activation. *J. Exp. Med.* **180**: 1195-1205.

Sloan-Lancaster, J., and P.M. Allen. 1996. Altered peptide ligand-induced partial T cell activation: molecular mechanisms and role in T cell biology. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:1-27.

Sloan-Lancaster, J., Evavold, B.D. and Allen, P.M. 1993. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* **363**: 156-159.

Sloan-Lancaster, J., Shaw, A.S., Rothbard, J.B. and Allen, P.M. 1994. Partial T cell signaling: altered phospho- ζ and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* **79**: 913-922.

Sloan-Lancaster, J., Steinberg, T.H. and Allen, P.M. 1996. Selective activation of the calcium signaling pathway by altered peptide ligands. *J. Exp. Med.* **184**: 1525-1530.

Sluss H.K., Barrett T., Derijard B., and Davis R.J. 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 8376-8384.

Smyth, L.A., Williams, O., Huby, R.D.J., Norton, T., Acuto, O., Ley, S.C. and Kioussis, D. 1998. Altered peptide ligands induce quantitatively but not qualitatively different intracellular signals in primary thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8193-8198.

Sodroski J., Goh W. C., Rosen C., Dayton A, Terwilliger E, Haseltine W., 1986. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* **321**:412-417.

Spira, A.I., Marx, P.A., Patterson, B.K., Mahoney, J., Koup, R.A., Wolinski, S.M. and 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.

Sredni B., Tse H.Y., and Schwartz R.H. 1980. Direct cloning and extended culture of antigen-specific MHC-restricted proliferating T lymphocytes. *Nature* **283**: 581-583.

Starcich B.R, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, et al. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.

Stein B.S, Engleman E.G. 1990. Intracellular processing of gp160 HIV-1 envelope precursors. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **265**:2640-2649.

Stein BS., Gowda SD. , Lifson J., Penhallow RC, Bensch KG, Engleman EG., 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**: 659-668.

Stephens L.R., Jackson T.R., and Hawkins P.T. 1993. Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate: A new intracellular signalling system? *Biochim. Biophys. Acta.* **1179**: 27-75.

Strauss D.B., and weiss A. 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* **70**: 585-593.

Strebel K., Klimkait T. , Martin M.A. 1988. A novel gene of HIV-1, *vpu* and its 16 kilodalton product. *Science* **241**:1221-1223.

Su B., and Karin M. 1996. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 402-411.

Su B., Jacinto E., Hibi M., Kalluniki T., Karin M., and Ben-Neriah Y. 1994. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* **77**: 727-736.

Sun N.-C., Ho D. D., Sun C.R.Y., Liou RS, Gordon W, Fung MS, Li XL, Ting RC, Lee TH, Chang NT, et al., 1989. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the putative CD4-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **63** : 3579-3585.

Sundstedt, A. and Dohlsten, M. 1998. In vivo anergized CD4⁺ T cells have defective expression and function of the activating protein-1 transcription factor. *J. Immunol.* **161**: 5930-5936.

Sundstedt, A., Sigvardsson, M., Leanderson, T., Hedlund, G., Kalland, T. and Dohlsten, M. 1996. In vivo anergized CD4⁺ T cells express perturbed AP-1 and NF-kB transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 979-984.

Swain S.L. 1983. T cell subsets and the recognition of MHC class. *Immunol. Rev.* **74**: 129-142.

- Szamel M, Resch K. 1995. T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways-activation and function of protein kinases C in T lymphocytes. *Eur J Biochem* **228**:1-15.
- Taams L.S., van Eden W., and Wauben M.H.M. 1999. Dose-dependent induction of distinct anergic phenotypes: multiple levels of T cell anergy. *J. Immunol.* **162**: 1974-1981.
- Taga K., Mostowski H., and Tosato G. 1993. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* **81**: 2964-2971.
- Takahashi H., Nakagawa Y., Leggatt G.R., Ishida Y., Saito T., Yokomuro K., and Berzofsky J.A. 1996. Inactivation of human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by free antigenic peptide: a self-veto mechanism? *J. Exp. Med.* **183**: 879-889.
- Takeuchi Y., Nagumo T., Hoshino H. 1988. Low fidelity of cell-free DNA synthesis by reverse transcriptase of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **62**:3900-3902.
- Tan P., Anasetti C., Hansen J.A., Melrose J., Brunvand M., Bradshaw J., Ledbetter J.A., and Linsley P.S. 1993. Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J. Exp. Med.* **177**: 165-173.
- Tang, B., Myers, L.K., Rosloneic, E.F., Whittington, K.B., Stuart, J.M. and Kang, A.H. 1998. Characterization of signal transduction through the TCR- ζ chain following T cell stimulation with analogue peptides of type II collagen 260-267. *J. Immunol.* **160**: 3135-3142.
- Taniguchi T., Kobayashi T., Kondo J., Takahashi K., Nakamura H., Suzuki J., Nagai K., Yamada T., Nakamura S., and Yamamura H. 1991. Molecular cloning of a porcine gene *syk* that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *J. Biol. Chem.* **266**: 15790-15796.
- Tateno M., Gonzalez-Scarano F., Levy J.A. 1989. The human immunodeficiency virus can infect CD4-negative fibroblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4287-4290.
- Telander, D. G., E.-K. Malvey, and D. L. Mueller. 1999. Evidence for repression of IL-2 gene activation in anergic T cells. *J. Immunol.* **162**:1460-1465.
- Terpstra F.G., Al B.J.M., Roos M.Th.L., et al. 1989. Longitudinal study of leukocyte functions in homosexual men seroconverted for HIV: rapid and persistent loss of B cell function after HIV infection. *Eur. J. Immunol.* **19**: 667-673.
- Thome M., Duplay P., Guttinger M., and Acuto O. 1995. Syk and Zap-70 mediate recruitment of p56lck/CD4 to the activated T cell receptor/CD3/ ζ complex. *J. Exp. Med.* **181**: 1997-2006.
- Thompson C. B., Wang C-Y., Ho. I-C., Bohjanen P.R., Petryniak B., June C.H., Miesfeldt S., Zhang L., Nabel G.J., Karpinski B., and Leiden J.M. 1992. *cis*- Acting sequences required for

inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol. Cell Biol.* **12**: 1043-1053.

Thompson C.B., and Allison J.P. 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* **7**: 445-450.

Tindall B., and Cooper D.A. 1991. Primary HIV infection: Host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**: 1-14.

Toohy M.G., and Jones K.A. 1989. In vitro formation of Short RNA Polymerase II transcripts that terminate within the HIV-1 and HIV-2 promoter-proximal downstream regions. *Genes and development.* **3** : 265-282.

Tournier C., Whitmarsh A.J., Cavanagh J., Barrett T., and Davis R.J. 1997. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 7337-7342.

Tripp R.A., Hou S., McMickle A., Houston J., Doherty P.C. 1995. Recruitment and proliferation of CD8⁺ T cells in respiratory virus infection. *J. Immunol.* **154**: 6013-6021.

Tritch R.J., Cheng Y.E., Yin F.H., Erickson-Viitanen S. 1991. Mutagenesis of protease cleavage sites in the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein. *J. Virol.* **65**:922-930.

Trono D. 1995. HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell* **82**: 189-192.

Tsygankov A.Y., Bröker B.M., Fagnoli J., Ledbetter J.A., and Bolen J.B. 1992. *J. Biol. Chem.* **267**: 18259-18262.

Turner J.M., Brodsky M.H., Irving B.A., Levin S.D., Perlmutter R.M., and Littman D.R. 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56^{lck} with the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cystein motifs. *Cell* **60**: 755-765.

Tyler D.S., Lyerly H. K., Weinhold K.J. 1989. Anti-HIV-1 ADCC. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **5**:557-563.

Ueda Y., Levine B., Freeman G.J., Nadler L.M., June C.H., and Ward S.G. 1995. Both CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) activate phosphatidylinositol 3-kinase, and wortmannin revealed heterogeneity in the regulation of T cell IL-2 secretion. *Int. Immunol.* **7**: 957-966.

Valitutti, S., Muller, S., Cella, M., Padovan, E. and Lanza-vecchia A. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**:148-151.

- Van Oers N.S.C., Killeen N., and Weiss A. 1994. Zap-70 is constitutively associated with tyrosine phosphorylated TCR ζ in murine thymocytes and lymph nodes T cells. *Immunity* **1**: 675-685.
- Van Oers, N. S. C., N. Killeen, and A. Weiss. 1996. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* **183**:1053-1062.
- Varmus H. 1988. Retroviruses. *Science* **240**:1427-1435.
- Veillette A., Bookman M.A., Horak E.M and Bolen J.B. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell* **55**: 301-308.
- Veillette A., Sleckman B.P., Ratnofsky S., Bolen J.B., and Burakoff S.J. 1990. The cytoplasmic domain of CD4 is required for stable association with the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56^{lck}. *Eur. J. Immunol.* **20**: 1397-1400.
- Vignali D.A.A., and Strominger J.L. 1994. Amino acid residues that flank core peptide epitopes and the extracellular domains of CD4 modulate differential signaling through the T cell receptor. *J. Exp. Med.* **179**: 1945-1956.
- Voronova A.F., and Sefton B.M. 1986. Expression of a new protein tyrosine kinase is stimulated by retrovirus promoter insertion. *Nature* **319**: 682-684.
- Walker B.D., Chakrabarti S. , Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MJ, Schooley RT. 1987. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* **328**:345-348.
- Walker B.D., Plata F. 1990. Cytotoxic T lymphocytes against HIV. *AIDS* **4**:177-184.
- Wang, C. and G. A. Splitter. 1998. CD4⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity against macrophages pulsed with bovine herpes virus 1 polypeptides. *J. Virol.* **72**:7040-7047.
- Wange R.L., Guitian R., Isakov N., Watts J.D., Aebersold R., and Samelson L.E. 1995a. Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of Zap-70. *J. Biol. Chem.* **270**: 18730-18733.
- Wange R.L., Isakov N., Burke Jr., T.R., Otaka A., Roller P.P., Watts J.D., Aebersold R., and Samelson L.E. 1995b. F₂(Pmp)₂-TAM ζ 3, a novel competitive inhibitor of the binding of zap-70 to the T cell antigen receptor, blocks early T cell signaling. *J. Biol. Chem.* **270**: 944-948.
- Ward S.G. CD28: a signalling perspective. 1996. *Biochem. J.* **318**: 361-377.
- Ward S.G., June C.H., and Olive D. 1996. PI3-kinase: A pivotal pathway in T cell activation? *Immunol. Today* **17**: 187-197.

- Ward S.G., Westwisck J., Hall N.D., and Sansom D.M. 1993. Ligation of CD28 receptor by B7 induces formation of D-3 phosphoinositides in T lymphocytes independently of T cell receptor/CD3 activation. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2572-2577.
- Wardenburg, J. B., C. Fu, J. K. Jackman, H. Flotow, S. E. Wilkinson, D. H. Williams, R. Johnson, G. Kong, A. C. Chan, and P. R. Findell. 1996. Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein- tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J. Biol. Chem.* **271**:19641-19644.
- Watts J.D., Affolter M., Krebs D.L., Wange R.L., Samelson L.E., and Aebersold R. 1994. Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase zap-70. *J. Biol. Chem.* **269**: 29520-29529.
- Weber J.R., Orstavik S., Torgersen K.M., Danbolt N.C., Berg S.F., Ryan J.C., Tasken K., Imboden J.B., and Vaage J.T. 1998. Molecular cloning of the cDNA encoding pp36, a tyrosine phosphorylated adaptor protein selectively expressed by T cells and natural killer cells. *J. Exp. Med.* **187**: 1157-1161.
- Weeks K.M., Ampe C., Schultz S.C, Steitz TA, Crothers DM. 1990. Fragments of the HIV-1 tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* **249**:1281-1285.
- Wegener A-M.K., Letourneur F., Metzger H., Hovler A., Brocker T., Luton F and Malissen B. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. 1992. *Cell* **68**: 83-95..
- Weil R., Cloutier J.F., Fournel M., and Veillette A. 1995. Regulation of zap-70 by Src family tyrosine protein kinases in antigen-specific T-cell line. *J. Biol. Chem.* **270**: 2791-2799.
- Weinhold K.J., Lysterly H.K., Stanley S.D., Austin A.A., Matthews T.J., and Bolognesi D.P. 1989. HIV-1 GP120-mediated immune suppression and lymphocyte destruction in the absence of viral infection. *J. Immunol.* **142**: 3091-3097.
- Weiss A. 1991. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 487-510.
- Weiss A., and Littman D.R. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**: 263-274.
- Weiss A., Imboden J., Hardy K., manger B., Terhorst C and Stobo J. 1986. The role of the T3/antigen receptor complex in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **4**: 593-619.
- Weiss A., Koretzky G., Schatzman R., and Kadlecsek T. 1991. Stimulation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 5484-5488.

Weiss S.H., Goedert J.J., Gartner S., Popovic M., Waters D., Markham P., di Marzo Veronese F., Gail M.H., Barkley W.E., Gibbon S.J. 1988. Risk of human immunodeficiency virus (HIV-1) infection among laboratory workers. *Science* **239**: 68-71.

Weissman A.M., Baniyash M., Hou D., Samelson L.E., Burgess W.H., and Klausner R.D. 1988. Molecular cloning of the ζ chain of the T cell antigen receptor. *Science* **239**: 1018-1021.

Weissman A.M., Samelson L.E., and Klausner R.D. 1986. A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex. *Nature* **324** : 480.

Weissman, A. M., S. J. Frank, D. G. Orloff, M. Mercep, J. D. Ashwell, and R. D. Klausner. 1989. Role of the ζ chain in the expression of the T cell antigen receptor: genetic reconstitution studies. *EMBO J.* **8**: 3651-3656.

Werner T., Ferroni S., Saermark T., Brack-Werner R., Banati R.B., Mager R., Steinaa L., Kreutzberg G.W., Erfle V. 1991. HIV-1 *nef* protein exhibits structural and functional similarity to scorpion peptides interacting with K⁺ channels. *AIDS* **5**:1301-1308.

Wiest A., Ashe J.M., Abe R., Bolen J.B., and Singer A. 1996. TCR activation of Zap-70 is impaired in CD4⁺CD8⁺ thymocytes as a consequence of intrathymic interactions that diminish available p56lck. *Immunity* **4**: 495-504.

Wijburg, O. L., M. H. Heemskerk, A. Sanders, C. J. Boog, and N. Van Rooijen. 1996. Role of virus-specific CD4⁺ cytotoxic T cells in recovery from mouse hepatitis virus infection. *Immunol.* **87**:34-41.

Williams A.F., and Barclay A.N. 1988. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **6**: 381-405.

Williams A.F., Barclay A.N., Clark S.J., Paterson D.J., and Willis A.C. 1987. Similarities in sequences and cellular expression between rat CD2 and CD4 antigens. *J. Exp. Med.* **165**: 368-380.

Williams H., Woodrow D.M., Cantrill D.A., and Murray E.J. 1995. Protein kinase C is not a downstream effector of p21^{ras} in activated T cells. *Eur. J. Immunol.* **25**: 42-47.

Williams, B.L., Schreiber, K.L., Zhang, W., Wange, R.L., Samelson, L.E., Leibson, P.J. and Abraham, R.T. 1998. Genetic evidence for differential coupling of the Syk family kinases to the T cell receptor: reconstitution studies in a ZAP-70-deficient Jurkat T-cell line. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1388-1399.

Williams, S., Couture, C., Gilman, J., Jascur, T., Deckert, M., Altman, A. and Mustelin, T. 1997. Reconstitution of T cell antigen receptor-induced Erk-2 kinase activation in Lck-negative JCaM.1 cells by Syk. *Eur. J. Biochem.* **245**: 84-90.

Wilson, J.D.K., Ogg, G.S., Allen, R.L., Goulder, P.J.L., Kelleher, A., Sewell, A.K., O'Callaghan, C.A., Rowland-Jones, S.L., Callan, M.F.C. and McMichael, A.J. 1998.

- Oligoclonal expansions of CD8⁺ T cells in chronic HIV infection are antigen specific. *J. Exp. Med.* **188**: 785-790.
- Wlodawer A., Miller M., Jaskolski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IF, Selk LM, Clawson L, Schneider J, Kent SB. 1989. Conserved folding in retroviral proteases: Crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **245**:616-621.
- Woodrow M., Clipstone N.A., and Cantrell D. 1993. p21^{ras} and calcineurin synergize to regulate the nuclear factor of activated T cells. *J. exp. Med.* **178**: 1517-1522.
- Wotton D., Higgins J.A., O'Hehir R.E., Lamb J.R., and Lake R.A. 1995. Differential induction of the NF-AT complex during restimulation and the induction of T-cell anergy. *Human Immunol.* **42**: 95-102.
- Yamamoto K., Mori S., Okamoto T., Shimotohno K., and Kyogoku Y. 1991. Identification of transcriptional suppressor proteins that bind to the negative regulatory element of the human immunodeficiency virus type 1. *Nucl. Acid Res.* **19**: 6107-6112.
- Yao L., Nakauchi H., Honjo T., and Kawakami T. 1990. The cytoplasmic domain of the CD8 α -chain is required for its interaction with p56^{lck}. *Immunol. Lett.* **24**: 267-271.
- Yasukawa, M., Y. Yakushijin, and S. Fujita. 1996. Two distinct mechanisms of cytotoxicity mediated by herpes simplex virus-specific CD4⁺ human cytotoxic T cell clones. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **78**:70-76.
- Yu X., Xin Y., Matsuda Z., Lee T.H., Essex M. 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* **66**:4966-4971.
- Zanders E.D., Lamb J.R., Feldmann M., Green N., and Beverly P.L.C. 1983. Tolerance of T cells is associated with membrane changes. *Nature (Lond).* **303**: 627-645.
- Zhang W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998b. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**:83-92.
- Zhang W., Tribble R.P., and Samelson L.E. 1998a. LAT palmitoylation : its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* **9**: 239-246.
- Zhao Q., and Weiss A. 1996. Enhancement of lymphocyte responsiveness by a gain-of-function mutation of ZAP-70. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6765-6774.
- Zugel U., Wang, R., Shih, G., Sette, A., Alexander, J. and Grey, H.M. 1998. Termination of peripheral tolerance to a T cell epitope by heteroclitic antigen analogs. *J. Immunol.* **161**: 1705-1709.

ANNEXE

- . Liste des communications et des publications**
- . Copie des articles publiés et soumis**

Publications (avec comité de lecture)

Bouhdoud L., Villain P., Merzouki A., Arella, M. and Couture C. 2000. T-cell receptor-mediated anergy of a human immunodeficiency virus (HIV) gp120-specific CD4⁺ cytotoxic T cell clone induced by a natural HIV type 1 variant peptide. *J. Virol.* 74: 2121-2130.

Bouhdoud L., Petrou A., Merzouki A., Arella M., Mustelin T. and Couture C. 2001. Uncoupling of T cell receptor-mediated activation of Zap-70 and Erk-2 from interleukin-2 production following agonist peptide stimulation of anti-CD3-energized CD4⁺ T lymphocytes. (soumis à *Eur. J. Immunol.*).

Publication (sans comité de lecture)

Bouhdoud L., Villain P., Gauthier N., Merzouki A., Arella M. and Couture C. 1999. Anergy and Altered T cell Signaling induced in a Human non-Transformed CD4⁺ Cytotoxic T cell Clone by a Natural HIV-1 Variant Peptide. *Nature Biotechnology.* Vol. 10., p 30.

Communications

Bouhdoud L., Petrou A. and Couture C. 2001. Partial restoration of TCR-proximal signaling events following antigenic peptide stimulation of anti-CD3 energized human CD4⁺ T cells. 11th International Congress of Immunology. Stockholm, Sweden, 22-27 July, 2001.

Bouhdoud L., Villain P., Gauthier N., Merzouki A., Arella M. and Couture C. 1999. Anergy and altered T cell signaling induced in a human non transformed CD4⁺ cytotoxic T cell clone by a natural HIV-1 variant peptide. The 1999 Miami Nature Biotechnology Winter Symposium. Signal Transduction and Therapeutic Strategies. Miami, FL. USA., February 6, 1999.

Merzouki A., Bouhdoud L., Mandy F., and Arella M. Cellular RNA Load Arise In Late Stage of HIV-Disease but do not Correlate with The Proviral Sequence Variability: Cross Sectional Study Representing all Stages of Infection. The XII international Conference on AIDS, Geneva, June 1998.

Merzouki A., Bouhdoud L., Mandy F. and Arella M. Correlation Between Cellular RNA Load and Proviral Sequence Variability: Cross Sectional Study. Seventh Annual Canadian Conference on HIV/AIDS Research, Quebec, May 1998.

T-Cell Receptor-Mediated Anergy of a Human Immunodeficiency Virus (HIV) gp120-Specific CD4⁺ Cytotoxic T-Cell Clone, Induced by a Natural HIV Type 1 Variant Peptide

LATIFA BOUHDOD,^{1,2} PATRICIA VILLAIN,¹ ABDERRAZZAK MERZOUKI,²
MAXIMILIAN ARELLA,² AND CLÉMENT COUTURE^{1,3,4,5*}

Molecular Oncology Group, Lady Davis Institute for Medical Research,¹ Microbiology and Biotechnology Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier,² Departments of Medicine³ and Microbiology and Immunology,⁴ McGill University, and Division of Hematology-Oncology, Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital,⁵ Montréal, Québec, Canada

Received 4 August 1999/Accepted 4 December 1999

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection triggers a cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response mediated by CD8⁺ and perhaps CD4⁺ CTLs. The mechanisms by which HIV-1 escapes from this CTL response are only beginning to be understood. However, it is already clear that the extreme genetic variability of the virus is a major contributing factor. Because of the well-known ability of altered peptide ligands (APL) to induce a T-cell receptor (TCR)-mediated anergic state in CD4⁺ helper T cells, we investigated the effects of HIV-1 sequence variations on the proliferation and cytotoxic activation of a human CD4⁺ CTL clone (Een217) specific for an epitope composed of amino acids 410 to 429 of HIV-1 gp120. We report that a natural variant of this epitope induced a functional anergic state rendering the T cells unable to respond to their antigenic ligand and preventing the proliferation and cytotoxic activation normally induced by the original antigenic peptide. Furthermore, the stimulation of Een217 cells with this APL generated altered TCR-proximal signaling events that have been associated with the induction of T-cell anergy in CD4⁺ T cells. Importantly, the APL-induced anergic state of the Een217 T cells could be prevented by the addition of interleukin 2, which restored their ability to respond to their nominal antigen. Our data therefore suggest that HIV-1 variants can induce a state of anergy in HIV-specific CD4⁺ CTLs. Such a mechanism may allow a viral variant to not only escape the CTL response but also facilitate the persistence of other viral strains that may otherwise be recognized and eliminated by HIV-specific CTLs.

