

Université de Montréal

**Le répertoire des cellules T humaines : Analyse moléculaire du récepteur T
durant une réponse superantigénique**

par
Cristina Ciurli

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en microbiologie et immunologie

Août 1997

©Cristina Ciurli, 1997



w
4
058
1998
v.023

Université de Montréal

Le récepteur des cellules T auxiliaires : Analyse moléculaire du récepteur T
durant une réponse immunologique

par
François Guib

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
de Maîtrise en Sciences de la Santé
en immunologie et microbiologie



1998

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Le répertoire des cellules T humaines : Analyse moléculaire du récepteur T
durant une réponse superantigénique.**

présentée par :

Cristina Ciurli

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

D^r Pierre Chartrand

Président-rapporteur

D^r Rafick-Pierre Sékaly

Directeur de recherche

D^r Daniel Lamarre

Membre du jury

D^r Walid Mourad

Examineur externe

Thèse acceptée le

29.01.1998

SOMMAIRE

Le lymphocyte T est au centre de la réponse immunitaire de type cellulaire. Il reconnaît l'antigène par l'intermédiaire d'une molécule ancrée à la membrane cellulaire appelée le récepteur T (RcT). Le RcT est une glycoprotéine hétérodimérique composée de deux chaînes : α et β . Ces chaînes peptidiques sont divisées en régions variables (V) et constantes (C). La région variable du RcT, qui doit son nom à sa grande diversité d'un lymphocyte T à l'autre est codée par le réarrangement de plusieurs gènes nommés V, D et J et est responsable de la spécificité d'un RcT pour un antigène donné. La région jonctionnelle CDR3 ne reconnaît le fragment antigénique que s'il est présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La totalité des récepteurs et leur spécificité se nomment *répertoire T*. Ce dernier peut être analysé par des techniques de PCR, et par la cytométrie en flux au moyen d'anticorps monoclonaux. Des études génétiques effectuées chez la souris ont démontré que le répertoire T peut être grandement affecté par l'expression conjointe de certaines molécules du CMH et des protéines nommées superantigènes (SAg). De plus, certains virus pourraient coder pour des superantigènes. Ces SAg sont des protéines stimulant une grande proportion de lymphocytes T (5 à 25 %), étant donné que la reconnaissance du SAg dépend de la région V β du RcT. Il existe deux classes de SAg : les SAg bactériens produits par des micro-organismes et les SAg viraux. Des études ont démontré que les SAg viraux jouent un rôle critique dans la pathogenèse et la propagation du virus de la tumeur de la glande mammaire (MMTV), un rétrovirus endogène et exogène chez la souris.

Dans cette thèse de doctorat, nous avons voulu d'abord analyser les déterminants génétiques pouvant influencer la sélection du répertoire T humain. Pour ce faire, nous avons étudié le répertoire V β du RcT chez des individus normaux de génotypes différents et les répertoires V α et V β des sous-populations de cellules CD4 et CD8 chez des jumeaux monozygotes normaux de génotypes identiques au moyen du PCR quantitatif et de la cytométrie en flux. Nos résultats montrent que les RcT des

SOMMAIRE (suite)

répertoires $V\alpha$ et $V\beta$ exprimés par les cellules CD4 et CD8 sont comparables chez les jumeaux monozygotes, contrairement aux individus normaux de génotypes différents où les répertoires sont très différents. De plus, le répertoire $V\beta$, au niveau macroscopique, dans les populations de cellules T CD4 ou CD8 reste stable à travers le temps.

Deuxièmement, nous avons voulu étudier les perturbations du répertoire des cellules T humaines *in vivo* suite à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Puisque le VIH est un rétrovirus comme le MMTV, il est probable qu'il encode pour un SAg et pourrait ainsi anergiser ou éliminer des cellules T exprimant des $V\beta$ spécifiques. L'analyse du répertoire $V\beta$ des RcT chez des jumeaux monozygotes discordants pour le VIH montre des perturbations anormales. Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle le VIH pourrait être associé à un SAg.