Despite a functional dysfunction of CD4⁺ T helper lymphocytes, individuals infected with the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) respond very rapidly to the presence of the retrovirus by a strong increase in HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). The appearance of this CTL response is associated with a sharp decline in the initial viremia (2). Although vigorous during the early stages of infection, this cell-mediated cytotoxic response appears unable to contain the virus, which reemerges at the end of a long asymptomatic period, this time unchallenged by the immune system (39). The mechanism(s) by which the virus escapes the immune system is now the focus of intense investigation.

From the onset of the CTL response, a war in adaptability is waged between the patient's immune system and the virus. Rapidly, CTL clones responding best to certain HIV epitopes are selected over other clones responding less vigorously to the same epitopes or responding to functionally less important epitopes. Conversely, the virus responds to this immune pressure by mutating or deleting the epitope(s) targeted by these CTLs (28, 53). It is estimated that at least 100 million mutant viruses can be produced every day, as a result of a high replication rate and the poor accuracy of the viral reverse transcriptase (18, 52, 53), exposing the immune system of the HIV-infected patient to every possible point mutation on a daily basis (39). The emergence of mutated CTL epitopes may

therefore facilitate the persistence, and ultimate escape, of a broad range of HIV-1 variants (28, 30). For example, variations in key CTL epitopes may prevent either major histocompatibility complex (MHC) binding and presentation of viral peptides (44) or the recognition of MHC-bound variant peptides by the T-cell receptor (TCR) of HIV-specific CTLs. The complete deletion of a CTL epitope has also been described (26). Finally, TCR antagonism may also play an important role in the persistence of HIV-1. It was shown recently that naturally occurring variations in HIV-1 Gag CTL epitopes generated viral altered peptide ligands (APLs) that antagonized CTL activation by the original peptide epitope (1, 25, 49, 56) when both variant and native epitopes were presented to the CTL.

Virus-specific CTLs are frequently of the CD8⁺ surface phenotype, although HIV-specific CTLs of the CD4⁺ phenotype have also been described. CD4⁺, MHC class II-restricted CTL clones have been derived by *in vitro* stimulation of peripheral blood T cells from a normal individual with purified recombinant envelope glycoproteins (57) and have also been isolated from the blood of individuals vaccinated with HIV-1 envelope proteins (43). HIV-1 Gag- and gp120-specific CD4⁺ CTLs have also been recovered from HIV-1-infected patients (21, 22) as well as healthy individuals immunized with a recombinant gp160-derived vaccine (10, 16, 35). These observations indicate that HIV-derived peptide epitopes can be presented by class II MHC gene products and induce a class II MHC-restricted CTL response. It is, however, unclear whether these CD4⁺ cytotoxic T cells truly participate in the antiviral cytotoxic response.

* Corresponding author. Mailing address: Lady Davis Institute for Medical Research, 3755 Côte Ste-Catherine Rd., Montréal, Québec, Canada H3T 1E2. Phone: (514) 340-8260. Fax: (514) 340-7573. E-mail: CCouture@ldi.jgh.mcgill.ca.

T lymphocytes recognize short peptides, presented by dedicated antigen-presenting cells (APCs), in association with the products of the MHC. The TCR is composed of an antigen-specific $\alpha\beta$ heterodimer that interacts with the peptide antigen-MHC complex. The TCR is expressed at the cell surface in noncovalent association with the CD3 and ζ chains, which are responsible for transducing the extracellular signal that results in T-cell activation (reviewed in reference 66). The CD3 γ , δ , and ϵ molecules each contain a single signaling module, called an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), characterized by the consensus sequence $Yxx(L/I)X_{6-8}Yxx(L/I)$, whereas the ζ chain contains three such ITAMs (51). Upon ligand binding, the tyrosine residues of the ITAMs become phosphorylated, possibly by the two members of the Src family of nonreceptor protein tyrosine kinases (PTKs), Lck and Fyn, that are physically associated with the CD4/CD8 surface glycoproteins and the TCR-CD3 complex, respectively. The phosphorylation of the two tyrosine residues of each ITAM allows the modules to serve as docking sites for the tandem Src homology 2 (SH2) domains of the PTK Zap-70, which binds predominantly to the phosphorylated ITAMs of the ζ and CD3 ϵ chains (17). This interaction of Zap-70 with phosphorylated ITAMs allows Lck to interact with Zap-70 and phosphorylate regulatory tyrosine residues, resulting in the catalytic activation of Zap-70 (6, 7, 27). Once these TCR-proximal events have taken place, the activated Zap-70 will recruit and phosphorylate diverse cellular substrates, including the adapter proteins LAT (69) and SLP-76 (19, 50, 65), and initiate a signal transduction cascade culminating in T-cell activation and proliferation.

Stimulation of T lymphocytes by antigen peptides (or agonist peptide ligands) specifically recognized by the TCR induces interleukin-2 (IL-2) secretion and proliferation of the T cells (66). Conversely, T-cell stimulation with antigenic peptide variants (or APLs), which may differ from the native antigenic peptide by as little as a single amino acid, can result in the induction of a state of unresponsiveness termed anergy. T-cell anergy can be operationally defined as the state in which a lymphocyte no longer responds to its nominal agonist ligand by IL-2 secretion, proliferation, or functional activation. The molecular events triggered by anergy-inducing APLs and the mechanisms causing sustained T-cell unresponsiveness remain to be defined. However, initial studies have shown that the stimulation of T lymphocytes with anergy-inducing APLs generates modified early signaling events characterized by an incomplete phosphorylation of the ζ chain and the recruitment of inactive and unphosphorylated Zap-70 to the ζ chain (30, 38, 59, 60). This finding suggested that the initial events normally triggered in response to TCR stimulation (e.g., Lck-mediated phosphorylation of the ITAM modules and the subsequent activation of Zap-70) are somehow deficient.

Because of the extreme genetic variability of the viral genome during HIV infection and the knowledge that certain APLs can trigger TCR-mediated T-cell anergy in a variety of systems, we explored the possibility that HIV-specific CTLs could be rendered anergic by TCR stimulation with natural variants of HIV-1. To address this question, we used a human, nontransformed CD4⁺ cytotoxic T-cell clone, Een217, which was developed by *in vitro* stimulation of nonadherent peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), isolated from a healthy donor, with recombinant gp120 and cloning of proliferating clones in soft agar (57). We report that the stimulation of these cells with a naturally occurring variant peptide, which differs from the original peptide antigen by only two amino acids, induced altered TCR-mediated signaling events and a state of unresponsiveness characteristic of anergic cells.

MATERIALS AND METHODS

Cells and peptides. The Een217 T-cell clone was generated by *in vitro* stimulation of PBMCs isolated from the blood of a normal, seronegative individual with autologous monocytes pulsed with recombinant gp120 (57). This CD4⁺, HLA-DR4-restricted human cytotoxic T-cell clone is specific for gp120 residues 410 to 429 of HIV-1 strain PV22, presented in association with the class II MHC gene product HLA-DR4. The generation of HLA-DR4-transfected murine L cells, used as antigen-presenting cells in our assays, has also been described (57). Een217 T cells were maintained in culture (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin [each at 50 μ g/ml]) by periodic stimulation with 1 to 2 μ g of phytohemagglutinin/ml in the presence of recombinant human IL-2 (rhIL-2; 50 U/ml; Gibco-BRL) and irradiated (5,000 rads) allogeneic PBMCs (2×10^6 /well). The cells were rested for 2.5 to 3 weeks prior to experimentation. The peptides representing gp120 residues 410 to 429 of HIV-1 strain PV22 (GSDTITLPCRKIQFINMWQE) and four variant strains; HXB2 (GSDTITLPCRKIQIINMWQK), CDC42 (TGDITLPCRKIQII-NRWQV), EL1 (TNTNITLQCRKIQHKMVAG), and Z3 (CTGNITLPCRKIQIINMWQE), were synthesized at the Sheldon Biotechnology Center (McGill University, Montréal, Québec, Canada), using standard solid-phase methods. Crude peptides were purified by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. Peptides were analyzed for homogeneity by thin-layer chromatography, and their composition was assessed by amino acid analysis of acid-hydrolyzed peptides. The molecular weight of each peptide was determined by mass spectrometry analysis. All peptides were >90% pure.

Proliferation and cytotoxicity assays. CD4⁺ APCs (murine L cells stably expressing the human class II MHC molecule HLA-DR4) were irradiated (5,000 rads) and plated in 96 flat-bottomed wells at 3×10^4 cells/well in the presence of culture medium alone or with various concentrations of the indicated peptides at a final volume of 100 μ l/well. After overnight incubation at 37°C, the excess peptide was removed and the Een217 T cells were added at 5×10^4 cells/well in a final volume of 200 μ l of culture medium without rhIL-2. After 24 h, 1 μ Ci of [³H]TdR (Mendel Scientific Co., Ltd., St. Laurent, Québec, Canada) was added to each well. Forty-eight hours later, cells were harvested and [³H]TdR incorporation was measured by scintillation counting. All determinations were performed in triplicate. The cytolytic activity was measured in standard ⁵¹Cr release assays. Briefly, target cells (HLA-DR4⁺ L cells; 2×10^6 cells/ml) were pulsed with the indicated concentrations of peptides for 16 h at 37°C, washed, and labeled for 1.5 h at 37°C with 100 μ Ci of sodium [⁵¹Cr]chromate (Mendel Scientific). Labeled target cells were washed three times and added to v-bottomed 96-well plates at 10^4 cells/well in a volume of 100 μ l of medium without rhIL-2. Resting Een217 T cells (resuspended in 100 μ l of the same medium) were subsequently added to give an effector-to-target ratio of 20:1. The plates were centrifuged at 1,800 rpm for 1 min to promote cell contact and were incubated at 37°C for 6.5 h. The plates were then centrifuged at 4°C, supernatants were collected, and gamma radioactivity release was measured and converted to percent specific lysis, according to the formula $[(E - C)/(M - C)] \times 100$, with E as the experimental value in counts per minute, C as the control release value, and M as the maximal release value. C was determined as the average release in control wells from which effector cells were omitted; M was determined as the average release in wells where a 0.5% Triton X-100 solution was added in place of effector cells. All determinations were made in triplicate.

Anergy induction assay. Irradiated (5,000 rads) HLA-DR4⁺ L cells were seeded in 24-well tissue culture plates at 5×10^5 cells/well and incubated alone or with 10 nM peptide overnight at 37°C in a final volume of 700 μ l. The cells were washed, and resting Een217 T cells were added at 5×10^5 cells/well in a final volume of 1 ml of culture medium without rhIL-2. Forty-eight hours later, the T cells were removed from the APCs by vigorous washing and centrifugation over FicolI Paque Plus gradients (Pharmacia) at 1,800 rpm for 25 min. This technique allows the separation of the T lymphocytes from the adherent fibroblasts used as APCs, as microscopic examination and flow cytometric analysis of the cells fail to indicate the presence of CD4⁺ cells (not shown). The recovered Een217 cells were washed three times and rested for 2 days in fresh culture medium without rhIL-2. The Een217 cells were finally challenged with 10 nM PV22 in a standard proliferation assay as described above. All determinations were made in triplicate.

Determination of TCR-CD3 and CD4 surface expression. Een217 cells were cocultured in 24-well plates with irradiated HLA-DR4⁺ L cells alone or L cells pulsed with 10^{-9} to 10^{-4} M PV22, HXB2, or CDC42 peptide for 48 h at 37°C. The cells were washed and stained with 10 μ l of fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD4 monoclonal antibody (MAb; clone SFCH12T4D11; Beckman Coulter) and 10 μ l of rhodamine-conjugated anti-CD3 MAb (clone UCHT1; Beckman Coulter) for 1 h at room temperature. The cells were washed and assessed for CD3/CD4 surface expression using an EPICS flow cytometer (Coulter, Miami, Fla.). In these experiments, negative cells were gated to fall within the 0.1 to 1.0 window.

Stimulation of Een217 T cells, immunoprecipitations, and immunoblotting. For the stimulation of Een217 cells, HLA-DR4⁺ L cells were seeded in 24-well tissue culture plates at 10^6 cells/well and incubated at 37°C overnight in medium alone or medium containing indicated concentrations of the PV22 or HXB2 peptide. The peptide-pulsed APCs were washed, and resting Een217 T cells were

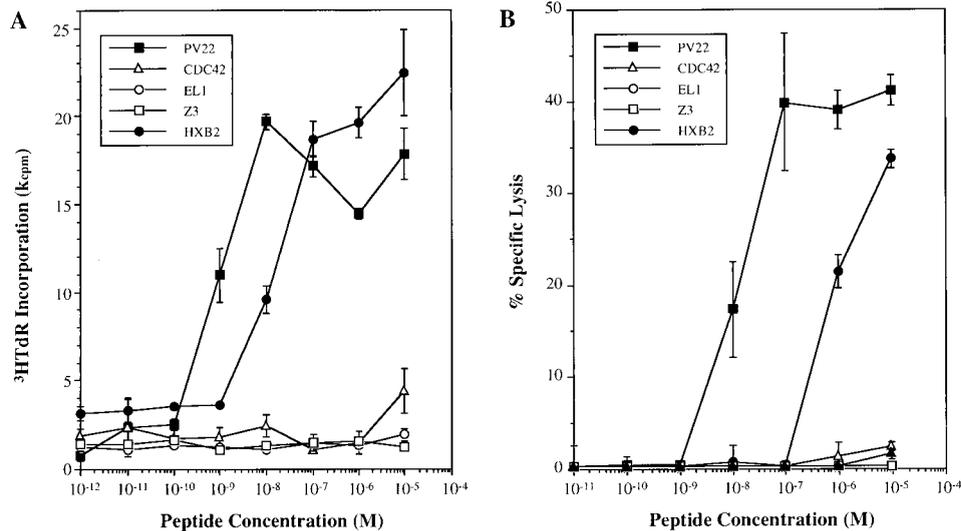


FIG. 1. Functional response of Een217 cells to HIV-1 gp120-derived peptides. (A) Proliferation of Een217 cells in response to DR4-expressing L cells pulsed with the indicated concentrations of the agonist antigenic ligand (PV22) or natural peptide variants from the CDC42, EL1, Z3, and HXB2 strains of HIV-1. Note that the HXB2-derived sequence can induce the proliferation of Een217 cells but is less potent than the PV22 peptide. (B) Cytotoxic activity of Een217 cells toward ⁵¹Cr-loaded DR4⁺ L cells pulsed with the indicated concentrations of peptides. In this experiment, the cells were cocultured for 6.5 h with an effector-to-target ratio of 20:1 as described elsewhere (57). Note that the HXB2 peptide is at least 100 times less efficient than the PV22 peptide in this assay. Each determination was made in triplicate. The results shown are representative of three independent experiments.

added at 12×10^6 cells/well in a final volume of 500 μ l of medium without rhIL-2. The plates were centrifuged for 1 min at 1,800 rpm to promote cell contact and were incubated at 37°C for 5 min. The stimulation was terminated by adding 500 μ l of ice-cold phosphate-buffered saline in each well. The plates were transferred immediately to ice, and the cells were harvested with a cell scraper. The cells were then transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 1,500 rpm for 30 s. Cell pellets were lysed with 500 μ l of ice-cold lysis buffer containing 1% Triton, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 5 mM EDTA, protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g of leupeptin/ml, 10 μ g of aprotinin/ml), and phosphotyrosine phosphatase inhibitor (1 mM sodium orthovanadate). Lysates were incubated for 30 min on ice and cleared of insoluble material by ultracentrifugation. Zap-70 was immunoprecipitated from postnuclear lysates exactly as described elsewhere (8). Immune complexes were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 13% polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with the antiphosphotyrosine MAb 4G10 or anti-Zap-70 MAb 2F3.2 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y.), followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies. The blots were developed by enhanced chemiluminescence (Amersham) according to the manufacturer's instructions. The data presented are representative of experiments performed three times.

GST-SH2 pull-down of tyrosine-phosphorylated TCR ζ from Een217 cells. The tandem SH2 domain region of the human Zap-70 cDNA (corresponding to amino acids 1 to 260) was amplified by PCR using the cDNA described by Chan et al. (7) as a template. The 780-nucleotide PCR fragment was subcloned into the pGEX-3T expression vector and sequenced. The resulting Zap(SH2)₂-glutathione S-transferase (GST) fusion protein was expressed in *Escherichia coli* and purified as previously described (8, 9). The purified fusion protein precipitated from lysates of pervanadate-treated Jurkat T cells a 21- to 23-kDa tyrosine-phosphorylated protein that reacted with the anti-TCR ζ MAb 6B10 (Zymed) in immunoblotting experiments (not shown), which demonstrates that the Zap(SH2)₂-GST fusion protein has the expected binding specificity. For precipitation of the tyrosine-phosphorylated ζ chain in peptide-stimulated Een217 cells, the cell lysates were incubated with ~ 5 μ g of Zap(SH2)₂-GST bound to glutathione-Sepharose beads for 1 h at 4°C. The beads were washed, and the bound proteins were separated on 13% SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with the antiphosphotyrosine MAb 4G10 as described above.

For the pretreatment experiments, resting Een217 cells were incubated for 48 h at 37°C with HLA-DR4⁺ L cells alone or L cells pulsed with 1, 10, or 100 nM HXB2 or CDC42 peptide in a 24-well tissue culture plate. The T cells were removed from the APCs, washed, and rested 2 days in fresh culture medium without rhIL-2. The cells were then stimulated for 5 min with 10 μ M PV22 peptide and lysed, and the ζ chain was precipitated using the Zap(SH2)₂-GST fusion protein as described above.

RESULTS

Functional response of Een217 cells to stimulation by native and variant gp120 peptides. The Een217 T-cell clone is an HLA-DR4-restricted CD4⁺ cytotoxic T cell specific for gp120, amino acid residues 410 to 429, of the PV22 strain of HIV-1 (57). To determine the effects of natural variations in HIV-1 epitopes on CTL activation and function, we first measured the activity of synthetic peptides, corresponding to amino acids 410 to 429 of gp120 molecules from different HIV-1 strains, in a standard proliferation assay using L cells stably expressing human HLA-DR4 as APCs (Fig. 1A). We found that the CDC42-, EL1-, and Z3-derived peptides did not induce the proliferation of Een217 cells. However, the peptide derived from HXB2, which differs from the PV22 sequence by only two amino acids (F23I and E29K) (Table 1), induced proliferation but was consistently found to be less potent than PV22, by a factor of ~ 25 (Table 1).

We next determined whether the cytolytic function of Een217 cells could be induced by stimulation with ⁵¹Cr-loaded HLA-DR4⁺ L cells pulsed with increasing concentrations of the five HIV-1 peptides. In this assay, we found that the Een217 cells responded strongly to PV22, as measured by the release of ⁵¹Cr from PV22-pulsed L cells (Fig. 1B), while the peptides that were unable to induce the proliferation of Een217 cells were also inactive in the cytotoxicity assay. The HXB2 peptide, however, could induce the cytotoxic function of Een217 T cells, but only when used at a 100-fold-higher concentration than the PV22-derived sequence. Together, these data indicate that Een217 cells can respond to the HXB2 peptide *in vitro* but only when elevated peptide concentrations are used.

Induction of T-cell anergy by the HXB2 natural variant peptide. It was recently reported that the copresentation of native and altered peptides to HIV-specific CD8⁺ CTLs was required to prevent the activation and function of the CTLs (49, 56). The authors concluded that this "defect" was the

TABLE 1. Amino acid sequences of peptides used in this study and their relative abilities to induce proliferation and cytotoxic activity of Een217 cells

Peptide	Sequence	Relative potency ^a	
		Proliferation	Cytotoxicity
PV22	GSDTITLPCRKQFINMWQE	1.000	1.000
CDC42	TG-I-----I--R--V	<0.0005	<0.0005
EL1	TNTN---Q-----I-K-VAG	<0.0005	<0.0005
Z3	CTGN-----I-----	<0.0005	<0.0005
HXB2	-----I-----K	0.043	0.015

^a The relative potency of a given peptide is calculated as the ratio between the concentration of the PV22-derived peptide required for 50% maximal response and the concentration of each variant peptide required for 50% maximal response. In both cases, the concentration of PV22 required to induce 50% maximal activation was given an arbitrary value of 1.0.

result of antagonism, where the APL competes with the agonist peptide for TCR binding and prevent the proper activation of the CTL. Conceptually, T-cell anergy differs from antagonism by the ability of an APL, when presented alone, to induce a long-lasting state of unresponsiveness where the T cell is unable to respond to mitogenic concentrations of its agonist ligand.

In the initial characterization of the Een217 clone, the ability of several natural HIV-1 variant peptides to stimulate the proliferation and function of Een217 cells had been partly determined (5, 42, 46, 57). However, the possibility that these natural APLs could induce TCR-dependent anergy of the CTL clone had never been tested. To determine whether natural gp120 variants could induce T-cell anergy, Een217 cells were pretreated with 10 nM each variant peptide for 48 h, rested for another 48 h, and finally stimulated with a mitogenic concentration (10 nM) of PV22 in a standard proliferation assay. Our results indicate that at a concentration where the peptide induces little proliferation and function of the T cells, HXB2 completely blocked PV22-induced proliferation of Een217 cells (Fig. 2). Under the same conditions, the CDC42- and EL1-derived peptides had a marginal effect on PV22-stimulated proliferation of Een217 cells, whereas the Z3 peptide reduced proliferation by ~60% upon secondary stimulation with the PV22 peptide. The ability of the HXB2 peptide to induce the anergy of Een217 T cells was found to be dose dependent and to increase when higher concentrations of pep-

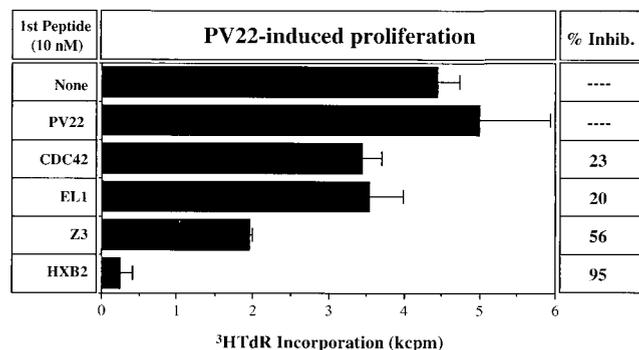


FIG. 2. Induction of Een217 T-cell anergy by pretreatment with the HXB2 natural variant peptide. Een217 cells were cocultured for 48 h with APCs alone or APCs pulsed with 10 nM peptide, rested for 48 h, and restimulated with 10 nM PV22 in a standard proliferation assay. Each determination was made in triplicate. The percentage of inhibition obtained with each peptide is indicated. The data presented are representative of three independent experiments.

tide were used in the pretreatment of the T cells. However, HXB2 was effective in attenuating the PV22-induced proliferation of Een217 cells at concentrations as low as 1 nM, where a 62% inhibition of Een217 proliferation was observed (data not shown). Importantly, Een217 T-cell anergy induced by 1 to 10 nM HXB2 could not be reversed by restimulation of the cells with up to 10 μ M PV22. These results clearly demonstrate that the pretreatment of CTLs with a gp120-derived variant peptide alone can induce anergy and prevent subsequent CTL activation by the native gp120 epitope.

Inhibition of PV22-mediated cytotoxic activation of Een217 cells by the HXB2 variant peptide. Since the pretreatment of Een217 T cells with the HXB2 variant peptide prevented PV22-induced proliferation of the T cells, we next tested the ability of the HXB2 peptide to prevent the induction of the CTL activity observed after PV22 stimulation of Een217 cells. T cells were first pretreated with increasing concentrations of HXB2 (presented by DR4⁺ L cells) for 48 h, rested for 48 h, and challenged with 10 nM PV22 in a standard cytotoxicity assay, using PV22-pulsed, ⁵¹Cr-loaded L cells as targets. Our data (Fig. 3B) indicate that the HXB2 peptide, at concentrations ranging from 0.1 to 10 nM, completely abrogated the induction of the cytotoxic activity of Een217 T cells normally observed in response to 10 nM PV22, a peptide concentration that induces ~50 to 60% maximal CTL activity (Fig. 1 and 3A). When higher concentrations (100 nM to 1 μ M) of HXB2 were used for the pretreatment of Een217 cells, low levels of cytotoxicity, inferior to 10% cell lysis, were observed (Fig. 3B). This may be due to the fact that high concentrations of HXB2 can induce the proliferation and cytotoxic activation of Een217 cells (Fig. 1). It is therefore likely that the CTL activity detected in these samples represents a residual function triggered by high concentrations of HXB2.

TCR-CD3 and CD4 expression by Een217 cells stimulated by agonist and variant peptides. Exposure of T lymphocytes to mitogenic concentrations of an agonist peptide, presented in association with the proper MHC molecule by specialized APCs, can induce an internalization of the TCR-CD3 complex (30, 47) through a mechanism that involves serial binding of the receptor to low numbers of peptide-MHC complexes and downregulation of the ligated TCR (62). This phenomenon is probably mediated by the activation of the Src family kinases Lck and Fyn (31) and does not occur with weak agonists (1) or TCR antagonists (30). However, since high concentrations of HXB2 stimulated Een217 cells to proliferate and exhibit cytotoxic activity (Fig. 1), we examined the possibility that the exposure of Een217 cells to HXB2 could modulate the expression of the TCR-CD3 complex and prevent later stimulation with the PV22 peptide.

Een217 cells were stimulated with 10⁻⁹ to 10⁻⁴ M PV22, HXB2, or CDC42 peptide for 48 h and examined by flow cytometry for surface expression of the TCR-CD3 complex, using a MAb to the CD3 ϵ chain. Our analysis revealed that the treatment of Een217 cells with all concentrations of these three peptides did not significantly alter the proportion of Een217 cells expressing the TCR-CD3 surface antigens, which remained at $\geq 97\%$ (not shown). However, the surface expression levels of the TCR-CD3 complex, as measured by the mean fluorescence intensity, varied greatly according to the peptide and peptide concentration used (Fig. 4A). Indeed, the PV22 peptide induced an internalization of the TCR-CD3 complex that was dose dependent, reaching up to ~70% reduction at the highest concentration used (10⁻⁴ M). At every peptide concentration tested, the HXB2 and CDC42 peptides induced lower levels of TCR internalization than the PV22 peptide. Similar results were obtained when the surface expression of

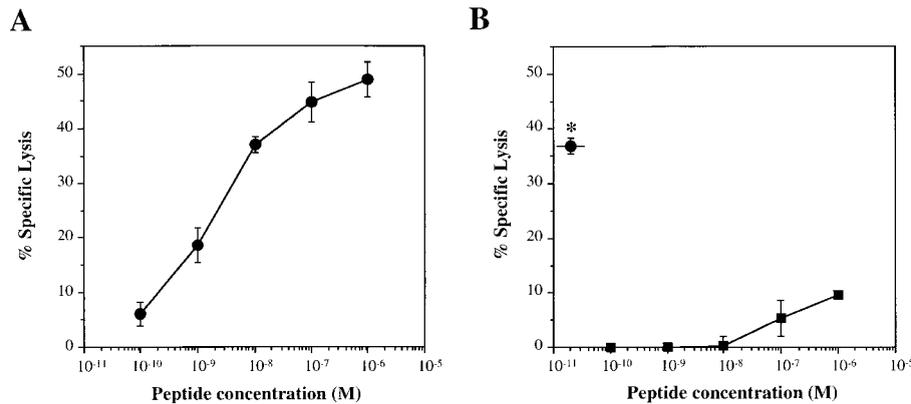


FIG. 3. Inhibition of PV22-induced EeN217 T-cell cytotoxicity by pretreatment of the cells with the HXB2 peptide. (A) Cytotoxic activity of EeN217 cells, pretreated with culture medium alone for 48 h, toward ^{51}Cr -loaded DR4 $^{+}$ L cells pulsed with the indicated concentrations of the PV22 peptide. (B) Cytotoxicity of EeN217 cells, pretreated with the indicated concentrations of the HXB2 peptide for 48 h, and then stimulated with ^{51}Cr -loaded DR4 $^{+}$ L cells pulsed with 10 nM PV22. The specific lysis measurement obtained with 10 nM PV22 (A) is represented by the asterisk in panel B. The data presented in panels A and B were derived from the same experiment.

CD4 was monitored after peptide stimulation of the EeN217 cells (Fig. 4B). Most important, these data indicate that the stimulation of EeN217 cells with 10 nM HXB2 or CDC42-derived peptide did not cause significant reductions in the surface expression levels of the TCR-CD3 complex or CD4, which remained at $\geq 92\%$. It is therefore extremely unlikely that the 95% reduction in PV22-induced proliferation of EeN217 cells, and the total inhibition of cytotoxic function observed after the pretreatment of the cells with 10 nM HXB2, was the result of a dramatic reduction in TCR-CD3 or CD4 surface expression levels prior to PV22 stimulation.

Early signal transduction events induced by the PV22 and HXB2 peptides. APLs can, when presented by the proper MHC products, bind to the TCR and initiate early signaling events that differ from those initiated by the agonist antigenic peptide (reviewed in reference 36), resulting in either partial T-cell activation or functional anergy (11, 12, 58). Some of the intracellular events triggered by anergy-inducing APLs include an incomplete phosphorylation of the TCR-associated ζ chain and recruitment of unphosphorylated and inactive Zap-70 to

the TCR-CD3 complex (8, 59). Since our data suggested that the HXB2 peptide variant induces anergy, we examined the TCR-proximal signaling events triggered in EeN217 cells in response to the HXB2 peptide.

EeN217 cells were stimulated with the indicated concentrations of either PV22 or HXB2 for 5 min. Zap-70 was immunoprecipitated from postnuclear detergent lysates with a previously described antiserum (8) and subjected to immunoblot analysis using antiphosphotyrosine or anti-Zap-70 MAbs. We found that Zap-70 became phosphorylated on tyrosine residues in response to the PV22 peptide (Fig. 5A, left panel), but not in response to equivalent concentrations of HXB2 (right panel). Notably, tyrosine-phosphorylated TCR ζ was present in all Zap-70 immunoprecipitates (except those performed on APCs alone). However, only the native PV22 peptide could induce the complete phosphorylation of the ζ chain, which is detected as a tyrosine-phosphorylated doublet (p21 and p23) in cells stimulated with peptide concentrations of 10 μM or higher (Fig. 5A).

The differential phosphorylation of TCR ζ in response to

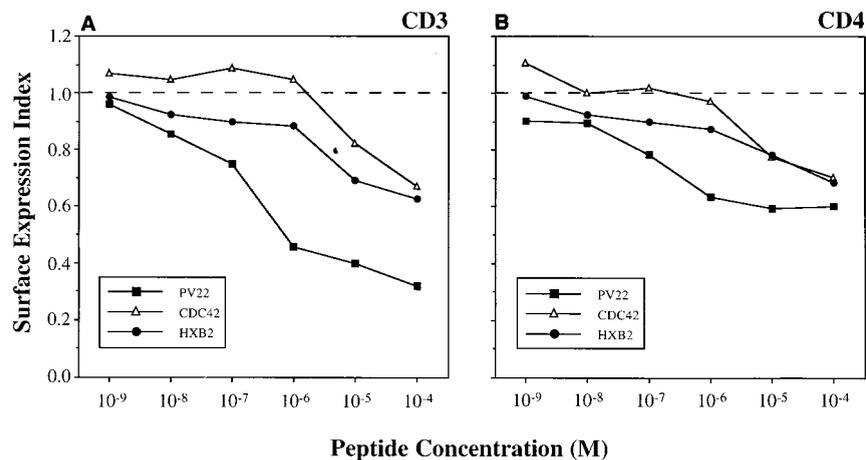


FIG. 4. Modulation of the TCR-CD3 complex (A) and CD4 (B) surface expression levels induced by stimulation of EeN217 T cells for 48 h with the indicated concentrations of the PV22-, HXB2-, and CDC42-derived peptides. The data are presented as relative expression index, representing the ratio of the mean fluorescence intensity of each surface antigen in peptide-stimulated cells to that measured in nonstimulated EeN217 cells (mean fluorescence intensities for CD3 and CD4 surface expression in nontreated cells were 8.97 and 4.54, respectively). In all cases, the proportion of TCR-CD3- and CD4-positive cells remained unchanged, indicating that the surface density of these molecules decreased following peptide treatment.

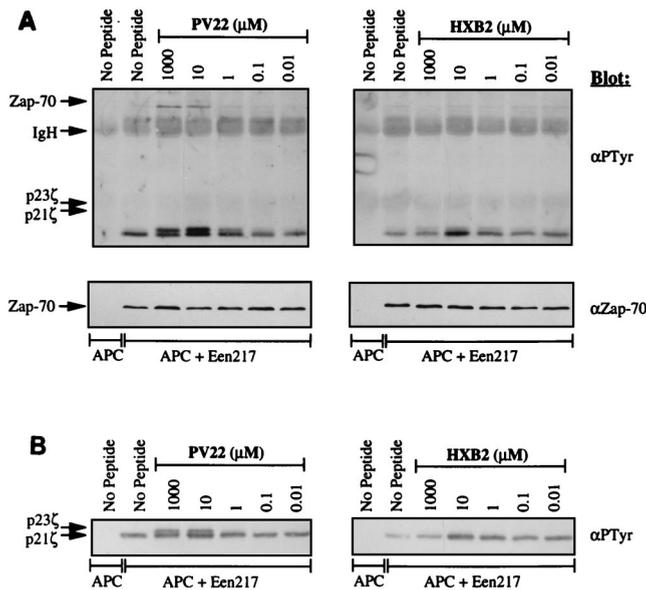


FIG. 5. Induction of Zap-70 tyrosine phosphorylation and association with the TCR ζ chain in response to PV22 and HXB2 stimulation of Een217 cells. (A) Immunoprecipitation of Zap-70 from APCs alone or Een217 cells stimulated for 5 min with DR4-expressing L cells pulsed overnight with the indicated concentrations of PV22 and HXB2. The immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with antiphosphotyrosine antibodies (αPTyr ; upper panel). Note that PV22 induced the phosphorylation of Zap-70 and its association with the fully phosphorylated form of TCR ζ , which appears as a p21/p23 doublet. The membrane was stripped and reblotted with a Zap-70-specific MAb ($\alpha\text{Zap-70}$) to ensure that equal amounts of Zap-70 were present in all immunoprecipitates (lower panel). As expected, Zap-70 was absent from anti-Zap-70 immunoprecipitates in assays performed on APCs alone (first lane of each panel). (B) Cell lysates of APCs or Een217 cells stimulated as described above were incubated in presence of $\sim 5 \mu\text{g}$ of the purified Zap(SH2) $_2$ -GST fusion protein. The Zap(SH2) $_2$ -GST-bound material was precipitated with glutathione-Sepharose beads and analyzed by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibodies. The results presented were reproduced in four independent experiments. IgH, immunoglobulin heavy chain.

agonist and APL peptides was also detected when the ζ chain was isolated from peptide-stimulated Een217 cells by using a GST fusion protein containing the tandem SH2 domain region (amino acids 1 to 260) of Zap-70. Indeed, antiphosphotyrosine immunoblot analysis of the material bound to the Zap(SH2) $_2$ -GST fusion protein revealed the same phosphorylation pattern (p21/23 doublet) as that coprecipitating with Zap-70 (Fig. 5B). This confirms that the 21/23-kDa phosphoproteins detected in the Zap-70 immunoprecipitates were in fact derived from the ζ chain. Finally, stimulation of Een217 cells with the CDC42-, EL1-, and Z3-derived peptides did not induce the phosphorylation of Zap-70 or p23 ζ on tyrosine residues, even at peptide concentrations greater than 1 mM (not shown).

Although the maximum proliferation of Een217 cells was detected after stimulation with 10 nM PV22 (Fig. 1), we were unable to detect tyrosine phosphorylation of Zap-70 or p23 ζ at peptide concentrations below 10 μM (Fig. 5A). This may reflect limitations in our experimental procedures but most likely resulted from the shorter duration of Een217 peptide stimulation in these experiments than in the proliferation assays (5 min versus 48 h). The same phenomenon was observed by other investigators in similar systems (30, 59).

Reduction of PV22-induced TCR ζ phosphorylation by pre-treatment with HXB2. Our demonstration that the pretreatment of Een217 cells with the HXB2-derived peptide reduced the ability of the Een217 cells to respond to their antigenic

peptide prompted us to determine whether the PV22-induced phosphorylation of the ζ chain could also be downregulated by HXB2 pretreatment. Een217 cells were incubated for 48 h with DR4 $^+$ APCs alone or APCs pulsed with 1, 10, or 100 nM HXB2 or CDC42 peptide. The T cells were then removed from the APCs, rested for 48 h, and challenged for 5 min with APCs pulsed with 10 μM PV22. The Een217 cells were then lysed, and the TCR ζ chain was precipitated with the Zap(SH2) $_2$ -GST fusion protein as described above. The SH2-bound material was then analyzed by antiphosphotyrosine immunoblotting.

As expected, PV22 stimulation increased the phosphorylation of the TCR ζ chain at least fivefold (Fig. 6, lanes 2 and 3). This 21-kDa phosphopeptide originated from the T cells, as no such band was detected when APCs were tested in absence of T cells (lane 1). For unknown reasons, PV22 stimulation of Een217 cells preincubated with APCs alone (in absence of HIV-1-derived peptide) or APCs loaded with the CDC42 or HXB2-derived peptides consistently failed to induce the appearance of the p21/23 phosphorylated doublet normally observed in agonist-stimulated T cells. This may be due to fibroblast-derived cytokines or to a negative signal generated by the interaction of the T cells with the fibroblasts. Other investigators (49), using different experimental systems, also failed to detect the TCR ζ -derived doublet following peptide stimulation of HIV-specific T cells. Nonetheless, we found that the pretreatment of Een217 cells with 100 nM HXB2 greatly reduced the level of TCR ζ phosphorylation induced by PV22 stimulation (lane 4). A similar treatment of the T cells with 100 nM CDC42 failed to inhibit PV22-mediated TCR ζ phosphorylation, which is consistent with the inability of the CDC42 peptide to induce T-cell anergy. Because the association of the Zap(SH2) $_2$ -GST fusion protein with the TCR ζ chain depends on the double phosphorylation of the ITAM modules of TCR ζ , different amounts of ζ are expected in every lane. It is therefore difficult to ascertain that the reduced phosphorylation of TCR ζ observed following pretreatment with 100 nM HXB2 (lane 4) is due to a reduction in the phosphotyrosine content of ζ and not to a gel loading artifact. However, this result was reproducible, and we verified that equal amounts of GST fusion proteins were present in all precipitates (not shown).

Prevention and reversion of HXB2-induced Een217 T-cell anergy by exogenous IL-2. In several experimental systems, T-cell anergy, induced by either APLs or TCR ligation in

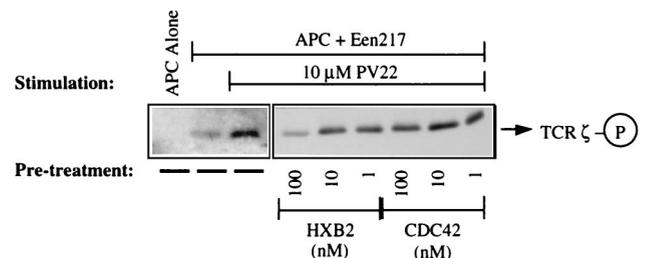


FIG. 6. Inhibition of PV22-induced phosphorylation of TCR ζ by pretreatment of Een217 cells with the HXB2 peptide. Een217 cells were preincubated for 48 h with APCs alone or APCs pulsed with 1, 10, or 100 nM HXB2 or CDC42 peptide. The Een217 cells were recovered, rested for 48 h, and restimulated for 5 min with APCs alone (lane 2) or APCs pulsed with 10 μM of PV22 (lanes 3 to 9). The TCR ζ chain was then isolated from cellular lysates by using the Zap(SH2) $_2$ -GST fusion protein and analyzed by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibodies. The tyrosine-phosphorylated p21/23 protein originated from the Een217 T cells, as T-cell-free APCs, used as a negative control (lane 1), did not contain this phosphopeptide. Note that HXB2 attenuated the PV22-induced ζ phosphorylation, whereas the CDC42 peptide, which does not induce Een217 T-cell anergy, did not. Identical results were obtained in two independent experiments.

absence of costimulation, is a result of an active repression of TCR-induced transcriptional activation of the IL-2 gene (4, 71), which prevents agonist-stimulated T cells from entering the cell cycle. T-cell anergy is therefore expected to be reversible. Indeed, the addition of exogenous IL-2 either at the moment of stimulation with the APL or during the recovery period preceding the stimulation with the agonist peptide is sufficient to prevent or reverse the induction of the anergic state, respectively (37). It was therefore important to determine whether the addition of IL-2 can prevent or reverse the induction of Ee217 T-cell anergy by the HXB2 variant peptide. Ee217 cells were pretreated with DR4⁺ L cells pulsed with 10 nM PV22, CDC42, or HXB2, in the absence or presence of exogenous rhIL-2 for 48 h. The T cells were then recovered and rested for 48 h in the absence or presence of rhIL-2 and finally challenged with 10 nM PV22 agonist peptide, in the absence of rhIL-2, in a standard proliferation assay. In this experiment, the pretreatment of Ee217 cells with the HXB2 peptide reduced the PV22-induced proliferation of Ee217 cells by ~90%, whereas the CDC42 peptide had minimal effects (Fig. 7A). The addition of rhIL-2 (50 U/ml) at the time of pretreatment with the different peptides (Fig. 7B) or during the 48-h recovery period following the pretreatment (Fig. 7C) blocked the induction of Ee217 T-cell anergy by the HXB2 peptide.

DISCUSSION

During HIV-1 infection, CTLs are believed to exert a significant selective pressure on the virus population and cause the emergence of escape variants (26, 28, 30, 44, 48). A number of mechanisms have been proposed to explain the ability of HIV-1 to escape the virus-specific CTL response during asymptomatic HIV-1 infection. These include the mutation or deletion of major viral epitopes, resulting in an inefficient MHC-dependent presentation and impaired TCR recognition (5, 22), or antagonism (1, 25, 49, 56), where the copresentation of the agonist and variant peptides prevents CTL activation.

Here, we show that a naturally occurring HIV-1-derived antigenic peptide variant has the ability to induce the anergy of the CD4⁺ CTL clone Ee217 to the wild-type (PV22) viral antigen. The pretreatment of Ee217 cells with nonmitogenic concentrations (1 to 10 nM) of the HXB2-derived peptide variant prevented the TCR-induced proliferation and functional cytotoxic activation of the T cells by mitogenic concentrations (≥ 10 nM) of the PV22 antigenic peptide. This inhibition did not require copresentation of the variant (HXB2) and antigenic peptides to the T cells, indicating that the functional inhibition observed in this system is most likely a result of TCR-mediated anergy. Despite our efforts to remove excess peptide by extensive washing of peptide-pulsed APCs, we cannot formally rule out the unlikely possibility that free HXB2 peptide, originating from the initial peptide treatment, was picked up by HLA-DR4⁺ Ee217 cells and cross-presented (16) to the T cells simultaneously with APC-bound PV22 peptide, thereby antagonizing PV22-induced T-cell activation.

The dual effect of the HXB2 peptide, i.e., anergy at low concentrations and proliferation and cytotoxicity at higher concentrations, is unique. What would be the most likely outcome of *in vivo* stimulation of Ee217 T cells with an emerging epitope variant? Since the concentration of such a variant peptide at the surface of an infected cell would increase with time, it is reasonable to assume that the concentration required for anergy induction would be reached first. Although a peptide concentration of 1 to 10 nM has been referred to as a "physiological" concentration (49), the exact correlation be-

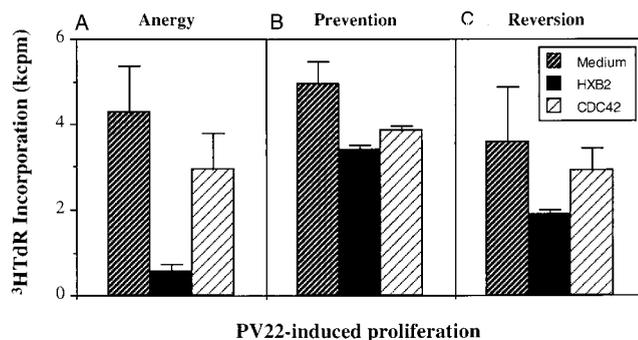


FIG. 7. Prevention and reversion of HXB2-induced Ee217 T-cell anergy by exogenous IL-2. Ee217 T cells were pretreated with either medium alone or 10 nM peptide (in the presence of DR4-transfected L cells) for 48 h, separated from the APCs, rested for 48 h, and finally stimulated with 10 nM PV22 peptide as before. The anergy assay (A) was performed in the absence of IL-2. The addition of IL-2 (50 U/ml) during the first peptide stimulation (B) or during the 48-h rest period (C) prevented or reverted the induction of anergy by the HXB2 peptide. All determinations were made in triplicate.

tween the concentration of exogenously added peptides to APCs *in vitro* and the actual cell surface concentration of a naturally processed HIV-derived peptide is unclear. It is therefore difficult to determine whether this anergy-inducing peptide concentration can be reached *in vivo*.