Finalement, il est connu que les SAg endogènes murins peuvent interagir avec les molécules de classe II et les RcT humains. Les SAg interagissent avec les cellules T via la région HV4. Par contre, plusieurs observations indiquent que des régions non HV4 influencent la réponse aux SAg. L'interaction des SAg bactériens avec le RcT et le CMH est bien caractérisée comparativement à celle des SAg viraux avec ces molécules. Pour pouvoir évaluer la nature et la structure du RcT des cellules T amplifiées et étudier la contribution des éléments non HV4 dans la reconnaissance des SAg, il a fallu stimuler *in vitro* des cellules T humaines avec un SAg de MMTV (*Mtv-9*). Nos résultats suggèrent que la région CDR3 active dans l'interaction peptide-CMH joue un rôle critique dans la reconnaissance des SAg viraux. De plus, l'interaction des SAg viraux semble être similaire à une interaction peptide-RcT-CMH.

Tous nos résultats nous ont permis une meilleure compréhension du répertoire des cellules T capables de reconnaître les pathogènes et de mieux interpréter les interactions moléculaires lors de la reconnaissance des superantigènes.

CONTRIBUTION AUX ARTICLES INCLUS DANS CETTE THÈSE

Chapitre 2 (Article 1) : Study of the T cell receptor repertoire in healthy human monozygotic twins. Cet article sera soumis à *Research in Immunology*. D^r Najet Rebai et moi-même avons développé la méthodologie du PCR quantitatif décrite dans cet article (la calibration, le choix des oligonucléotides tant pour V α que pour V β , les conditions de PCR). J'ai effectué toutes les expériences de préparation de l'ARN, de synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc), de PCR quantitatif et de cytométrie en flux. D^r Najet Rebai a isolé les lymphocytes T. J'ai interprété tous les résultats et j'ai rédigé le manuscrit. Tout le travail expérimental fut dirigé par les docteurs Najet Rebai et Rafick-Pierre Sékaly. L'article fut révisé par les docteurs Ursula Utz et Rafick-Pierre Sékaly.

Chapitre 3 (Article 2) : Analysis of the T-cell receptor β -chain variable-region (V β) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus : Evidence for perturbation of specific V β segments in CD4⁺ T cells of the virus-positive twins. Cet article est publié dans [*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91 : 1529-1533, 1994]. Dans le cadre de cette étude en collaboration avec le National Institutes of Health (NIH), le répertoire V β du récepteur T de neuf paires de jumeaux monozygotes discordants pour l'infection au VIH a été analysé. Tout d'abord j'ai participé au développement du test de PCR quantitatif avec le D^r Najet Rebai. J'ai effectué les expériences de PCR quantitatif sur les échantillons d'ARN provenant du sang périphérique de ces donneurs et participé à l'interprétation de ces résultats, le tout sous la direction des docteurs Najet Rebai et Rafick-Pierre Sékaly. L'isolation des lymphocytes, la préparation de l'ARN, la synthèse de l'ADNc et l'analyse cytofluorométrique ont été effectués par James Demarest sous la direction des docteurs Giuseppe Pantaleo et Anthony Fauci. L'article fut rédigé par Giuseppe Pantaleo et Najet Rebai. J'ai également participé à la préparation de certaines figures de l'article.

Chapitre 4 (Article 3) : Highly biased CDR3 usage in restricted sets of BVs during vSAG9 response. Ce manuscrit est soumis à *Journal of Experimental Medicine* (Brief Definitive Report). Dans ce manuscrit, j'ai réalisé toutes les expériences : l'isolement et la stimulation des lymphocytes T, la préparation de l'ARN, la synthèse de l'ADNc, le PCR quantitatif et l'analyse cytofluorométrique. De plus j'ai effectué tous les clonages de la chaîne β du RcT, le séquençage ainsi que l'analyse de la diversité (CDR3) du RcT sous la direction des docteurs François Denis et Rafick-Pierre Sékaly. J'ai contribué de façon significative à la planification de ces expériences et à l'orientation du projet. J'ai rédigé l'article avec la collaboration du D^r François Denis. Le manuscrit fut révisé par les docteurs François Denis, David N. Posnett et Rafick-Pierre Sékaly.