Despite the fact that the vast majority of HIV-derived CTL epitopes identified so far are MHC class I restricted and trigger a CD8⁺ T-cell response, MHC class II-restricted viral epitopes have also been identified (21, 32, 57; reviewed in reference 39). Although there is still no direct evidence for the participation of CD4⁺ cytotoxic T cells in HIV-specific antiviral immune response, two groups have reported the isolation of HIV-1 Gag- and gp120-specific CD4⁺ CTLs from HIV-infected patients (10, 35). The rare occurrence of these CD4⁺ CTLs in HIV-infected patients contrasts with the fact that CD4⁺ CTLs can readily be isolated following *in vitro* stimulation of normal PBMCs with recombinant HIV-derived gp120 or following immunization of normal seronegative individuals by gp160/120-derived vaccines (16, 21, 22, 43, 57). Since virus-specific CD4⁺ CTLs can also be isolated from patients or animals infected with other viral pathogens (29, 33, 40, 64, 67, 68), these findings may indicate that CD4⁺ CTLs could indeed be generated following HIV infection, perhaps at the earliest stages, but may be primary targets of the virus and disappear early after the initial contact with the virus.

Provided that CD4⁺ CTLs and/or helper T cells are generated as a result of HIV infection, then the virus must have developed different strategies to escape both CD8⁺ and CD4⁺ effector cells. Viral epitope variations have been shown to prevent antigen presentation by APCs or productive TCR stimulation. In addition, the HIV-1 accessory gene products Vpu (23) and Nef (55) have been shown to downregulate the expression of class I MHC antigens at the surface of infected cells, hence interfering with the recognition of viral antigens by CD8⁺ CTLs. By analogy to a variety of experimental systems where CD4⁺ T cells (both human and murine) have been shown to respond to TCR epitope variants by complete functional anergy, our analysis indicates that virus-specific CD4⁺ CTLs may also be sensitive to APL-induced T-cell anergy. Since most cellular targets of HIV-1, such as macrophages, dendritic cells, and activated T lymphocytes, express high levels of MHC class II antigens, a class II MHC-restricted CTL response may have a role in eliminating these viral reservoirs throughout the infection.

The conclusion that HXB2 stimulation of Ee217 cells induced T-cell anergy is supported by our biochemical analysis of the early signal transduction events induced by this peptide. Indeed, the stimulation of Ee217 cells with the HXB2-derived peptide, even at elevated concentrations, induced only a partial phosphorylation of the TCR-associated ζ chain, which appeared as a single tyrosine-phosphorylated band of ~ 21 kDa. Since the peptides used in this study bind to HLA-DR4 with similar affinities (46), this may reflect differences in the affinity and duration of the interactions between the different peptide-MHC complexes and the TCR, rather than the inability of the DR4⁺ APCs to present a variant peptide. Based on the data obtained by Kersh et al. (24), the p21 ζ phosphoprotein arising in response to APL stimulation is not expected to contain doubly phosphorylated ITAM modules. Yet the partly phosphorylated ζ chain from HXB2-treated cells can still interact with Zap-70 or with the Zap(SH2)₂-GST fusion protein. This suggests that at least one of the three ITAM motifs present in each TCR ζ chain must be fully phosphorylated in order to generate a suitable docking site for the tandem SH2 domains of Zap-70. In addition, the fact that the TCR ζ -associated Zap-70 is not phosphorylated on tyrosine, an event normally mediated by the nonreceptor PTK Lck, suggests that HXB2 failed to induce the early Lck-mediated phosphorylation and activation of Zap-70 (13). Since Lck is thought to be responsible for both the phosphorylation of the TCR ζ chain and the activation of Zap-70 (63), it is unclear how one event can occur in the absence of the other. It is, however, conceivable that in response to APL stimulation, Zap-70 is recruited to the TCR-CD3 complex but maintained in an unphosphorylated and inactive form by a putative phosphotyrosine phosphatase. Candidates for such a phosphatase would include SHP-1, known to downregulate T-cell activation and Zap-70 phosphorylation (20, 45), and CD45, which has been shown to interact with the ζ chain and dephosphorylate TCR ζ and Zap-70 in vitro (15, 41). Interestingly, the pretreatment of Ee217 cells with 100 nM HXB2 48 h before TCR stimulation with the agonist ligand reduced the ability of the PV22 peptide to induce TCR ζ phosphorylation. Since we found no significant reduction of TCR-CD3 surface expression under these conditions, this observation would be consistent with a phosphatase-mediated inhibition of the TCR proximal events resulting in TCR ζ phosphorylation.

While the differential phosphorylation of TCR ζ , as well as CD3_e in some experimental systems, was observed in T cells energized by TCR stimulation with APLs, the induction of T-cell anergy by TCR stimulation with agonist ligands, in the absence of costimulation, occurs with no major alterations in the early TCR-mediated signaling events, including the phosphorylation of TCR ζ and Zap-70. Therefore, it is now understood that the lack of IL-2 production, rather than the altered pattern of TCR-mediated phosphorylation, is the crucial factor controlling T-cell anergy (37). This view is supported by our observation that the addition of exogenous IL-2, either at the moment of HXB2 pretreatment or during the recovery period preceding PV22 stimulation, is sufficient to prevent HXB2-induced Ee217 T-cell anergy.

The molecular events responsible for the induction of T-cell anergy are unknown, but several biochemical events required for the maintenance of the anergic state have been identified. An impaired Ras activation, possibly leading to a deficiency in the activation of the mitogen-activated protein kinases Erk-2 and JNK, has been observed (14, 34, 54). Recently, the constitutive activation of the Rap1 GTPase, induced by TCR ligation in absence of CD28-derived costimulation, has been shown to be responsible for the sustained repression of IL-2 gene expression in anergized T cells (4). This elevated activity

of Rap1 may result from an elevated phosphorylation and tyrosine kinase activity of the Fyn PTK and its association with a tyrosine-phosphorylated form of the proto-oncoprotein Cbl. Our attempt to determine whether similar events could be induced in HXB2-treated Ee217 cells revealed no such association between Fyn and Cbl and no increase in Cbl phosphorylation. Therefore, the events responsible for inducing T-cell anergy in APL-stimulated T cells may be different from those induced by TCR ligation in absence of costimulation.

Taken together, our data suggest that T-cell anergy, induced by HIV-derived natural variants, is a plausible addition to the putative mechanisms that allow immune escape and viral persistence of HIV-1 in infected individuals. Such a mechanism may not only allow a viral variant to escape the CTL response but also facilitate the persistence of other viral strains that may otherwise be recognized and eliminated by HIV-specific CTLs. Whether CD4⁺ CTLs indeed exist in HIV-1-infected patients and participate in the cytotoxic response to the virus is still unclear. Nonetheless, our findings may have to be taken into consideration for the design and utilization of HIV-specific vaccines. Indeed, viral epitope-specific CD4⁺ CTLs, induced by vaccination, may be rendered anergic if an individual is infected with a viral population containing an epitope variant having partial agonist and anergic properties. Finally, it should be noted that it may be possible to manipulate anergized HIV-specific CTLs to restore their ability to respond to antigen stimulation. Such a strategy may consist in exposing APL-anergized T cells to heteroclitic peptides, which are essentially mutated versions of the native peptide antigen that can stimulate T cells more efficiently than the native peptide itself. It has recently been reported that treatment of in vivo-tolerized T cells, a phenomenon involving the induction of T-cell anergy, with heteroclitic peptides reverted the anergic phenotype of the T cells (70). This finding suggests that T-cell anergy may not be irreversible and that superinduction of the TCR expressed by anergic clones by heteroclitic peptides may rescue the cells and restore responsiveness to TCR ligation. Whether these phenomena also apply to CD8⁺ CTLs is now the focus of our investigations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the National Cancer Institute of Canada with funds from the Terry Fox Run, the Cancer Research Society Inc., and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. C.C. is a Research Scientist of the National Cancer Institute of Canada, supported with funds provided by the Canadian Cancer Society.

We are grateful to Robert F. Siliciano for the kind gift of the Ee217 T-cell clone and transfected APCs and to Andrew C. Chan for generously providing cDNA constructs. We also thank Nathalie Gauthier for excellent technical help, Franca Sicilia for flow cytometry analysis, Jacques Galipeau and our colleagues from the Terry Fox Molecular Oncology Group for helpful discussions throughout this project, and Janet E. Henderson for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Bachmann, M. F., D. E. Speiser, A. Zakarian, and P. S. Ohashi. 1998. Inhibition of TCR triggering by a spectrum of altered peptide ligands suggests the mechanism for TCR antagonism. *Eur. J. Immunol.* **28**:3110-3119.
- Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. A. Oldstone. 1994. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **68**:6103-6110.
- Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Pfeffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. H. Hahn, M. B. Oldstone, and G. M. Shaw. 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* **3**:205-211.
- Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, A. Berezovskaya, D. L. Barber, and L. M.

- Nadler. 1997. Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* **278**:124-128.
5. Callahan, K. M., M. M. Fort, E. A. Obah, E. L. Reinherz, and R. F. Siliciano. 1990. Genetic variability in HIV-1 gp120 affects interactions with HLA molecules and T cell receptor. *J. Immunol.* **144**:3341-3346.
 6. Chan, A. C., B. A. Irving, J. D. Fraser, and A. Weiss. 1991. The TCR ζ chain associates with a tyrosine kinase and upon TCR-stimulation associates with ZAP-70, a 70K Mr tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:9166-9170.
 7. Chan, A. C., M. Iwashima, C. W. Turck, and A. Weiss. 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. *Cell* **71**:649-662.
 8. Couture, C., G. Baier, A. Altman, and T. Mustelin. 1994. p56^{lck}-independent activation and tyrosine phosphorylation of p72 ^{syk} by T-cell antigen receptor/CD3 stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:5301-5305.
 9. Couture, C., G. Baier, C. Oetken, S. Williams, D. Telford, A. Marie-Cardine, G. Baier-Bitterlich, S. Fischer, P. Burn, A. Altman, and T. Mustelin. 1994. Activation of p56^{lck} by p72 ^{syk} through physical association and N-terminal tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **14**:5249-5258.
 10. Curiel, T. J., J. T. Wong, P. F. Gorczyca, R. T. Schooley, and B. D. Walker. 1993. CD4⁺ human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope-specific cytotoxic T lymphocytes derived from the peripheral blood cells of an HIV-1 infected individual. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**:61-68.
 11. Evavold, B. D., and P. M. Allen. 1991. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science* **252**:1308-1310.
 12. Evavold, B. D., J. Sloan-Lancaster, B. L. Hsu, and P. M. Allen. 1993. Separation of T helper 1 cytokines from proliferation and lymphokine production using analog peptides. *J. Immunol.* **150**:3131-3140.
 13. Faith, A., C. A. Akdis, M. Akdis, H.-W. Simon, and K. Blaser. 1997. Defective TCR stimulation in anergized type 2 T helper cells correlates with abrogated p56^{lck} and ZAP-70 tyrosine kinase activities. *J. Immunol.* **159**:53-60.
 14. Fields, P. E., T. F. Gajewski, and F. W. Fitch. 1996. Blocked Ras activation in anergic CD4⁺ T cells. *Science* **271**:1276-1278.
 15. Furuzawa, T., M. Itoh, N. X. Krueger, M. Streuli, and H. Saito. 1994. Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with the tyrosine-phosphorylated CD3 ζ chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:10928-10932.
 16. Hammond, S. A., R. C. Bollinger, P. E. Stanhope, T. C. Quinn, D. Schwartz, M. L. Clements, and R. F. Siliciano. 1992. Comparative clonal analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4⁺ and CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes isolated from seronegative humans immunized with candidate HIV-1 vaccine. *J. Exp. Med.* **176**:1531-1542.
 17. Hatada, M. H., L. Xiaode, E. R. Laird, J. Green, J. P. Morgenstern, M. Lou, C. S. Marr, T. B. Phillips, M. K. Ram, K. Theriault, M. J. Zoller, and J. L. Karas. 1995. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* **377**:32-38.
 18. Hu, W.-S., and H. M. Temin. 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**:1227-1232.
 19. Jackman, J. K., D. G. Motto, Q. Sun, M. Tanemoto, C. W. Turck, G. A. Peltz, G. A. Koretzky, and P. R. Findell. 1995. Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J. Biol. Chem.* **270**:7029-7032.
 20. Johnson, K. G., F. G. Leroy, L. K. Borysiewicz, and R. J. Matthews. 1999. TCR signaling thresholds regulating T cell development and activation are dependent upon SHP-1. *J. Immunol.* **162**:3802-3813.
 21. Johnson, R. P., S. A. Hammond, A. Trocha, R. F. Siliciano, and B. D. Walker. 1994. Induction of a major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte response to a highly conserved region of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 in seronegative humans immunized with a candidate HIV-1 vaccine. *J. Virol.* **68**:3145-3153.
 22. Johnson, R. P., A. Trocha, T. M. Buchanan, and B. D. Walker. 1992. Identification of overlapping HLA class I-restricted cytotoxic T cell epitopes in a conserved region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: definition of minimum epitopes and analysis of the effects of sequence variation. *J. Exp. Med.* **175**:961-971.
 23. Kerkau, T., I. Bacik, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, T. Hünig, A. Schimpl, and U. Schubert. 1997. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J. Exp. Med.* **185**:1295-1305.
 24. Kersh, E. N., A. S. Shaw, and P. M. Allen. 1998. Fidelity of T cell proliferation through multistep T cell receptor ζ phosphorylation. *Science* **281**:572-575.
 25. Klenerman, P., S. Rowland-Jones, S. McAdam, J. Edwards, S. Daenke, D. Laloo, B. Koppe, W. Rosenberg, D. Boyd, A. Edwards, P. Giagrande, R. E. Phillips, and A. J. McMichael. 1994. Naturally occurring HIV-1 gag variants antagonize cytotoxic T cell activity. *Nature* **369**:403-407.
 26. Koenig, S., A. J. Conley, Y. A. Brewah, G. M. Jones, S. Leath, L. J. Boots, V. Davey, G. Pantaleo, J. F. Demarest, C. Carter, C. Wan-nebo, J. R. Yannelli, S. A. Rosenberg, and H. C. Lane. 1995. Transfer of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes to an AIDS patient leads to selection for mutant HIV variants and subsequent disease progression. *Nat. Med.* **1**:330-336.
 27. Kong, G., M. Dalton, J. B. Wardenburg, D. Strauss, T. Kurosaki, and A. C. Chan. 1996. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol. Cell. Biol.* **16**:5026-5035.
 28. Koup, R. A. 1994. Virus escape from CTL recognition. *J. Exp. Med.* **180**:779-782.
 29. Kurane, I., L. Zeng, M. A. Brinton, and F. A. Ennis. 1998. Definition of an epitope on NS3 recognized by human CD4⁺ cytotoxic T lymphocyte clones cross-reactive for dengue virus types 2, 3, and 4. *Virology* **240**:169-174.
 30. LaFace, D. M., C. Couture, K. Anderson, G. Shih, J. Alexander, A. Sette, T. Mustelin, A. Altman, and H. M. Grey. 1997. Differential T cell signaling induced by antagonist peptide-MHC complexes and the associated phenotypic responses. *J. Immunol.* **158**:2057-2064.
 31. Lauritsen, J. P. H., M. D. Christensen, J. Dietrich, J. Kastrop, N. Odum, and C. Geisler. 1998. Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J. Immunol.* **161**:260-267.
 32. Lekutis, C., and N. L. Letvin. 1998. Substitution in a major histocompatibility complex class II-restricted human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitope can affect CD4⁺ T-helper-cell function. *J. Virol.* **72**:5840-5844.
 33. Lewinsohn, D. M., T. T. Bement, J. Xu, D. H. Lynch, K. H. Grabstein, S. G. Reed, and M. R. Alderson. 1998. Human purified protein derivative-specific CD4⁺ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms. *J. Immunol.* **160**:2374-2379.
 34. Li, W., C. D. Whaley, A. Mondino, and D. L. Mueller. 1996. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4⁺ T cells. *Science* **271**:1272-1276.
 35. Littaux, R. A., M. B. Oldstone, A. Takeda, and F. A. Ennis. 1992. A CD4⁺ cytotoxic T-lymphocyte clone to a conserved epitope on human immunodeficiency virus type 1 p24: cytotoxic activity and secretion of interleukin-2 and interleukin-6. *J. Virol.* **66**:608-611.
 36. Madrenas, J., and R. N. Germain. 1996. Variant TCR ligands: new insights into the molecular basis of antigen-dependent signal transduction and T-cell activation. *Semin. Immunol.* **8**:83-101.
 37. Madrenas, J., R. H. Schwartz, and R. N. Germain. 1996. Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9736-9741.
 38. Madrenas, J., R. L. Wang, J. L. Wang, N. Isakov, L. E. Samelson, and R. N. Germain. 1995. ζ phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* **267**:515-518.
 39. McMichael, A. J., and R. E. Phillips. 1997. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:271-296.
 40. Mikloska, Z., and A. L. Cunningham. 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J. Gen. Virol.* **79**:353-361.
 41. Mustelin, T., S. Williams, P. Taylor, C. Couture, G. Zenner, P. Burn, J. D. Ashwell, and A. Altman. 1995. Regulation of the p70 ^{zap} tyrosine protein kinase in T cells by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur. J. Immunol.* **25**:942-946.
 42. Olson, R. R., J. J. Reuter, J. McNicholl, C. Alber, E. Klohe, K. Callahan, R. F. Siliciano, and R. W. Karr. 1994. Acidic residues in the DR β chain third hypervariable region are required for stimulation of a DR(α ,B1*0402)-restricted T-cell clone. *Hum. Immunol.* **41**:193-200.
 43. Orentas, R. J., J. E. Hildreth, E. Obah, M. Ploydefkis, G. E. Smith, M. L. Clements, and R. F. Siliciano. 1990. Induction of CD4⁺ human cytolytic T cells specific for HIV-infected cells by a gp160 subunit vaccine. *Science* **248**:1234-1237.
 44. Phillips, R. E., S. Rowland-Jones, D. F. Nixon, F. M. Gotch, J. P. Edwards, A. O. Ogunlesi, J. G. Elvin, J. A. Rothbard, C. R. M. Bangham, C. R. Rizza, and A. J. McMichael. 1991. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**:453-459.
 45. Plas, D. R., R. Johnson, J. T. Pingel, R. J. Matthews, M. Dalton, G. Roy, A. C. Chan, and M. L. Thomas. 1996. Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science* **272**:1173-1176.
 46. Polydefkis, M., S. Koenig, C. Flexner, E. Obah, K. Gebo, S. Chakrabarti, P. L. Earl, B. Moss, and R. F. Siliciano. 1990. Anchor sequence-dependent endogenous processing of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160 for CD4⁺ T cell recognition. *J. Exp. Med.* **171**:875-887.
 47. Preckel, T., R. Grimm, S. Martin, and H. U. Weltzien. 1997. Altered hapten ligands antagonize trinitrophenyl-specific cytotoxic T cells and block internalization of hapten-specific receptors. *J. Exp. Med.* **185**:1803-1813.
 48. Price, D. L., P. J. Goulder, P. Klenerman, A. K. Sewell, P. J. Easterbrook, M. Troop, C. R. Bangham, and R. E. Phillips. 1997. Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:1890-1895.
 49. Purbhoo, M. A., A. K. Sewell, P. Klenerman, P. J. Goulder, K. L. Hilyard, J. I. Bell, B. K. Jakobsen, and R. E. Phillips. 1998. Copresentation of natural HIV-1 agonist and antagonist ligands fails to induce the T cell receptor signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:4527-4532.
 50. Raab, M., A. J. da Silva, P. R. Findell, and C. E. Rudd. 1997. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR ζ /CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* **6**:155-164.

51. Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* **388**:383–384.
52. Roberts, J. D., K. Bebenek, and T. A. Kunkel. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**:1171–1173.
53. Saag, M. S., B. H. Hahn, J. Gibbons, Y. Li, E. S. Parks, W. P. Parks, and G. M. Shaw. 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 *in vivo*. *Nature* **334**:440–444.
54. Salojin, K. V., J. Zhang, J. Madrenas, and T. L. Delovitch. 1998. T-cell anergy and altered T-cell receptor signaling: effects on autoimmune disease. *Immunol. Today* **19**:468–473.
55. Schwartz, O., V. Maréchal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J.-M. Heard. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**:338–342.
56. Sewell, A. K., G. C. Harcourt, P. J. Goulder, D. A. Price, and R. E. Phillips. 1997. Antagonism of cytotoxic T lymphocyte-mediated lysis by natural HIV-1 altered peptide ligands requires simultaneous presentation of agonist and antagonist peptides. *Eur. J. Immunol.* **27**:2323–2329.
57. Siliciano, R. F., T. Lawton, C. Knall, R. W. Karr, P. Berman, T. Gregory, and E. L. Reinherz. 1988. Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4⁺ T cell depletion. *Cell* **54**:561–575.
58. Sloan-Lancaster, J., B. D. Evavold, and P. M. Allen. 1993. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* **363**:156–159.
59. Sloan-Lancaster, J., A. S. Shaw, J. B. Rothbard, and P. M. Allen. 1994. Partial T cell signaling: altered phospho- ζ and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* **79**:913–922.
60. Tang, B., L. K. Myers, E. F. Rosloneic, K. B. Whittington, J. M. Stuart, and A. H. Kang. 1998. Characterization of signal transduction through the TCR- ζ chain following T cell stimulation with analogue peptides of type II collagen 260-267. *J. Immunol.* **160**:3135–3142.
61. Telander, D. G., E.-K. Malvey, and D. L. Mueller. 1999. Evidence for repression of IL-2 gene activation in anergic T cells. *J. Immunol.* **162**:1460–1465.
62. Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**:148–151.
63. van Oers, N. S. C., N. Killeen, and A. Weiss. 1996. Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J. Exp. Med.* **183**:1053–1062.
64. Wang, C., and G. A. Splitter. 1998. CD4⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity against macrophages pulsed with bovine herpesvirus 1 polypeptides. *J. Virol.* **72**:7040–7047.
65. Wardenburg, J. B., C. Fu, J. K. Jackman, H. Flotow, S. E. Wilkinson, D. H. Williams, R. Johnson, G. Kong, A. C. Chan, and P. R. Findell. 1996. Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J. Biol. Chem.* **271**:19641–19644.
66. Weiss, A., and D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**:263–274.
67. Wijburg, O. L., M. H. Heemskerck, A. Sanders, C. J. Boog, and N. Van Rooijen. 1996. Role of virus-specific CD4⁺ cytotoxic T cells in recovery from mouse hepatitis virus infection. *Immunology* **87**:34–41.
68. Yasukawa, M., Y. Yakushijin, and S. Fujita. 1996. Two distinct mechanisms of cytotoxicity mediated by herpes simplex virus-specific CD4⁺ human cytotoxic T cell clones. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **78**:70–76.
69. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**:83–92.
70. Zugel, U., R. Wang, G. Shih, A. Sette, J. Alexander, and H. M. Grey. 1998. Termination of peripheral tolerance to a T cell epitope by heteroclitic antigen analogs. *J. Immunol.* **161**:1705–1709.

**Uncoupling of T cell receptor-mediated activation of ZAP-70 and Erk-2
from interleukin-2 production following agonist peptide stimulation of anti-
CD3-energized CD4⁺ T lymphocytes**

Running Title: Partial signaling recovery in anergic CD4⁺ T cells

by

**Latifa Bouhdoud^{1,2} Abderrazzak Merzouki², Alexandra Petrou¹, Maximilian Arella²
Tomas Mustelin³, and Clément Couture^{1,4,5,6*}**

Molecular Oncology Group, Lady Davis Institute for Medical Research¹, Microbiology and
Biotechnology Research Center, INRS-Institut Armand-Frappier², Departments of Medicine⁴,
Microbiology and Immunology⁵, McGill University, and division of Hematology-Oncology,
Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital⁶, Montreal, Canada, and the Program of
Signal Transduction, Cancer Research Center, The Burnham Institute³

* Corresponding author. Mailing address: Lady Davis Institute for Medical Research, 3755
Côte Ste-Catherine Road, Montréal, QC, Canada, H3T 1E2. Phone: (514) 340-8260. Fax:
(514) 340-7573. E-mail: ccouture@ldi.jgh.mcgill.ca

Summary

Full activation of T lymphocytes requires signaling through the TCR, as well as co-stimulatory signals, most often provided by CD28. In the absence of co-stimulation, TCR stimulation results in a prolonged state of anergy during which the T cell can no longer respond to its antigenic peptide even when a proper co-stimulatory signal is provided. Similarly, TCR stimulation with altered peptide ligands (APLs), even in presence of co-stimulation, can also induce clonal anergy. In this study, we used an HIV-1 gp120-specific CD4⁺ human T cell clone to characterize the anergic state induced either by TCR ligation in absence of co-stimulation, or by APL stimulation of the same T cells. We show that pre-treatment of the T cells either with anti-CD3 antibody alone or with the anergy-inducing APL, prevented IL-2 secretion, T cell proliferation and functional activation following secondary stimulation of the cells with either anti-CD3/CD28 antibodies or with the antigenic peptide. Although both CD3- and APL-energized cells were unable to produce IL-2 or proliferate, we found that anti-CD3-energized cells responded to antigen with a normal tyrosine phosphorylation of TCR ζ , CD3 ϵ and ZAP-70, as well as Erk-2 activation and CD25 surface expression, but failed to activate c-Jun N-terminal kinase (JNK). This repression of JNK activation explains the inability of these cells to secrete IL-2. In contrast, none of these signaling events were observed in APL-energized cells in response to antigen, or in CD3-energized cells in response to anti-CD3/CD28. Our results demonstrate the existence of distinct molecular mechanisms of T cell anergy operating at different levels in the TCR signaling pathways. (259 words)

Introduction

CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes recognize short peptides, presented by antigen-presenting cells (APCs), in association with the products of the class II or class I MHC genes, respectively. The productive stimulation of these T lymphocytes, which results in cytokine production, proliferation and functional activation, not only requires the engagement of the TCR by the peptide/MHC complex, but also depends on the induction of co-stimulatory signals that are also delivered by the APCs. The signal generated by the interaction of the T cell surface molecule CD28 with its ligands (B7-1 or B7-2) expressed at the surface of the APCs, or by cross-linking of CD28 using specific antibodies, is sufficient to complement the TCR-generated signal and allow full T cell activation. It has been shown, in a variety of experimental systems, that TCR ligation in the absence of CD28 stimulation can result in a prolonged state of non-responsiveness, termed clonal anergy (1), in which the T cells remain alive but can no longer be induced to produce IL-2 or proliferate in response to antigenic stimulation, even when a proper costimulatory signal is provided (2). T cell clonal anergy can also be induced by presentation of suboptimal ligands, such as mutated antigenic peptides or altered peptide ligands (APLs) that can otherwise interact normally with the MHC gene products at the surface of the APCs and with the TCR itself (3). In this latter case, T cell anergy can be induced even in presence of CD28-derived signals.

The TCR is composed of an antigen-specific $\alpha\beta$ heterodimer that is non-covalently associated with dimers of the CD3 and ζ chains ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, and $\zeta\zeta$), which are required for the correct assembly and expression of the TCR at the cell surface (4-6). Signal transduction through this antigen receptor complex is mediated by conserved modules called immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAM), which are characterized by the presence of two Y-X-X-I/L

sequences separated by 6-8 variable amino acids. The CD3 γ , δ , and ϵ molecules each contain a single ITAM motif, whereas the ζ chain contains three ITAMs (7). These modules are thought to be responsible, and perhaps sufficient, for the initiation of several signaling cascades that lead to IL-2 secretion and T cell proliferation (8,9). Indeed, one of the first detectable events following TCR ligation is the phosphorylation of the TCR-associated CD3 and ζ chains on tyrosine residues (10), which is predominantly carried out by the Src-family tyrosine kinase Lck. The Lck-mediated phosphorylation of both tyrosine residues of an ITAM allows the recruitment of the cytoplasmic PTK ZAP-70, whose tandem SH2 domains interact predominantly with the phosphorylated ITAMs of the ζ and CD3 ϵ chains (11-13). This interaction allows the membrane-bound Lck to interact with ZAP-70 and phosphorylate the regulatory tyrosine 493 of ZAP-70, resulting in its catalytic activation (14-16). Once these TCR-proximal events have taken place, the activated ZAP-70 will recruit and phosphorylate cellular substrates, including the adaptor proteins LAT (17) and SLP-76 (18-20), which in turn couple the PTKs with the activation of Ras and the MAP kinases Erk-1, Erk-2, JNK and p38, as well as the release of free intracellular calcium from internal stores (21). These events lead to the activation of transcription factors, such as NFAT and AP-1, which are required for the activation of the IL-2 gene (22,23).

The co-ligation of CD28 is thought to complement the TCR-derived signals by strengthening some signaling pathways and induce additional signals that together enhance the transcriptional activation of the IL-2 promoter, particularly through JNK, which is required for the formation of AP-1 (Jun-Fos) complexes (reviewed in 24). Importantly, the lack of AP-1 formation has been correlated to the absence of IL-2 promoter activation in T cells that were rendered anergic by TCR engagement in absence of CD28 co-stimulation (25), as well as in superantigen-energized T cells (26,27). In contrast, the over-expression of Fos and the

formation of AP-1 complexes in antigen-specific T cells were reported to confer resistance to anergy-inducing stimuli (28).

Although the intracellular events triggered by anergy-inducing APLs and the mechanisms causing sustained T cell unresponsiveness are still to be fully defined, initial studies have shown that anergic T cells fail to induce several TCR-mediated early signaling events normally required for the inducible expression of IL-2. For example, anergic T cells are incapable of activating Lck, which results in the defective phosphorylation of the TCR ζ and CD3 ϵ chains and the recruitment of non-phosphorylated and inactive ZAP-70 to the TCR/CD3 complex (3,29-32). In addition, anergic T cells fail to activate Ras (33) and the MAP kinases Erk and JNK (34), and do not allow the transactivation of the AP-1 and NFAT transcription factors (25). Instead, anergic T cells seem to have increased Fyn activity (35), elevated PLC- γ 1 phosphorylation and higher concentrations of intracellular free Ca⁺⁺ (36,37). Anergic stimuli also induce the activation of Rap1, a small GTPase, which has been proposed to antagonize Ras activation and to actively repress IL-2 promoter activation (38), a process that might be inhibited by CD28 costimulation (39).

Despite intense investigations of the mechanisms causing T cell anergy, a unifying model of these events is lacking. This may be due to the use of several different experimental systems. Indeed, events reported to induce T cell anergy in one system may not occur in other cellular models. In addition, very few investigations have compared different methods of inducing T cell anergy in the same T cell. In this study, we used an HIV-1 specific CD4⁺ cytotoxic T cell clone (Een217) that recognizes a gp120-derived epitope (amino acids 410-425) presented in association with the HLA-DR4 class II MHC gene product (40), to compare the anergic phenotypes induced by APL stimulation with that resulting from TCR stimulation in absence

of co-stimulation. These T cells responded equally well to agonist peptide and anti-CD3/CD28 antibody stimulation, but failed to secrete IL-2 and proliferate in response to the same stimuli when previously anergized by either APL or anti-CD3 pre-treatment. Surprisingly, we found that stimulation of CD3-anergized T cells, but not APL-anergized cells, by the agonist ligand restored several TCR-proximal signaling events, such as full TCR ζ and ZAP-70 phosphorylation, Erk-2 activation and surface expression of CD25, the IL-2 receptor α -chain. Our findings suggest the existence of several levels of T cell clonal anergy, and the existence of a block in IL-2 transcription, which is maintained even when early TCR-mediated signaling events are restored.

Materials and Methods

Cells and peptides.

The Een217 T cell clone was generated by *in vitro* stimulation of PBMCs isolated from the blood of a normal, seronegative individual, with autologous monocytes pulsed with recombinant gp120 (40). This CD4⁺, HLA-DR4-restricted human cytotoxic T cell clone is specific for gp120 residues 410-429 of the HIV-1 strain PV22, presented by HLA-DR4. The generation of HLA-DR4-transfected murine L cells, used as antigen-presenting cells in our assays, has also been described (40). Een217 T cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin and streptomycin (each at 50 µg/ml) by periodic stimulation with 1-2 µg/ml PHA in the presence of 50 U/ml recombinant human IL-2 (Gibco-BRL), and irradiated (5000 rads) allogeneic PBMCs (2 x 10⁶/well). The cells were cultured without stimulation for 2.5 to 3 weeks prior to experimentation. The peptides representing gp120 residues 410-429 of HIV-1 strains PV22 (GSDTITLPCRIKQFINMWQE), HXB2 (GSDTITLPCRIKQIINMWQK) and CDC42 (TGDIITLPCRIKQIINRWQV) were synthesized at the Sheldon Biotechnology Center (McGill University, Montréal QC, Canada), using standard solid-phase methods. Crude peptides were purified by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. Peptides were analyzed for homogeneity by thin-layer chromatography, and their composition assessed by amino acid analysis of acid-hydrolyzed peptides. The molecular weight of each peptide was verified by mass spectrometry analysis. All peptides were >90% pure.

Stimulation of Een217 T cells with immobilized anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs.

Flat-bottomed 96-well plates were coated with goat anti-mouse (GαM) Ig antibodies [IgG+IgA+IgM (H+L); Zymed Laboratories, Inc.] at a concentration of 1 µg/well in 200 µl PBS for 2 h at 37°C. They were then washed twice with PBS and the indicated concentrations

of purified anti-CD3 mAb (Clone UCHT-1, Immunotech, a Coulter company) added, followed by incubation overnight at 37°C. After two washing cycles, the plates were blocked with RPMI 1640 containing 10% FBS for 1 h. Anti-CD28 mAb (Clone CD28.2, Immunotech) was added at a final concentration of 0.1 µg/well with 5×10^4 Ee217 T cells in a final volume of 200 µl of culture medium without IL-2. After 24 h at 37°C, 1 µCi of [³H]TdR (Mandel) was added to each well. Forty-eight hours later, the cells were harvested and [³H]TdR incorporation was measured by scintillation counting. All determinations were performed in triplicate. Since 50% maximal proliferation was reached at 2.4 ng of anti CD3 mAb/well, all subsequent antibody stimulations were performed using this concentration.

Induction of T cell anergy by the HXB2-derived APL or immobilized anti-CD3 mAb.

Anergy induction by the HXB2-derived peptide was performed by pre-treatment of the T cells with irradiated HLA-DR4⁺ APCs pulsed with 10 nM peptide as described (41). The cells were then rested for 48 h, and stimulated with either the PV22 agonist peptide or anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs, in a standard proliferation assay. Antibody-mediated anergy of Ee217 T cells was induced essentially as described previously (42,43). Briefly, 1 µg GαM in 200 µl PBS was added to 24-well tissue culture plates. After incubation for 2 h at 37°C, the plates were washed extensively with PBS, and increasing quantities of anti-CD3 mAb (0.24 ng to 4.9 ng/well) were added in 200 µl PBS. After incubation overnight at 37°C, the plates were washed twice, and 5×10^5 Ee217 T cells in 1ml of culture medium without IL-2 added to each well. After 48 hours at 37°C, the T cells were recovered, washed three times and rested for 2 days in absence of IL-2 before being tested in proliferation assays. To measure the proliferative responses, the T cells were restimulated in a 96-well plate with immobilized anti-CD3 (2.4 ng/well) and anti-CD28 mAbs as described above, or with irradiated DR4⁺ APCs pulsed with the indicated concentrations of the PV22 agonist peptide (41), in a standard

proliferation assay. All determinations were made in triplicate. The analysis of several independent experiments indicated that maximal Ee217 T cell anergy was obtained when the T cells were pre-treated with 1.2 ng anti-CD3 mAb.

Prevention and reversal of anergy by IL-2.

To prevent the anergic state induced by immobilized anti-CD3 mAb or by the HXB2-derived peptide, exogenous IL-2 (50 U/ml) was added at the beginning of the 48 h stimulation with immobilized anti-CD3 mAb or with the APL, and removed by washing at the beginning of the rest period (41). To reverse the anergic state, exogenous IL-2 was added during the 48 h recovery period preceding the stimulation with either immobilized anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs, or irradiated DR4⁺ APCs pulsed with 10 nM PV22-derived peptide.

Cytotoxicity assay.

The cytolytic activity of anergized Ee217 T cells was measured in a standard ⁵¹Cr release assays as recently described (41). Target cells (HLA-DR4⁺ L cells; 2 X 10⁶ cells/ml) were pulsed with the indicated concentrations of PV22- or CDC42-derived peptides for 16 h at 37°C, washed and labeled for 1.5 h at 37°C with 100 µCi of sodium [⁵¹Cr]-chromate (Mandel). Labeled target cells were washed three times and seeded in v-bottomed 96-well plates at 10⁴ cells/well in a volume of 100 µl of medium without IL-2. Ee217 T cells, anergized by immobilized anti-CD3 mAb (1.2 ng), or by HXB2-derived peptide (10 nM), or control Ee217 T cells pretreated with either Goat anti-mouse (1 µg), or 10 nM CDC42-derived peptide, were subsequently added to give an effector-to-target ratio of 20:1. The plates were centrifuged at 1,800 rpm for 1 min to promote cell-cell contact and were incubated at 37°C for 6.5 h. The plates were then centrifuged at 4°C. Supernatants were collected and ⁵¹Cr release was measured and converted to percent specific lysis, according to the formula

$[(E-C)/(M-C)] \times 100$, with E as the experimental value in cpm, C as the control release value, and M as the maximal release value. C was determined as the average release in control wells in which effector cells had been omitted, and M was determined as the average release in wells where a 0.5% Triton X-100 solution was added in place of effector cells. All determinations were made in triplicate.

Stimulation of Ee217 T cells, immunoprecipitations and immunoblotting.

After a 48 h pre-culture at 37°C with immobilized G α M alone or G α M plus anti-CD3 mAb, or with peptide-pulsed HLA-DR4⁺ L cells in 24-well tissue culture plates, Ee217 T cells were rested for 48 h and restimulated with either PV22-derived peptide as described previously (41) or anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs as described above. The stimulation was terminated by adding 500 μ l of ice-cold PBS in each well. The plates were transferred immediately to ice, where the cells were harvested using a cell scraper. The cells were then transferred to microfuge tubes, and centrifuged at 1,500 rpm for 30 sec. Cell pellets were lysed with 500 μ l of ice-cold lysis buffer containing 1% Triton, 20 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 5 mM NaF, 5 mM EDTA, protease inhibitors (1mM PMSF, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin and 100 μ g/ml soybean trypsin inhibitor), and phosphotyrosine phosphatase inhibitor (1 mM sodium orthovanadate). Cell lysates were incubated for 30 min on ice and cleared of insoluble material by ultra-centrifugation. ZAP-70 was immunoprecipitated from post-nuclear lysates exactly as described elsewhere (44). Immune complexes were resolved on 13% SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with the 4G10 anti-phosphotyrosine or 2F3.2 anti-ZAP-70 mAbs (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies. The blots were developed by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham), according to the manufacturer's instructions. In some experiments, aliquots of whole cell lysates were

resolved on 10% polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose, and immunoblotted with anti-active MAPK (pTEpY; Promega), or anti-Erk 2 polyclonal Abs (C-14; Santa Cruz Biotechnology) as described above. The data presented are representative of experiments performed at least three times.

GST-SH2 pull-down of tyrosine-phosphorylated TCR ζ and CD3 ϵ .

The tandem SH2 domain region of the human ZAP-70 cDNA (corresponding to amino acids 1-260) was amplified by PCR using the cDNA described by Chan and co-workers (15) as a template. The 780-nucleotide PCR fragment was subcloned into the pGEX-3T expression vector and sequenced. The resulting GST-Zap (SH2)₂ fusion protein was expressed in *E. coli* and purified as previously described (44-46). The ability of this fusion protein to interact with phospho-TCR ζ and -CD3 ϵ was verified by specific immunoblotting (41; not shown). For precipitation of the tyrosine-phosphorylated ζ and CD3 ϵ chains from peptide-stimulated Een217 cells, the cell lysates were incubated with 5 μ g GST-Zap(SH2)₂ for 1 h at 4°C. The fusion protein was then precipitated by addition of 25 μ l glutathione sepharose beads. The beads were washed and the bound proteins were separated on 13% SDS polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose and immunoblotted with the 4G10 anti-phosphotyrosine mAb or with anti-GST mAb (B-14; Santa Cruz Biotechnology) as described above.

Determination of CD25 surface expression.

Een217 T cells were pre-treated with APCs pulsed with 10 nM HXB2 peptide or immobilized anti-CD3 mAb to induce anergy, or with G α M alone as control. The cells were washed, rested for 48 h and stimulated with 10 nM PV22 peptide or with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs (2.4 ng/0.1 μ g) for 48 h. at 37°C. The culture supernatants were recovered and stored at -20°C for IL-2 measurements (see below). The cells were washed and incubated with 10 μ l of

rhodamine-conjugated anti-CD25 mAb (clone B1.49.9; Beckman Coulter) for 1 h at room temperature. The cells were washed and CD25 surface expression was measured using an EPICS flow cytometer (Coulter, Miami, Fla).

IL-2 production assay.

Een217 T cell culture supernatants were assayed for the presence of IL-2 using the IL-2 dependent cell line CTLL-2 in a standard proliferation assay. Briefly, the culture supernatants generated above were serially diluted and placed in triplicate in a 96-well plate (50 μ l/well) together with 4×10^4 CTLL-2 cells in a final volume of 100 μ l/well. The plates were incubated at 37°C for 16 h following which 1 μ Ci of [³H]TdR (Mandel) was added to each well. The cells were incubated for 16 h and [3H]TdR incorporation was measured by scintillation counting. The data are expressed as Units/ml, relative to a standard 100 U/ml of recombinant human IL-2.

JNK activity assay.

Lysates from anti-CD3-energized Een217 T cells were generated following re-stimulation with PV22-pulsed APCs as described above. Five micrograms of purified GST-c-Jun (amino acids 1-79; ref. 47) fusion protein were added to each sample, and the lysates were incubated for 2 hours at 4°C. Glutathione-conjugated agarose beads (30 μ l of a 50% slurry) were added to each sample, and the tubes incubated for an additional 30 min at 4°C. The precipitated material was washed four times with HBB buffer (20mM Hepes, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 2.5mM MgCl₂, 0.05% Triton, pH 7.7), and twice with kinase buffer (20mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 20mM MgCl₂, pH7.5) without ATP. Following the last washing cycle, 1 μ M ATP containing 10 μ Ci [³²P]- γ ATP were added to each sample, and the kinase reaction was allowed to proceed for 30 min at 30°C. The proteins were finally subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and exposed to film.

Results

Antibody-induced activation (anti-CD3/CD28) and anergy (anti-CD3) of Een217 T cells.

In addition to TCR ligation, the productive activation of normal human T lymphocytes requires a second stimulus, most often provided by the interaction of the T cell surface molecule CD28 with its APC-bound ligands. The absence of this costimulatory signal will prevent TCR-dependent IL-2 secretion and proliferation, and will lead to a state of anergy. In this study, we wanted to compare APL-mediated anergy to anti-CD3-induced anergy using the same T cell line. For this reason, we first had to define the conditions where anti-CD3/CD28-induced proliferation and CD3-mediated clonal anergy would be comparable to the levels of peptide-induced proliferation and anergy obtained previously (41). In order to establish optimal conditions for the stimulation of Een217 T cells with antibodies to the TCR/CD3 complex and CD28, we performed a dose response analysis in which resting Een217 T cells were exposed to a constant quantity of anti-CD28 (0.1 μ g) and increasing concentrations of anti-CD3 ϵ antibodies. Using a standard proliferation assay, we detected a dose-dependent response of the Een217 T cells to the anti-CD3/CD28 antibody combination (figure 1a). No proliferation was detected when the T cells were treated with either of the two antibodies alone (not shown). Overall, we observed that maximal response was obtained when the cells were treated with 2.4 ng of anti-CD3 plus 0.1 μ g of anti-CD28 (figure 1a). These concentrations of anti-CD3 and anti-CD28 mAbs were used throughout this study to induce T cell proliferation.