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
CONTRIBUTION AUX ARTICLES INCLUS DANS CETTE THÈSE.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xvi

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	Erreur! Signet non défini.
1.0 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE.....	2
1.1 Généralités.....	2
1.2 Immunités non spécifique et spécifique.....	2
2.0 MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS LA RECONNAISSANCE ANTIGÉNIQUE.....	3
2.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité.....	3
2.1.1 Organisation des gènes du CMH.....	4
2.1.2 Les molécules de classe I du CMH.....	7
2.1.2.1 Structure protéique et cristallographique.....	7
2.1.3 Les molécules de classe II du CMH.....	8
2.1.3.1 Structure protéique et cristallographique.....	8
2.1.4 La présentation de l'antigène aux lymphocytes T.....	11

TABLE DES MATIÈRES (suite)

2.1.4.1	La présentation de l'antigène par les molécules de classe I du CMH.....	11
2.1.4.2	La présentation de l'antigène par les molécules de classe II du CMH.....	12
2.2	Le récepteur à l'antigène des lymphocytes T.....	15
2.2.1	Organisation des gènes du récepteur T $\alpha\beta$	15
2.2.2	Le réarrangement du récepteur T $\alpha\beta$	16
2.2.3	La diversité du récepteur T $\alpha\beta$	20
2.2.4	Structure et fonctions du récepteur T $\alpha\beta$	21
2.2.5	Le complexe RcT/CD3 et la transduction des signaux d'activation du récepteur T.....	26
2.3	Les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques.....	30
3.0	L'ÉDUCATION THYMIQUE.....	32
3.1	La maturation des précurseurs des lymphocytes T.....	33
3.2	Le répertoire des cellules T humaines.....	36
4.0	LA RÉPONSE IMMUNITAIRE.....	38
4.1	La réponse immunitaire périphérique.....	38
4.2	La réponse immunitaire antivirale.....	39
5.0	LES SUPERANTIGÈNES.....	42
5.1	Définition d'un superantigène.....	43
5.2	Les familles de superantigènes.....	44
5.2.1	Les superantigènes exogènes.....	44
5.2.1.1	Les superantigènes bactériens : les entérotoxines de <i>Staphylococcus aureus</i> : prototype du superantigène.....	44
5.2.1.2	Les superantigènes viraux.....	46
5.2.2	Les superantigènes endogènes.....	48
5.2.2.1	Le structure du virus MMTV.....	49

TABLE DES MATIÈRES (suite)

5.2.2.2	Le cycle de vie du virus MMTV	51
5.3	La réponse immunitaire envers les superantigènes.....	55
5.3.1	Le récepteur cellulaire des superantigènes	55
5.3.2	Le rôle des molécules CD4 et CD8	57
5.3.3	Les effets des superantigènes <i>in vivo</i>	58
5.4	Les interactions des superantigènes avec les molécules de classe II du CMH.....	59
5.5	Les interactions des superantigènes avec le récepteur T	62
5.5.1	Identification du site d'interaction des superantigènes sur la chaîne β du RcT : HV4	62
5.5.2	Rôle de la chaîne $V\alpha$ et des résidus non-HV4 dans la reconnaissance des superantigènes	64
5.6	Interaction entre le RcT et la molécule de classe II dans la reconnaissance des superantigènes.....	67
6.0	PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	68

CHAPITRE 2

ARTICLE 1 :	Study of the T-cell receptor repertoire in healthy human monozygotic twins.....	73
-------------	--	----

CHAPITRE 3

ARTICLE 2 :	Analysis of the T-cell receptor β -chain variable-region ($V\beta$) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus : Evidence for perturbations of specific $V\beta$ segments in $CD4^+$ T cells of the virus-positive twins	99
-------------	--	----

CHAPITRE 4

ARTICLE 3 :	Highly biased CDR3 usage in restricted sets of BVs during vSAG-9 response.....	105
-------------	---	-----