Stimulation of T cells with immobilized anti-CD3 mAb alone can be used to mimic TCR occupancy in absence of costimulation (42). To determine whether TCR stimulation of Een217 T cells was sufficient to induce T cell anergy, Een217 T cells were pre-treated for 48 hours with increasing concentrations of immobilized anti-CD3 mAb, rested for another 48

hours, and finally challenged with a mitogenic combination of anti-CD3 (2.4 ng) plus anti-CD28 (0.1 µg) mAbs in a standard proliferation assay. As depicted in figure 1b, anti-CD3 pre-treatment induced a dose-dependent inhibition of CD3 x CD28 mediated Ee217 T cell proliferation. We also determined that the pre-treatment of the T cells with 1.2 ng of anti-CD3 caused a ~95% reduction of the proliferative response induced by CD3 x CD28 stimulation. This concentration of anti-CD3 mAb was used to induce T cell anergy in subsequent experiments.

CD3-induced unresponsiveness to PV22 stimulation.

We recently reported that Ee217 T cells could be rendered anergic by treatment of the cells with the natural APL isolated from gp120 of the HXB2 strain of HIV-1, which differed from the antigenic PV22-derived agonist peptide by only two amino acids (41). To determine whether unresponsiveness to the PV22 peptide could also be induced by anti-CD3 treatment, we incubated resting T cells with either anti-CD3 plus a secondary goat anti-mouse (GαM) cross-linking antibody, or with the secondary antibody alone. The cells were rested for 48 h., and stimulated by co-culture with HLA-DR4⁺ APCs pulsed with increasing concentrations of PV22 (41) in a standard proliferation assay. As shown in figure 2a, we found that anti-CD3 treatment of the T cells prevented TCR-induced proliferation in response to PV22. This experiment demonstrates that anti-CD3-induced anergy cannot be overcome by the stimulation of the T cells by its physiological ligand, the PV22 antigenic peptide/HLA-DR4 MHC complex.

HXB2-induced unresponsiveness to anti-CD3/CD28 stimulation.

We had previously established that the stimulation of Ee217 T cells with HLA-DR4⁺ APCs pulsed with 10 nM of the HXB2-derived APL caused an anergic state that prevented the

PV22-derived agonist peptide from inducing T cell proliferation (41). We now wished to determine whether the HXB2 APL could also render the T cells unresponsive to the anti-CD3 plus anti-CD28 antibody combination. Resting Ee217 T cells were co-cultured for 48 h with HLA-DR4⁺ APCs pulsed with increasing concentrations of the HXB2-derived peptide, or with a control peptide derived from the CDC42 strain of HIV-1 that does not induce Ee217 T cell proliferation or anergy (41). The cells were then recovered and rested for 48 hours, after which they were stimulated with the mitogenic combination of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in a proliferation assay. As depicted in figure 2b, HXB2 pre-treatment prevented antibody-induced T cell proliferation, whereas the CDC42 peptide had a minimal effect. Maximal anergy to antibody stimulation was obtained when the T cells were exposed to 10 nM HXB2, the same concentration that induced maximal anergy to PV22 stimulation (41). Since the treatment of Ee217 T cells with 10 nM HXB2 does not cause internalization of either TCR/CD3 or CD4 (41), it is unlikely that the inability of the T cells to respond to anti-CD3/CD28 was due to a decrease in the surface expression of either TCR or CD3ε.

PV22 cannot induce the cytotoxic function of anti-CD3-energized Ee217 T cells.

Our recent demonstration that the pretreatment of Ee217 T cells with the HXB2-derived APL peptide completely abrogated the induction of the cytotoxic activity of Ee217 T cells normally observed in response to the PV22 agonist ligand (41) prompted us to determine whether anti-CD3 mAb pre-treatment could also prevent the induction of the CTL activity of the T cells by the antigenic PV22 peptide. Resting Ee217 T cells were incubated for 48 h with either anti-CD3 plus a secondary GαM cross-linking antibody, the GαM secondary antibody alone, or HLA-DR4⁺ APCs pulsed with 10 nM of either HXB2 or CDC42 peptides. The cells were recovered and rested for 48 h in fresh medium without IL-2, and then challenged with increasing concentrations of either PV22 or CDC42 peptides in a standard

cytotoxicity assay, using peptide-pulsed ^{51}Cr -loaded HLA-DR4⁺ L cells as target cells. As shown in figure 3, we found that both anti-CD3/G α M and HXB2 treatment of the T cells prevented TCR-induced cytotoxic activation in response to PV22. In contrast, preincubation of the T cells with the secondary G α M antibody alone or with CDC42-pulsed APCs did not interfere with the dose-dependent induction of the cytotoxic function of the Ee217 T cells toward PV22-pulsed target cells. These results indicate that the pre-treatment of Ee217 T cells with either anti-CD3 mAb (occupancy of TCR in absence of costimulation) or HXB2-derived peptide (APL stimulation in presence of costimulation) induce the same degree of unresponsiveness of the T cells to both PV22 or TCR/CD28 stimulation.

HXB2- and anti-CD3-induced T cell anergy can be prevented or reversed by IL-2.

We and others have shown that APL-induced T cell anergy can be prevented by addition of exogenous IL-2 at the time of (or immediately following) APL stimulation, suggesting that the anergic phenotype is caused primarily by the inability of the T cells to secrete IL-2 in response to agonist stimulation. To determine whether anti-CD3-induced T cell anergy could also be prevented by addition of IL-2, we treated Ee217 T cells with either the secondary G α M antibody alone, anti-CD3 plus G α M, or with HLA-DR4⁺ APCs pulsed with 10 nM of either HXB2 or CDC42. In absence of exogenous IL-2, we found that anti-CD3/G α M or HXB2 pre-treatment induced T cell unresponsiveness to either PV22 (10 nM) or anti-CD3/CD28 stimulation (figure 4; black bars). No anergy was observed when the T cells were pre-treated with the secondary G α M antibody alone, or with CDC42-pulsed APCs. Importantly, we found that the addition of IL-2 to anti-CD3- or HXB2-treated cells, either at the time of pre-treatment (striped bars) or during the 48-hour rest period prior to PV22 or anti-CD3/CD28 stimulation (open bars), prevented T cell unresponsiveness toward both stimuli. Since the pre-treated Ee217 T cells proliferated normally in presence of exogenous IL-2, this

experiment indicates that both APL- and anti-CD3-induced T cell anergy share the same primary defect, namely the inability to secrete IL-2 in response to mitogenic stimulation.

PV22 restores TCR-induced tyrosine phosphorylation of ZAP-70 in anti-CD3-energized cells.

Thus far, our comparative analysis of APL- and anti-CD3-induced Ee217 T cell anergy did not reveal any functional differences between them. However, TCR-mediated induction of IL-2 secretion is dependent on several signaling pathways that could potentially be differentially affected by anti-CD3- or APL treatment of the T cells. Therefore, a comparison of the TCR-proximal and distal signaling events generated by PV22 and anti-CD3/CD28 mAbs stimulation of HXB2- or anti-CD3-energized Ee217 T cells was undertaken.

First, the TCR-induced phosphorylation of ZAP-70 on tyrosine residues was assessed in responsive versus anergic cells. Resting Ee217 T cells were incubated for 48 hours in presence of either G α M antibody alone or G α M-cross linked anti-CD3 antibody, or with HLA-DR4⁺ APCs pulsed with 10 nM HXB2. The T cells were then recovered, washed extensively, and allowed to rest for 48 hours in absence of IL-2. The T cells were finally stimulated with the mitogenic combination of anti-CD3/CD28 mAbs, or with fresh APCs pulsed with 10 mM PV22 for 0, 1 or 5 minutes, as indicated. The T cells were then lysed, and ZAP-70 was immunoprecipitated and analyzed by anti-phosphotyrosine immunoblotting. As depicted in figure 5, both PV22 and anti-CD3/CD28 stimulation of non-energized (G α M pre-treated) cells induced similar levels of ZAP-70 phosphorylation within 5 minutes (lanes 6, 7 and 13, 14). ZAP-70 phosphorylation was not detected in HXB2-energized cells in response to the PV22 agonist peptide or to anti-CD3/CD28 mAbs stimulation (lanes 8-12). However,

PV22 stimulation, but not anti-CD3/CD28 treatment, restored normal TCR-mediated ZAP-70 phosphorylation in anti-CD3-energized T cells (lanes 1-5).

PV22 stimulation also restores TCR-mediated phosphorylation of the CD3 ϵ and TCR ζ chain in anti-CD3-energized T cells.

The enzymatic activation and tyrosine phosphorylation of ZAP-70 in response to TCR ligation require the full phosphorylation of the ITAM motifs of the TCR ζ and CD3 chains. Although TCR ζ has been shown to undergo partial tyrosine phosphorylation in response to APLs (3,29,48), the TCR-associated CD3 ϵ chain remained unphosphorylated. To determine whether PV22 could also restore the inducible phosphorylation of the TCR ζ and CD3 ϵ chains in anti-CD3-energized Ee217 T cells, we repeated the cell treatments described above and precipitated the TCR accessory chains using a GST fusion protein containing the tandem SH2 domain region of ZAP-70 [herein referred to as GST-Zap(SH2)₂; 41]. The protein complexes were then subjected to SDS-PAGE and analyzed by anti-phosphotyrosine immunoblotting. As shown in figure 6, the productive stimulation of Ee217 T cells for 5 min with either anti-CD3/CD28 mAbs or PV22 induced a strong phosphorylation of TCR ζ and a ~26kDa phosphoprotein corresponding to CD3 ϵ (Lanes 7 and 14). Pre-treatment of the cells with either anti-CD3 mAb or HXB2 prevented this inducible event in response to CD3/CD28 stimulation. However, PV22 stimulation restored both TCR ζ and CD3 ϵ phosphorylation in anti-CD3 energized T cells (Lane 3), but not in HXB2-energized cells (Lanes 9 and 10). This series of experiments demonstrates that although both TCR ζ and ZAP-70 phosphorylation can be restored to normal levels by PV22 stimulation of CD3-energized cells, these events are nonetheless insufficient to induce cellular proliferation and functional cytotoxic activation.

PV22 stimulation restores Erk-2 activation in anti-CD3-energized Ee217 T cells.

The ability of PV22 to restore TCR signaling in anti-CD3 energized T cells was also reflected at the downstream level of MAP kinase activation. Cell lysates from the experiment described above were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and analyzed by immunoblotting using a monoclonal antibody recognizing the active, doubly phosphorylated forms of the MAP kinases Erk-1 and Erk-2 (figure 7). As expected, PV22 or anti-CD3/CD28 stimulation of T cells that were not energized (G α M pre-treated) resulted in Erk-1 and 2 activation within 5 minutes of TCR stimulation. T cells that were rendered anergic by pre-treatment with the HXB2 APL failed to upregulate Erk activity when re-stimulated with either anti-CD3/CD28 mAbs or with the PV22 agonist peptide (Lanes 10 to 13). Although CD3/CD28 antibody stimulation of CD3-energized T cells failed to induce Erk activation (Lanes 4 and 5), stimulation of these anergic T cells for 5 minutes with the PV22 agonist peptide resulted in normal levels of Erk-1/2 activation (Lane 3). These variations in Erk activity cannot be explained by the modulations in MAP kinase expression levels, since identical amounts of Erk-2 were present in each sample (figure 7, lower panel).

PV22-inducible expression of the IL-2 receptor α chain (CD25) in anti-CD3-energized cells.

In addition to the IL-2 secretion deficiency, other forms of cytokine-dependent T cell anergy have been reported to be overcome by IFN- γ or IL-12 rather than IL-2. T cells of this phenotype arose in the spleen of mice that had been exposed twice to antigenic stimulation, on the day of birth and at the age of 7 weeks (49). Importantly, these mice secreted normal levels of IL-2 upon further exposure to their cognate antigen, but failed to proliferate due to the inability of these cells to express the IL-2 receptor α chain. Although CD3-energized Ee217 T cells were able to proliferate normally when we added IL-2 (50 U/ml) to the

system, we wished to determine whether CD25 expression was induced when these energized cells were stimulated with either CD3/CD28 antibody combination, or with the PV22 peptide. Flow cytometric analysis of CD25 expression revealed that both CD3/CD28- and PV22-mediated stimulation of resting Ee217 T cells were equally potent in inducing CD25 expression (table 1), resulting in a >99% expression of the antigen at high density (MFI>9). When the T cells were energized by HXB2 pre-treatment, both anti-CD3/CD28 and PV22 failed to induce high density CD25 expression (MFI~3). Remarkably, PV22 stimulation of CD3-energized Ee217 T cells restored normal, high density CD25 expression, whereas CD3/CD28 stimulation of these cells failed to induce elevated CD25 expression.

PV22 is unable to induce IL-2 production in anti-CD3 energized T cells.

We have shown that the addition of exogenous IL-2, at a concentration of 50 U/ml, prevented the induction of energy by either the HXB2-derived APL or anti-CD3 mAb (figure 4). This result indicated that the restimulation of anti-CD3 or HXB2-energized T cells with either PV22 or anti-CD3/CD28 mAbs failed to generate enough IL-2 to drive T cell proliferation. Despite the fact that PV22 stimulation of anti-CD3-energized cells restored early signaling events, MAP kinase activation and surface expression of the high affinity IL-2 receptor (CD25), the cells remained unable to secrete mitogenic concentrations of IL-2. To further document this deficiency, we directly measured the concentration of IL-2 generated following the stimulation of resting, anti-CD3- or HXB2-energized Ee217 T cells with either PV22 or the anti-CD3/CD28 antibody combination. Ee217 T cells were first treated with either G α M alone, G α M plus anti-CD3 or HLA-DR4⁺ APCs pulsed with 10 nM HXB2 as before. The cells were then recovered, rested for 48 h at 37°C, and challenged with either medium alone, anti-CD3/CD28 mAbs or with PV22-pulsed APCs. The culture supernatants were collected 48 h later, serially diluted, and used to stimulate the proliferation of the IL-2-dependent T cell

line CTLL-2, in a standard proliferation assay. As shown in figure 8, PV22 and CD3/CD28 stimulation of G α M-pre-treated T cells generated identical concentrations of IL-2, which again confirms that both stimuli are equally potent in inducing Ee217 T cell activation. As expected, anti-CD3/28 stimulation of anti-CD3- or HXB2-energized T cells failed to induce IL-2 production, whereas PV22 was unable to activate HXB2-energized T cells. Importantly, despite the fact that PV22 was able to rescue TCR-mediated early signaling events as well as CD25 expression in anti-CD3-energized Ee217 T cells, the agonist peptide was unable to induce IL-2 secretion by these antibody-energized cells. As a control, serial dilutions of a 100 U/ml IL-2 stock were used to stimulate the proliferation of CTLL-2 cells. This allowed us to estimate that the productive stimulation of G α M-pretreated T cells by PV22 or CD3/CD28 mAbs generated between 50 and 60 U/ml IL-2, whereas the stimulation of energized T cells resulted in IL-2 concentrations below 10 U/ml. Together, these data indicate that while some signaling pathways were restored by PV22 stimulation of anti-CD3-energized cells, some signaling events required for inducible IL-2 production remained deficient.

Antigenic peptide stimulation of anti-CD3-energized T cells results in reduced activation of JNK.

The transcriptional activation of the IL-2 gene depends on the formation of the AP-1 composite transcription factor. The activation of Erk-2 is thought to participate in the formation of AP-1 by augmenting the transcriptional activation of *c-fos* through the transcription factor Elk-1 (50). The formation of AP-1 also requires the presence of phosphorylated c-Jun, which is carried out by the c-Jun N-terminal kinase JNK (reviewed in 51). Since PV22 stimulation of anti-CD3 energized Ee217 T cells failed to induce IL-2 secretion, despite the fact that Erk-2 activation was restored, we reasoned that the activity of JNK may be deficient in these cells.

To assess the activity of JNK, we relied on the ability of the kinase to bind to the amino-terminal sequence of c-Jun and to phosphorylate it at two serine residues located at positions 63 and 73 (52). Anti-CD3 energized Ee217 T cells were challenged with either the PV22 antigenic peptide or anti-CD3/CD28 mAbs for 0, 1 and 5 minutes, as described above. Cell lysates were incubated for 2 hours with 5 μ g of a GST fusion protein containing amino acids 1-79 of c-Jun (47), and the c-Jun (1-79)/JNK complex was precipitated by addition of glutathione-conjugated agarose beads. Following extensive washes, 10 μ Ci [32 P] γ -ATP was added and the kinase reaction was allowed to proceed for 30 min. The phosphoproteins were then separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and exposed to film. As shown in figure 9, JNK activity was induced following CD3/CD28 stimulation of fresh Ee217 T cells, but not in anti-CD3-energized T cells. Strikingly, PV22 stimulation of anti-CD3-energized T cells caused a time-dependent repression in JNK activity. This event did not occur when the same cells were challenged with anti-CD3/CD28, or when HXB2-energized T cells were stimulated with either PV22 or anti-CD3/CD28 (not shown). This result provides a plausible explanation for the inability of anti-CD3-energized Ee217 T cells to produce IL-2 and proliferate even when Erk-2 activation is restored.

Discussion

In this report, we describe a system in which we were able to systematically compare anti-CD3- and APL-induced T cell anergy of an HIV-1 gp120-specific T cell clone (Een217), and the ability of two mitogenic stimuli (agonist peptide-pulsed APCs and anti CD3+CD28 mAb combinations) to overcome the unresponsiveness of these anergized T cells. First we defined experimental conditions in which equal proliferative and cytotoxic responses of the Een217 T cell clone were observed in response to either PV22 agonist peptide-pulsed APCs, or to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. The activation of Een217 T cells with 0.1 μ g anti-CD28 and 2.4 ng anti-CD3 caused the same levels of proliferation, cytotoxic activation, IL-2 secretion and CD25 surface expression as those observed with Een217 cells stimulated with HLA-DR4⁺ APCs pulsed with 10 nM PV22. In addition, both stimuli resulted in comparable levels of TCR ζ , CD3 ϵ and ZAP-70 tyrosine phosphorylation, and Erk-2 MAP kinase activation. More importantly, we found that the pretreatment of the Een217 cells with 1.2 ng anti-CD3 mAb in absence of anti-CD28 caused the T cells to become unresponsive not only to anti-CD3/CD28 stimulation, but also to PV22 agonist peptide stimulation. Similarly, HXB2-treated T cells were unable to respond to both anti-CD3/CD28 and PV22 stimulation in either proliferation or cytotoxicity assays. As we have established in an earlier report (41), the addition of exogenous IL-2 to either HXB2- or anti-CD3- treated T cells prevented T cell anergy and allowed the cells to proliferate in response to anti-CD3/CD28 and PV22 stimulation, validating the concept that the inability of anergic T cells to proliferate in response to TCR stimulation is due to inhibition of IL-2 gene expression, and that anergy can be reversed by signaling through the IL-2 receptor γ_c chain (52a, 30). It is therefore highly unlikely that the unresponsive phenotype of the anergized cells was due to a decreased viability of the T cells or to an inability to support IL-2-driven proliferation. In all functional aspects, anti-CD3- and HXB2-anergized Een217 T cells are phenotypically indistinguishable.

The outcome of TCR stimulation is thought to be dependent on the ability of a TCR ligand to induce Lck activation to catalyze complete phosphorylation of the ITAM motifs of the TCR-associated CD3 and ζ chains. Under these circumstances, ZAP-70 is both recruited and activated (53), which leads to the activation of Ras and of the Erk and JNK MAP kinase pathways. These events are not detected in T cells exposed to a suboptimal ligand such as anergy-inducing APLs (29,30,41) and antagonist variant peptides (3), or following optimal stimulation of previously anergized T cells (38, 52b). Therefore, the sequential phosphorylation of the six ITAMs (12 tyrosines) of the ζ - ζ homodimer may work as a kinetic proofreading mechanism that prevents the T cells from responding to low affinity and/or short-lived TCR engagement by suboptimal ligands (40,53,reviewed in 54). We describe here a state in which complete TCR ζ and CD3 ϵ phosphorylation are induced, but IL-2 secretion, T cell proliferation and cytotoxic function are not detected. The stimulation of anti-CD3-energized Een217 T cells with the antigenic PV22 peptide generated a signal that induced optimal ZAP-70 phosphorylation and Erk-2 activation, which suggest that the repression of Ras normally observed in anergized human T cells had been lifted. However, the block in IL-2 production was maintained, suggesting that some signaling pathways may still have been repressed despite the restoration of TCR-proximal signaling events, or that IL-2 promoter transcriptional inhibitors such as Nil-2 or the NRE-A binding factor (55) might have remained active.

The small GTPase Rap-1 has been reported to antagonize Ras activation following TCR stimulation of anergized T lymphocytes (38), possibly through competition for common effector molecules. Since Erk-2 activation is restored to normal levels following PV22 stimulation of anti-CD3 energized Een217 T cells, the activation of Ras is most likely fully

restored and is not antagonized. Instead, we detected a repression of the basal activity of JNK within 1 minute of agonist peptide stimulation of anti-CD3-energized cells, an event that did not occur in cells where the activation of Erk-2 had not been restored. It is therefore possible that, in this experimental system, the outcome of TCR stimulation of normal and energized T cells depends on whether or not the stimulus can activate both Erk-1/2 and JNK. Importantly, the activation of JNK has been shown to increase the stability of the IL-2 mRNA in stimulated T cells (56). The inhibition of JNK may provide a mechanism that would prevent the activation and proliferation of anergic T cells by stimuli able to restore early signaling (56). The enzymes responsible for the negative regulation of the JNK pathway may have an important role in maintaining the anergic phenotype following mitogenic stimulation of energized T cells.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Robert F. Siliciano for the kind gift of the Ee217 T cell clone and HLA-DR4⁺ APCs, Dr. Andrew C. Chan for generously providing ZAP-70 cDNA constructs, and Dr. Antonis Koromilas for the GST-c-jun (1-79) fusion construct. We also wish to thank Ms. Nathalie Gauthier for excellent technical help, Ms. Franca Sicilia for FACS analysis, and our colleagues from the Terry Fox Molecular Oncology Group for helpful discussions throughout this project.

This work was supported by grants from the National Cancer Institute of Canada (to C.C.) with funds from the Terry Fox Run, the Cancer Research Society Inc. and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec., and grants AI48032, AI35603, and AI40552 from the National Institutes of Health (to T.M.). C.C. is a Research Scientist of the National Cancer Institute of Canada, supported with funds provided by the Canadian Cancer Society.

References

1. Schwartz, R. H. 1997. T cell clonal anergy. *Curr Opin Immunol.* 9: 351-357.
2. Gimmi, C.D., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Gray, G. and Nadler, L.M. 1993. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6586-6590.
3. LaFace, D. M., C. Couture, K. Anderson, G. Shih, J. Alexander, A. Sette, T. Mustelin, A. Altman, and H. M. Grey. 1997. Differential T cell signaling induced by antagonist peptide-MHC complexes and the associated phenotypic responses. *J. Immunol.* 158:2057-2064.
4. Samelson, L. E., Harford, J. B. and Klausner, R. D. 1985. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43: 223-231.
5. Weissman, A. M., Frank, S. J. Orloff, D. G., Mercep, M., Ashwell, J. D. and Klausner, R. D. 1989. Role of the ζ chain in the expression of the T cell antigen receptor: genetic reconstitution studies. *EMBO J.* 8: 3651-3656.
6. Weiss, A., and Littman, D. R. 1994. Signal Transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263-274.
7. Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* 388:383-384.
8. Irving, B. A. and Weiss, A. 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor ζ chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* 64: 891-901.
9. Hall, C.G., Sancho, J. and Terhorst, C. 1993. Reconstitution of T cell receptor ζ -mediated calcium mobilization in nonlymphoid cells. *Science* 261: 915-918.
10. Wange RL, Kong A-NT, Samelson LE: A tyrosine-phosphorylated 70-kDa protein binds a photoaffinity analogue of ATP and associates with both the ζ chain and CD3 components of the activated T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 1992; 267: 11685-11688.

11. Wange, R. L., Malek, S. N., Desiderio, S. and Samelson, L. E. 1993. Tandem SH2 domains of ZAP-70 bind to T cell antigen receptor ζ and CD3e from activated Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 268: 19797-19801.
12. Isakov, N., Wange, R. L., Burgess, W. H., Watts, J. D., Aebersold, R. and Samelson, L. E. 1995. ZAP-70 binding specificity to the T cell receptor tyrosine-based activation motifs: The tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J. Exp. Med.* 181: 375-380.
13. Hatada, M. H., L. Xiaode, E. R. Laird, J. Green, J. P. Morgenstern, M. Lou, C. S. Marr, T. B. Phillips, M. K. Ram, K. Theriault, M. J. Zoller, and J. L. Karas. 1995. Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 377:32-38.
14. Chan, A. C., B. A. Irving, J. D. Fraser, and A. Weiss. 1991. The TCR ζ chain associates with a tyrosine kinase and upon TCR-stimulation associates with ZAP-70, a 70K Mr tyrosine phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9166-9170.
15. Chan, A. C., M. Iwashima, C. W. Turck, and A. Weiss. 1992. ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. *Cell* 71:649-662.
16. Kong, G., M. Dalton, J. B. Wardenburg, D. Strauss, T. Kurosaki, and A. C. Chan. 1996. Distinct tyrosine phosphorylation sites in ZAP-70 mediate activation and negative regulation of antigen receptor function. *Mol. Cell. Biol.* 16:5026-5035.
17. Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92:83-92.
18. Jackman, J. K., D. G. Motto, Q. Sun, M. Tanemoto, C. W. Turck, G. A. Peltz, G. A. Koretzky, and P. R. Findell. 1995. Molecular cloning of SLP-76, a 76-kDa tyrosine phosphoprotein associated with Grb2 in T cells. *J. Biol. Chem.* 270:7029-7032.
19. Raab, M., A. J. da Silva, P. R. Findell, and C. E. Rudd. 1997. Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR ζ /CD3 induction of interleukin-2. *Immunity* 6:155-164.
20. Wardenburg, J. B., C. Fu, J. K. Jackman, H. Flotow, S. E. Wilkinson, D. H. Williams, R. Johnson, G. Kong, A. C. Chan, and P. R. Findell. 1996. Phosphorylation of SLP-76

- by the ZAP-70 protein- tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J. Biol. Chem.* 271:19641-19644.
21. Altman A, Coggeshall KM, Mustelin T: Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol* 1990; 48: 277-360.
 22. Serling, E., Avots, A., and Neumann, M. 1995. The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1263: 181-200.
 23. Chen, L., Rao, A. and Harrison, S.C. 1999. Signal integration by transcription-factor assemblies: interactions of NF-AT1 and AP-1 on the IL-2 promoter. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*64: 527-531.
 24. Rudd, C. E. 1996. Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 4: 527-534.
 25. Kang, S.-M., Beverly, B., Tran, A.-C., Brorson, K., Schwartz, R.H. and Lenardo, M.J. 1992. Transactivation by AP-1 is a molecular target of T cell clonal anergy. *Science* 257: 1134-1138.
 26. Sundstedt, A., Sigvardsson, M., Leanderson, T., Hedlund, G., Kalland, T., and Dohlsten, M. 1996. In vivo anergized CD4⁺ T cells express perturbed AP-1 and NF- κ B transcription factors. *Proc. Natrl. Acad. Sci. USA* 93: 979-984.
 27. Sundstedt, A. and Dohlsten, M. 1998. In vivo anergized CD4⁺ T cells have defective expression and function of the activating protein-1 transcription factor. *J. Immunol.* 161: 5930-5936.
 28. Kawazaki, H., Nakata, Y., Suzuki, G., Chihara, K., Tokuhisa, T. and Shiozawa, S. 1999. Increased c-Fos/activator protein-1 confers resistance against anergy induction on antigen-specific T cells. *Int. Immunol.* 11: 1873-1880.
 29. Sloan-Lancaster, J., A. S. Shaw, J. B. Rothbard, and P. M. Allen. 1994. Partial T cell signaling: altered phospho- ζ and lack of Zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell* 79:913-922.

30. Madrenas, J., R. L. Wange, J. L. Wang, N. Isakov, L. E. Samelson, and R. N. Germain. 1995. ζ phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science* 267:515-518.
31. Faith, A., Akdis, C.A., Akdis, M., Simon, H.-U. and Blaser, K. 1997. Defective TCR stimulation in anergized type 2 T helper cells correlates with abrogated p56lck and ZAP-70 tyrosine kinase activities. *J. Immunol.* 159: 53-60.
32. Tang, B., L. K. Myers, E. F. Rosloneic, K. B. Whittington, J. M. Stuart, and A. H. Kang. 1998. Characterization of signal transduction through the TCR- ζ chain following T cell stimulation with analogue peptides of type II collagen 260-267. *J. Immunol.* 160:3135-3142.
33. Fields, P. E., Gajewski, T. F. and Fitch, F. W. 1996. Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271: 1276-1278.
34. Li, W., Whaley, C. D., Mondino, A. and Mueller, D. L. 1996. Blocked signal transduction to the RSK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells. *Science* 271: 1272-1276.
35. Boussiotis, V. A., Barber, D. L., Lee, B. J., Gribben, J. G., Freeman, G. J. and Nadler, L. M. 1996. Differential association of protein tyrosine kinases with the T cell receptor is linked to the induction of anergy and its prevention by B7 family-mediated costimulation. *J. Exp. Med.* 184: 365-376.
36. Gajewski, T.F., Qian, D., Fields, P. and Fitch, F.W. 1994. Anergic T-lymphocyte clones have altered inositol phosphate, calcium, and tyrosine kinase signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 38-42.
37. Chen, C.-Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z. and Karin, M. 1998. Stabilization of the interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH₂-terminal kinase pathway. *Science* 280: 1945-1949.
38. Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Barber, D. L. and Nadler, L. M. 1997. Maintenance of human T cell anergy: Blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 278: 124-128.

39. Reedquist, K.A. and Bos, J.L. 1998. Costimulation through CD28 suppresses T cell receptor-dependent activation of the Ras-like small GTPase Rap1 in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273: 4944-4949.
40. Siliciano, R. F., T. Lawton, C. Knall, R. W. Karr, P. Berman, T. Gregory, and E. L. Reinherz. 1988. Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones: Effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4⁺ T cell depletion. *Cell* 54:561-575.
41. Bouhdoud, L., Villain, P., Merzouki, A., Arella, M. and Couture, C. 2000. T-cell receptor-mediated anergy of a human immunodeficiency virus (HIV) gp120-specific CD4⁺ cytotoxic T cell clone, induced by a natural HIV type 1 variant peptide. *J. Virol.* 74: 2121-2130.
42. Jenkins, M.K., Chen, C.A., Jung, G., Mueller, D.L. and Schwartz, R.H. 1990. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 144: 16-22.
43. Cho, E.A., Riley, M.P., Sillman, A.L. and Quill, H. 1993. Altered protein tyrosine phosphorylation in anergic Th1 cells. *J. Immunol.* 151: 20-28.
44. Couture, C., Baier, G., Altman, A. and Mustelin, T. 1994a. p56lck-independent activation and tyrosine phosphorylation of p72syk by T-cell antigen receptor/CD3 stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5301-5305.
45. Couture, C., Baier, G., Oetken, C., Williams, S., Telford, D., Marie-Cardine, A., Baier-Bitterlich, G., Fischer, S., Burn, P., Altman, A. and Mustelin, T. 1994b. Activation of p56lck by p72syk through physical interaction and N-terminal tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5249-5258.
46. Couture, C., Deckert, M., Williams, S., Otero Russo, F., Altman, A. and Mustelin, T. 1996. Identification of the site in the Syk protein tyrosine kinase that binds the SH2 domain of Lck. *J. Biol. Chem.* 271: 24294-24299.
47. Jacinto, E., Werlen, G. and Karin, M. 1998. Cooperation between Syk and Rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes. *Immunity* 8: 31-41.
48. Kersh, E.N., Shaw, A.S. and Allen, P.M. 1998. Fidelity of T cell proliferation through multistep T cell receptor z phosphorylation. *Science* 281: 572-575.

49. Min, B., Legge, K.L., Pack, C. and Zaghouani, H. 1998. Neonatal exposure to a self-peptide-immunoglobulin chimera circumvents the use of adjuvant and confers resistance to autoimmune disease by a novel mechanism involving interleukin 4 lymph node deviation and interferon γ -mediated splenic anergy. *J. Exp. Med.* 188: 2007-2017.
50. Marais, R., Wynne, J., and Treisman, R. 1993. The SRS accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73: 381-393.
51. Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252.
52. Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. and Karin, M. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-jun activation domain. *Genes. Dev.* 7: 2135-2148.
- 52a. Boussiotis, V. A., D. L. Barber, T. Nakarai, G. J. Freeman, J. G. Gribben, G. M. Bernstein, A. D. D'Andrea, J. Ritz, and L. M. Nadler. 1994. Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science* 266:1039.
- 52b. Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, P. A. Taylor, A. Berezovskaya, I. Grass, B. R. Blazar, and L. M. Nadler. 2000. p27kip1 functions as an anergy factor inhibiting interleukin 2 transcription and clonal expansion of alloreactive human and mouse helper T lymphocytes. *Nature Medicine* 6: 290.
53. Hemmer, B., I. Stefanova, M. Vergelli, R. N. Germain, and R. Martin. 1998. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and quality of early signaling events in human T cells. *J. Immunol.* 160: 5807.
54. Germain, R. N. and I. Stefanova. 1999. The dynamics of T cell receptor signaling: Complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Ann. Rev. Immunol.* 17: 467-522.
55. Becker, J. C., T. Brabletz, C. T. Conrad, E.-B. Brocker, and R. A. Reisfeld. 1995. Negative transcriptional regulation in anergic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2375-2378.

56. Chen, Y.-Z., Z.-F. Lai, K. Nishi, and Y. Nishimura. 1998. Modulation of calcium responses by altered peptide ligands in a human T cell clone. *Eur. J. Immunol.* 28: 3929-3939.

Figure Legends

Figure 1. Antibody stimulation of Ee217 T cells. a) Proliferation of Ee217 cells in response to anti-CD3 plus anti-CD28 mAb stimulation. Ee217 cells were stimulated with different doses of immobilized anti-CD3 mAb in the presence of 0.1 μ g anti-CD28 mAb. Note that ~50% maximal response is reached when the cells were stimulated with 2.44 ng of anti-CD3 mAb plus 0.1 μ g of anti-CD28 mAb. b) Induction of Ee217 T cell anergy in absence of costimulation by pretreatment with immobilized anti-CD3 mAb. Ee217 cells were co-cultured for 48 h with the Goat anti-mouse Ab alone or with different doses of anti-CD3, rested for 48 h and restimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs in a standard proliferation assay. Each determination was made in triplicate. 96.6% of specific inhibition of Ee217 cell proliferation is obtained when cells are pretreated with 1.2 ng of immobilized anti-CD3 mAb. The data presented in this figure are representative of three independent experiments.

Figure 2. a) Inhibition of proliferation of anti-CD3 mAb energized Ee217 cells to agonist ligand PV22 plus APC re-stimulation. Ee217 cells were co-cultured for 48 h with Goat anti-mouse Ab alone or plus 1.2 ng anti-CD3 mAb to induce anergy, rested for 48 h and restimulated with APCs pulsed with the indicated concentrations of the agonist antigenic ligand PV22 in a standard proliferation assay. Each determination was made in triplicate. The pretreatment with anti-CD3 mAb inhibited the proliferation of Ee217 cells in response to the antigenic peptide in presence of costimulation. b) Inhibition of mAbs induced Ee217 proliferation by pre-treatment of the cells with anergic HXB2 natural variant peptide. Ee217

were pretreated for 48 h with APCs alone or APCs pulsed with the indicated concentrations of the HXB2 or CDC42 variant peptides, rested for 48 h and restimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs in a standard proliferation assay. Each determination was made in triplicate. The pretreatment with the HXB2 inhibited the proliferation of Een217 cells in response to mAbs stimulation. The maximal inhibition of proliferation is reached in cells pretreated with 10 nM HXB2.

Figure 3. Inhibition of PV22-induced Een217 T cell cytotoxicity by pretreatment of the cells with the anti-CD3 mAb or the HXB2 peptide. Cytotoxic activity of Een217 cells, pretreated with Goat-anti-mouse Ab alone, or plus 1.2 ng of anti-CD3 mAb, or with 10 nM of HXB2 or CDC42 peptide for 48 h, toward ^{51}Cr -loaded DR4⁺ L cells pulsed with the indicated concentrations of the PV22 peptide, or pulsed with the CDC42 peptide (negative control), in a standard cytotoxic assay. In this experiment, the cells were co-cultured for 6.5 h with an effector to target ratio of 20:1, as described (40). Each determination was made in triplicate.

Figure 4. Prevention and reversion of anti-CD3 mAb-induced Een217 T cell anergy by exogenous IL-2. Een217 T cells were pretreated with either Goat anti-mouse alone or plus 1.2 ng anti-CD3 mAb or with 10 nM of HXB2 or CDC42 peptides (in the presence of DR4-transfected L cells) for 48 h, separated from the APCs and rested for 48 h, and finally stimulated with APCs pulsed with 10 nM of the PV22 peptide, or stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs as before. In each panel, the anergy assay was performed in absence of IL-2 (black histograms). The addition of IL-2 (50 U/ml) during the first peptide stimulation (scratched histograms) or during the 48 h rest period (white histograms) prevented or reverted the induction of anergy by the immobilized anti-CD3 mAb or by the HXB2 peptide. All determinations were made in triplicate.

Figure 5. Induction of normal ZAP-70 tyrosine phosphorylation in response to PV22 stimulation in anti-CD3 mAb anergized Ee217 cells, but not in HXB2 pretreated cells. Ee217 were pretreated for 48 h with the Goat anti-mouse alone (for controls) or plus 1.22 ng of anti-CD3 mAb, or with APC pretreated with 10 nM HXB2 peptide. The cells were rested for 48 h and restimulated for 0, 1, and 5 min with APC pulsed overnight with 10 μ M of PV22, or with anti-CD3 (12 ng) plus anti-CD28 (0.5 μ g) mAbs cross-linked with the Goat anti-mouse Ab (4 μ g) (lanes 4,5 and 11,12). Ee217 cells pretreated with Goat anti-mouse Ab alone were not stimulated (lanes 6, 13: negative controls) or stimulated for 5 min with mAbs or with the PV22 peptide (lane 7, 14 positive controls). ZAP-70 was immunoprecipitated from Ee217 cells lysates and the immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phosphotyrosine antibodies (upper panel). The PV22 and mAbs stimulation of Goat-anti-mouse Ab pretreated cells induce the phosphorylation of ZAP-70 (lanes 7, 14). The pretreatment by anti-CD3 mAb (lanes 4 and 5) or by HXB2 peptide (lanes 4 and 5) inhibited the phosphorylation of ZAP-70 by mAbs. As expected, HXB2 pretreatment inhibited the PV22 induced phosphorylation of ZAP-70 (lanes 2 and 3), while the PV22 restimulation of anti-CD3 mAb anergized cells restored the phosphorylation of ZAP-70 (lane 3). The membranes were stripped and re-blotted with a ZAP-70 specific mAb, to ensure that equal amounts of ZAP-70 were present in each immunoprecipitate (lower panel). The results presented in this figure were reproduced in four independent experiments.

Figure 6. Induction of normal TCR ζ and CD3 ϵ chains tyrosine phosphorylation in response to PV22 stimulation in anti-CD3 mAb anergized Ee217 cells, but not in HXB2 pretreated cells. Cell lysates of Ee217 cells, pretreated and stimulated as described in FIG.5, were incubated in presence of \sim 5 μ g of the purified Zap(SH2)₂-GST fusion protein. The Zap(SH2)₂-GST bound material was precipitated with glutathione-sepharose beads, and analyzed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibodies. mAbs and PV22

stimulations induced normal phosphorylation of TCR ζ chains and CD3 ϵ chain which co-precipitated with ζ chains in control cells pretreated with the Goat anti-mouse Ab alone (lanes 7, 14). The anti-CD3 mAb (lanes 4 and 5) or HXB2 (lanes 4 and 5) pretreatment reduced the phosphorylation of the ζ chains and inhibited completely the phosphorylation of the CD3 ϵ chains by mAb re-stimulation. The HXB2 pretreatment reduced the phosphorylation of the ζ chains and inhibited the phosphorylation of the CD3 ϵ chains by the PV22 peptide (lanes 2 and 3), while the re-stimulation of anti-CD3 mAb-energized cells by PV22 restored the normal phosphorylation of TCR ζ chains and CD3 ϵ chain (lane 3). The results presented in this figure were reproduced in four independent experiments.

Figure 7. Induction of Erk 2 MAP kinase activation in response to PV22 stimulation in anti-CD3 mAb-energized Ee217 cells, but not in HXB2 pretreated cells. Cell lysates of Ee217 cells pretreated and stimulated as described in FIG.5, were subjected to SDS-PAGE analysis and anti-active MAP kinase immunoblotting with a polyclonal Ab against dual phosphorylated Erk 1 (p44) and Erk 2 (p42) MAP kinases. MAbs and PV22 re-stimulation induced the activation of the MAP kinases Erk 1 and 2 in control cells pretreated with the Goat anti-mouse alone (lanes 7,8 and 15,16). The anti-CD3 mAb (lanes 4 and 5) or the HXB2 (lanes 4 and 5) pretreatment inhibited completely the activation of the MAP kinases Erk by the mAbs stimulation. The pre-treatment by HXB2 inhibit the MAP kinases activation by the PV22 (lanes 2 and 3), while the re-stimulation of anti-CD3 mAb-energized cells by the PV22 restored normal activation of the MAP kinase Erk 2 (lane 3). The membranes were stripped and re-blotted with an Erk 2 specific mAb, to ensure that equal amounts of Erk proteins were present in each immunoprecipitate (lower panel). The results presented in this figure were reproduced in four independent experiments.

Figure 8. Reduction of IL-2 secretion in both anti-CD3 mAb or HXB2 energized Een217 after restimulation. Culture supernatants of Een217 cells pretreated and stimulated as described in TABLE 1, and were tested for IL-2 secreted using the IL-2 dependent CTLL-2 cell line in a standard proliferation assay (a). The IL-2 secreted was also expressed as Units/ml relative to a standard source of rhIL-2 (100 U/ml) (b). The amount of IL-2 secreted in anti-CD3 mAb or HXB2 pretreated cells after restimulation with mAbs and PV22 is very low than the positive controls.

Figure 9. Reduction of the activity of the MAP kinase JNK in response to PV22 stimulation of anti-CD3 mAb-energized Een217 cells. Cell lysates of Een217 cells pretreated and stimulated as described in FIG.5, were incubated for 2 hours with 5 µg of a GST fusion protein composed of amino acids 1-79 of c-jun, and the c-jun (1-79)/JNK complex was precipitated by addition of glutathione-conjugated agarose beads. Following extensive washes, 10 µCi [³²P]γ-ATP was added and the kinase reaction was allowed to proceed for 30 min. The phospho-proteins were then separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and exposed to film. JNK activity was induced following anti-CD3/CD28 mAbs stimulation of fresh Een217 T cells, but not in anti-CD3mAb-energized T cells. PV22 stimulation of anti-CD3mAb-energized T cells caused a time-dependent repression in c-jun kinase activity. The results presented in this figure were reproduced in four independent experiments.

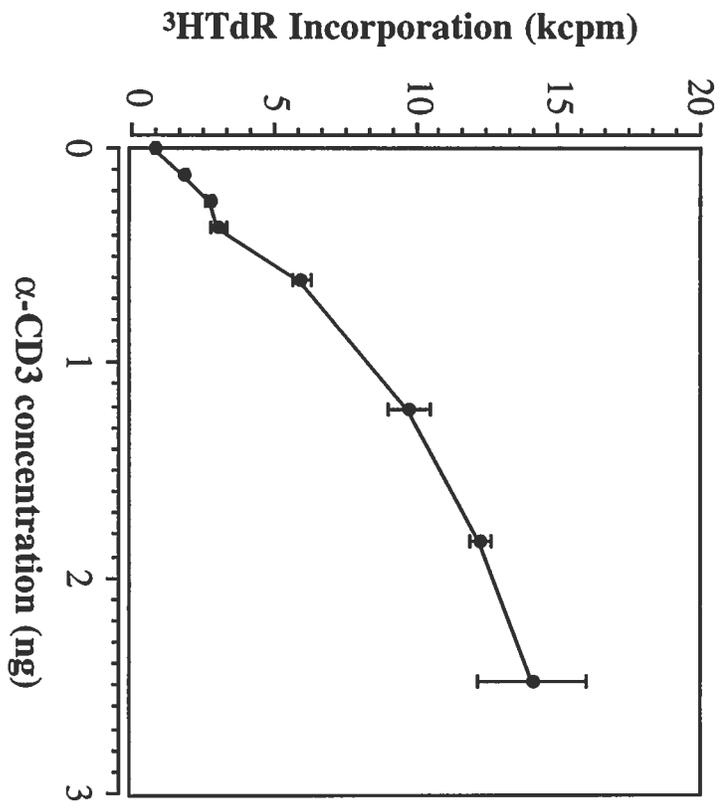
Table 1: Inducible expression of the IL-2 receptor α chain (CD25) at the surface of stimulated and anergic Ee217 T cells.

Pre-treatment	Stimulation	% CD25 ⁺ T cells	MFI*
G α M	None	3.5	1.90
G α M	CD3 x CD28	99.3	9.48
G α M	PV22 10 ⁻⁸ M	99.5	10.50
G α M + anti-CD3	CD3 x CD28	71.3	2.87
G α M + anti-CD3	PV22 10 ⁻⁸ M	99.1	9.37
HXB2 10 ⁻⁸ M	CD3 x CD28	83.2	3.44
HXB2 10 ⁻⁸ M	PV22 10 ⁻⁸ M	74.4	3.02

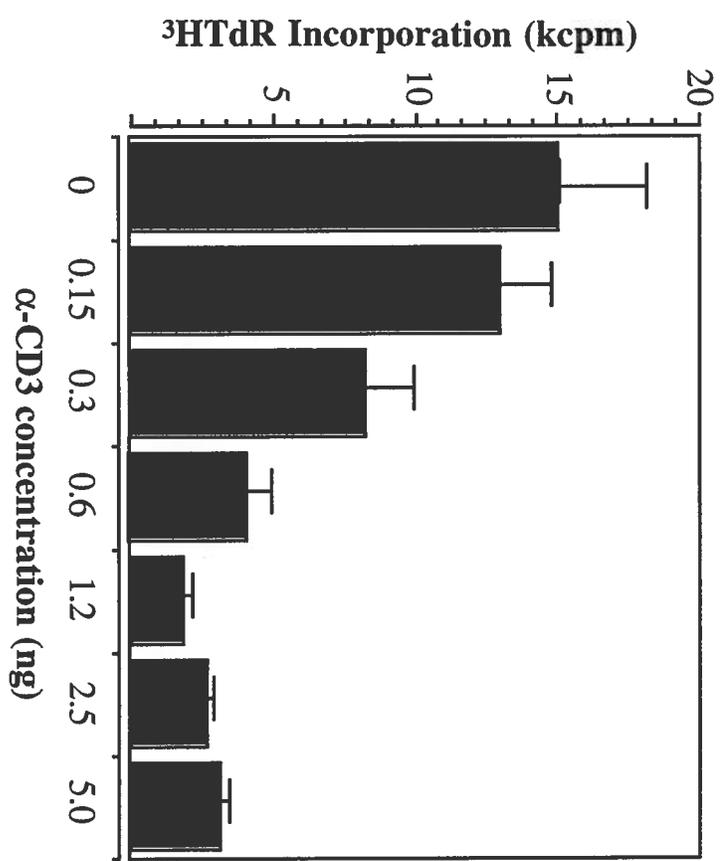
(* Mean Fluorescence Intensity).

- Induction of CD25 expression in both anti-CD3 mAb or HXB2 anergized Ee217 cells after re-stimulation. Ee217 were pretreated for 48 h with the Goat anti-mouse alone or plus 1.22 ng of anti-CD3 mAb, or with APC pretreated with 10 nM HXB2 peptide. The cells were rested for 48 h and restimulated for 48 h with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs or with APC pulsed with 10 nM PV22 and finally analyzed for CD25 surface expression levels by flow cytometry. The data are presented as percentage of CD25⁺ cells or by the mean fluorescence intensity of the surface antigen. The expression of CD25 receptor is induced in both anti-CD3 mAb or HXB2 pretreated cells after stimulation by mAbs or by PV22. Note that only the PV22 stimulation of anti-CD3 mAb-pretreated cells induced the same high level of CD25 expression as in positive controls (99.1%, MFI: 9.37). The results shown here are representative of three independent experiments.

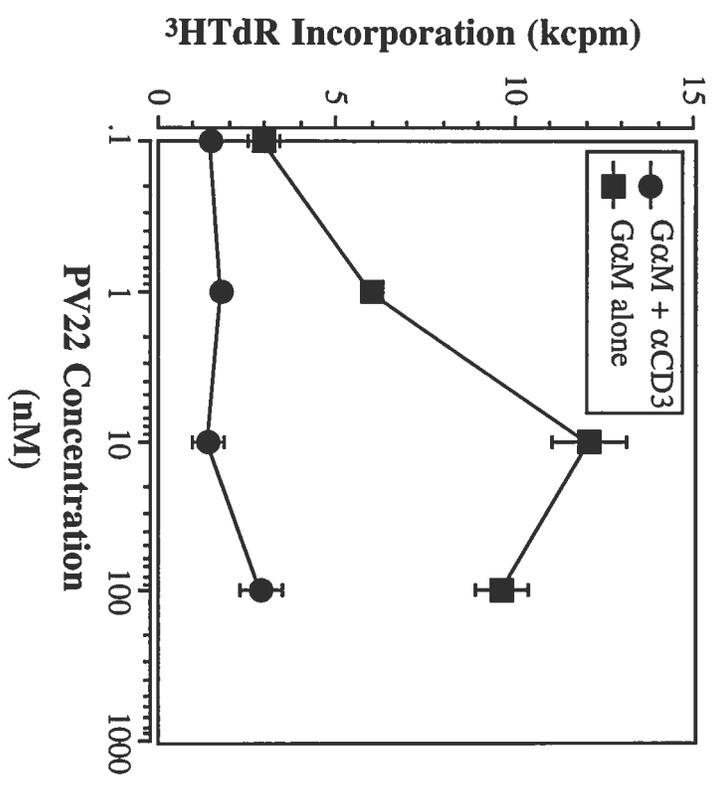
a)



b)



a)



b)

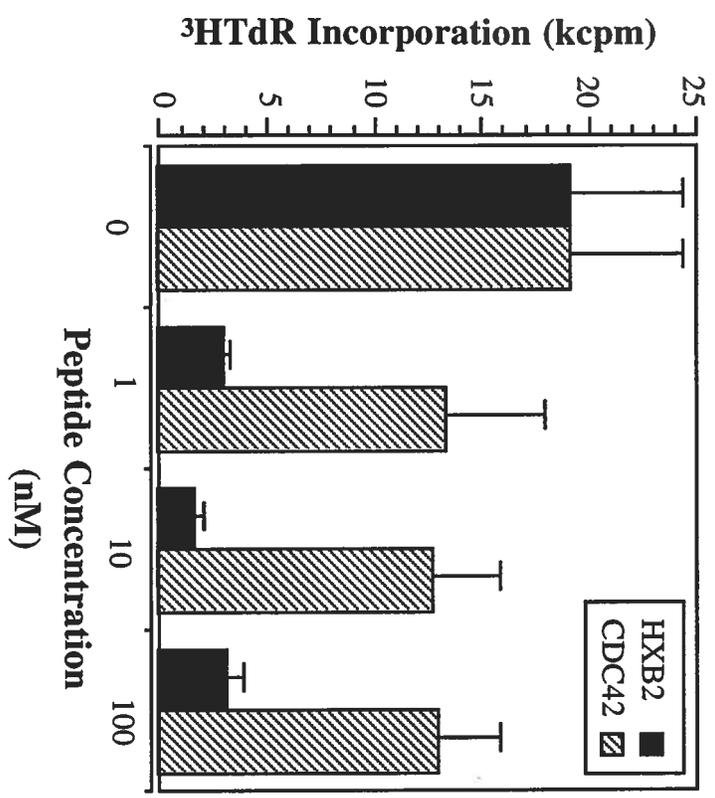


Figure 3

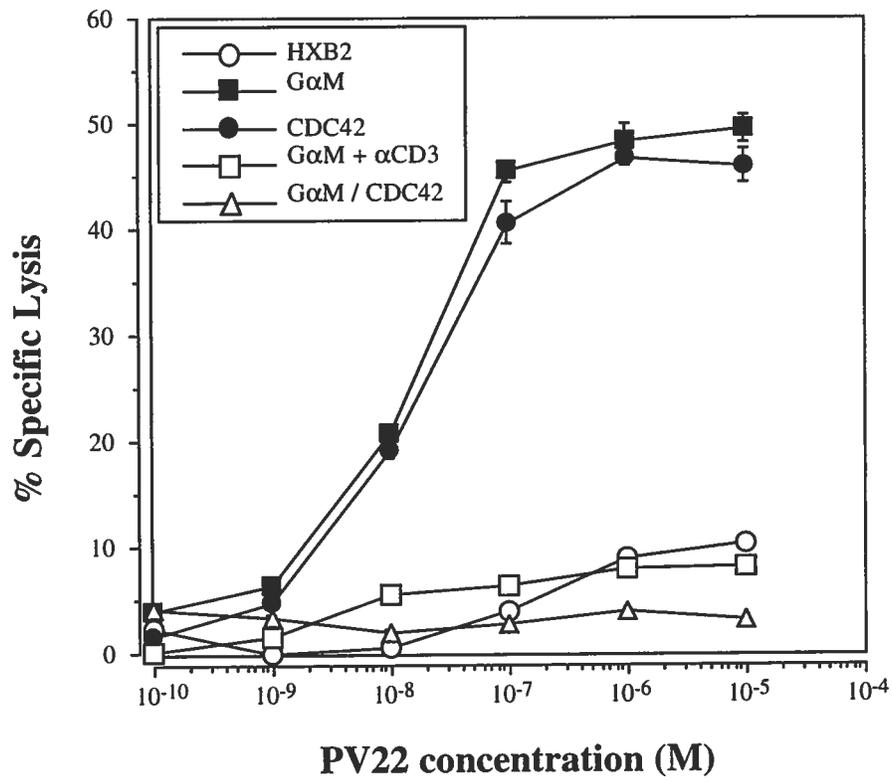
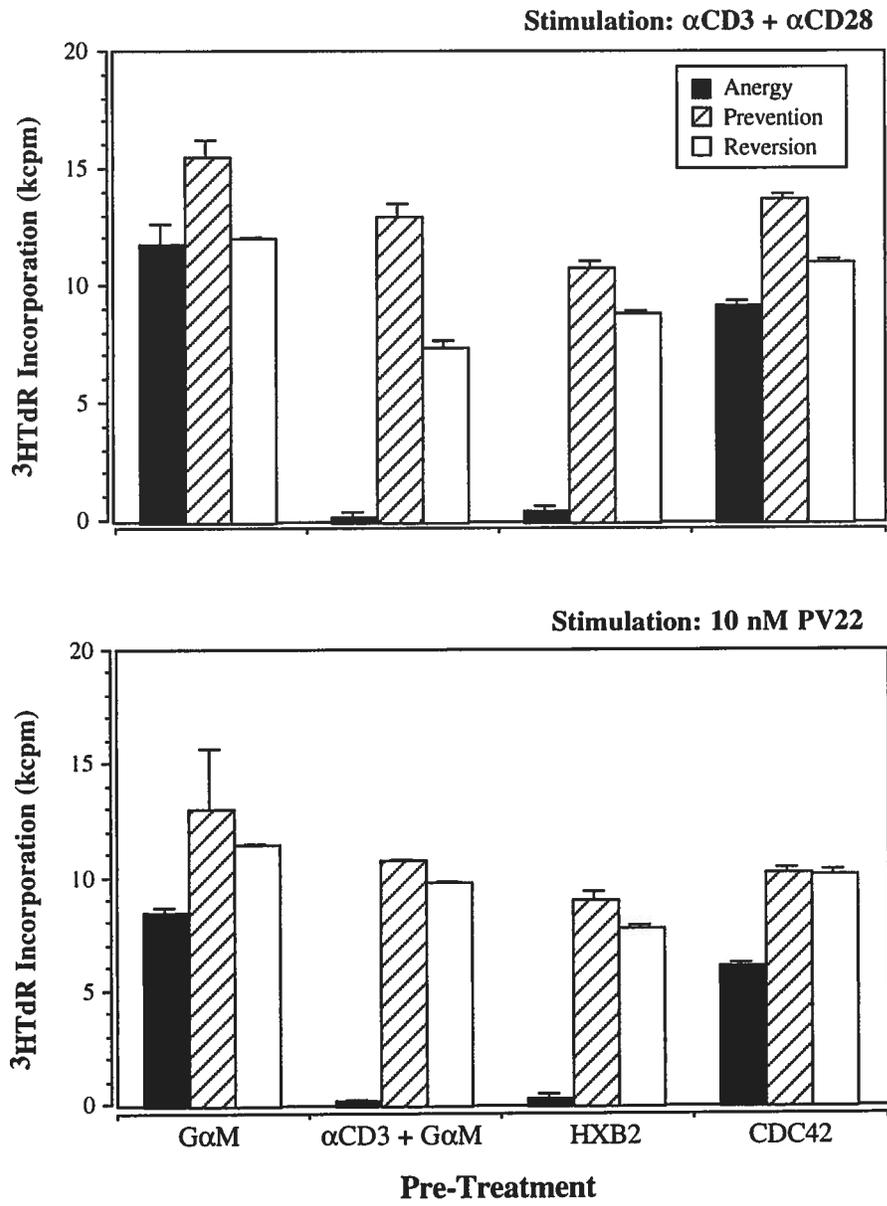
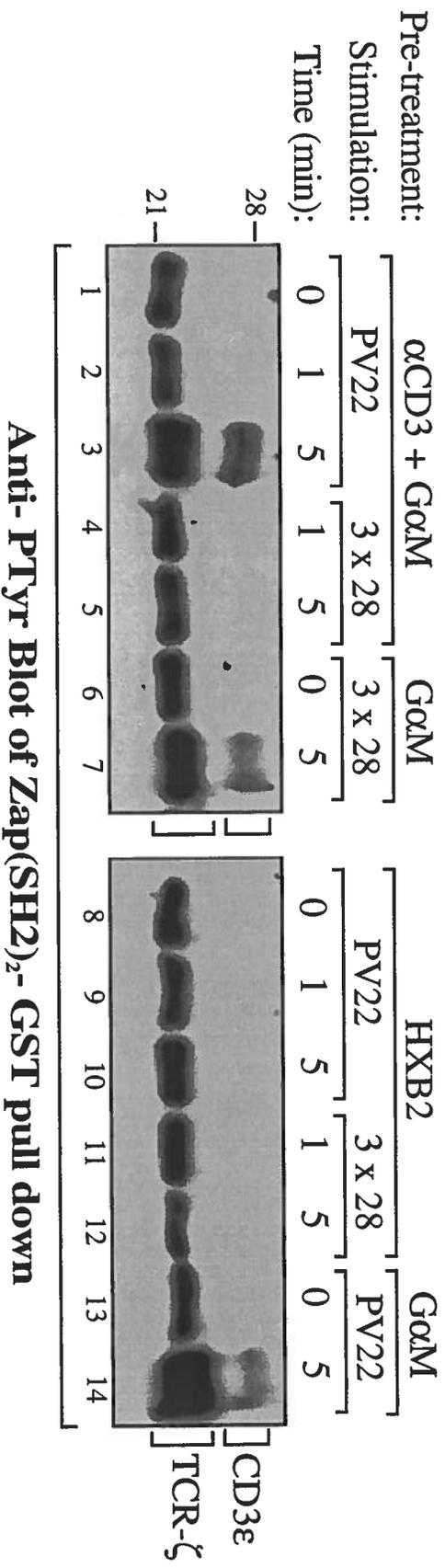
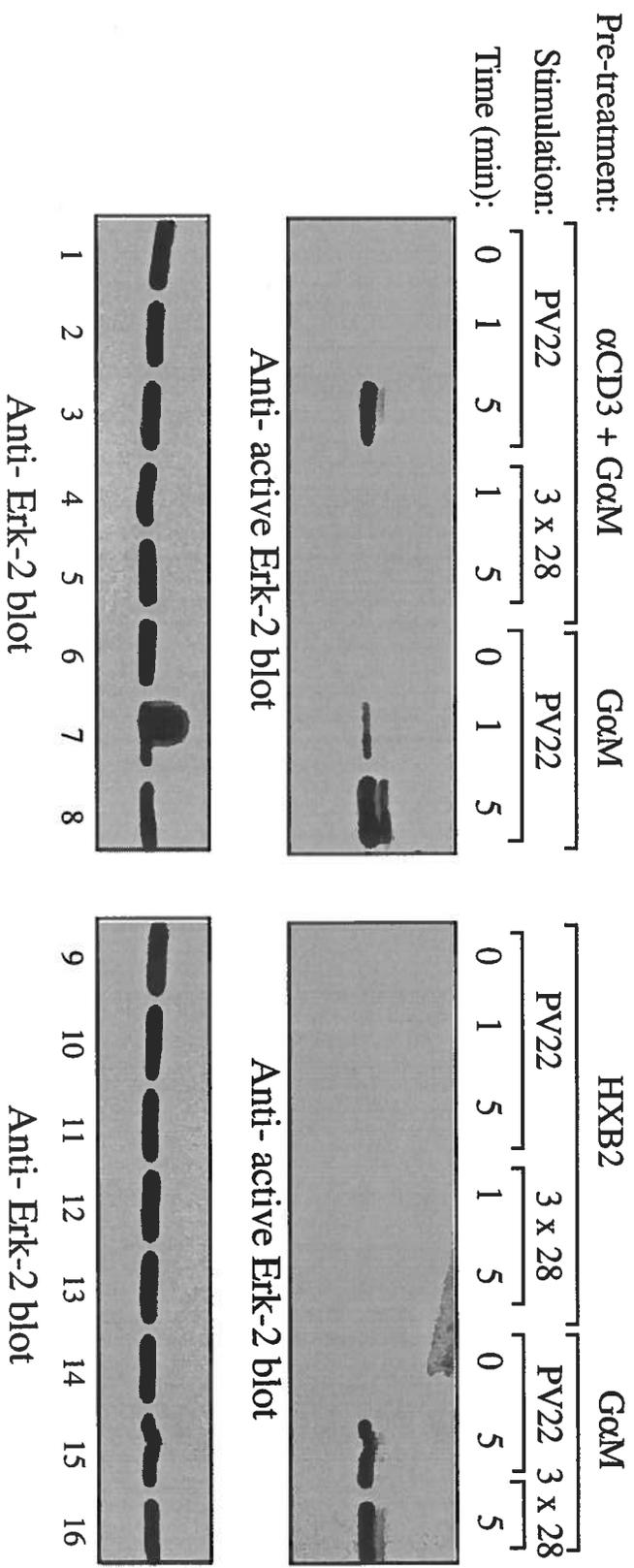


Figure 4

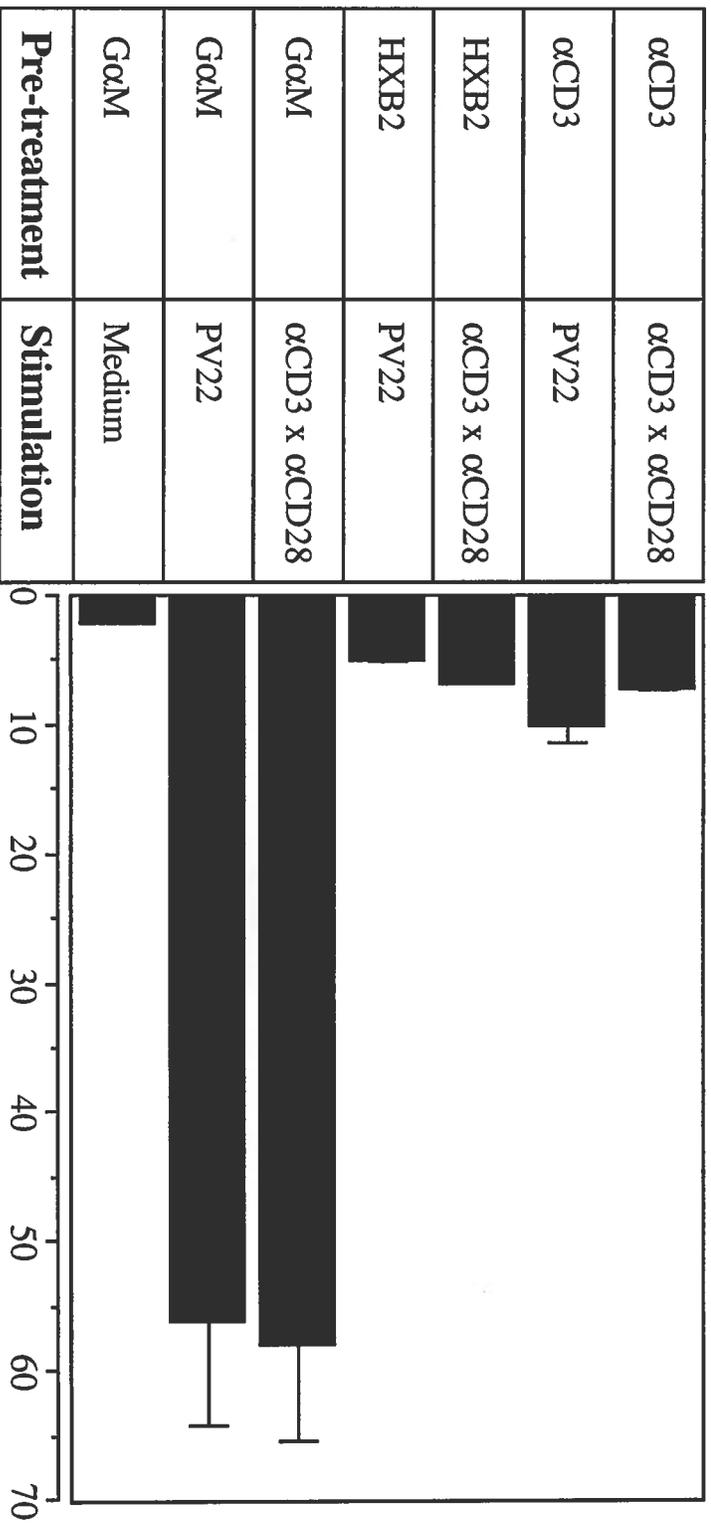


Anergy: No IL-2
Prevention: IL-2 added during pre-treatment
Reversion: IL-2 added prior to rest





Bouhdoud et al.
Figure 8



Bouhdoud et al.
Figure 9