TABLE DES MATIÈRES (suite)**CHAPITRE 5**

Discussion	133
------------------	-----

CHAPITRE 6

Conclusion et perspectives	154
----------------------------------	-----

CHAPITRE 7

Bibliographie	158
---------------------	-----

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1 : Les superantigènes bactériens et spécificité V β

Tableau 2 : Les superantigènes viraux et spécificité V β

CHAPITRE 2

Table I : HLA types of the monozygotic twins studied

Table II : Cytofluorometric analysis of four pairs of monozygotic twins

CHAPITRE 3

Table 1 : TCR V β usage in CD4⁺ T cells of discordant HIV-1-infected monozygotic twins

CHAPITRE 4

Table 1 : Percentage of BV6 sub-family members assessed by RFLP analysis

Table 2 : Junctional regions of BV6s from vSAG9 stimulated cells of donors S and M

Table 1 : (data not shown) – Junctional regions of BV6s from PHA and vSAG9-stimulated cells from donor J

Table 2 : (data not shown) – Junctional regions of BV6s from PHA-stimulated cells of donors S and M

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

- Figure 1 : Organisation des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité
- Figure 2 : Structures cristallographiques des molécules de classe I et II du CMH
- Figure 3 : La présentation de l'antigène aux lymphocytes T
- Figure 4 : Organisation génétique des locus α et β du RcT
- Figure 5 : Structure tridimensionnelle des chaînes α et β du RcT
- Figure 6 : Représentation schématique du complexe RcT/CD3
- Figure 7 : La transduction du signal après stimulation du complexe RcT/CD3
- Figure 8 : Présentation et reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T
- Figure 9 : Développement des lymphocytes T dans le thymus
- Figure 10 : Le cycle de vie du virus MMTV

CHAPITRE 2

- Figure 1 : Flow cytometry analysis of the TCRBV repertoire : Percentage of BV CD4⁺ T cells in two healthy, unrelated non-HLA matched individuals (Panel A and B); percentage of BV CD8⁺ T cells (Panel C and D)
- Figure 2 : Quantitative PCR analysis of the TCRBV repertoire in a pair of monozygotic twins (CM-IM)
- Figure 3 : The complete TCRBV region usage patterns in sorted CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T lymphocyte subsets of monozygotic twins CM-IM determined by quantitative PCR
- Figure 4 : Skewing patterns of the TCRBV6, 7 region genes of the BV CD4⁺ and CD8⁺ subsets within six pairs of monozygotic twins
- Figure 5 : The complete TCRAV region usage patterns in sorted CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T lymphocyte subsets of monozygotic twins CM-IM detected by quantitative PCR
- Figure 6 : Skewing of the TCRAV7, 22 region genes of the CD4 and CD8 subsets within three pair of monozygotic twins

LISTE DES FIGURES (suite)**CHAPITRE 3**

- Figure 1 : Comparative PCR analysis of the relative expression of V β families in healthy HIV⁻ HLA-mismatched donors and monozygotic twins
- Figure 2 : Cytofluorometric analysis of V β expression in CD4⁺ cells in HIV⁻ HLA-mismatched donors and monozygotic twins
- Figure 3 : Comparative analysis of V β expression in monozygotic twins discordant for HIV

CHAPITRE 4

- Figure 1 : (A) Cytofluorometric analysis of TCR BV usage in T cells stimulated by vSAG9 (B) Percentage of TCR BV usage determined by qPCR analysis
- Figure 2 : qPCR analysis of TCR BV usage in vSAG9-treated T cells. (A) Donor S, homozygous for the BV6S7*2 allele; (B) Donor M, homozygous for the BV6S7*2 allele
- Figure 1 A (data not shown) – Stimulation of purified human T cells by vSAG9 in donor J
- Figure 1 B (data not shown) – Stimulation of purified human T cells by vSAG9 in donor S
- Figure 1 C (data not shown) – Stimulation of purified human T cells by vSAG9 in donor M
- Figure 2 (data not shown) – Cytofluorometric analysis of TCR BV usage after PHA, DR1 and vSAG9 stimulation
- Figure 3 (data not shown) – Cytofluorometric analysis of TCR BV usage in PHA-stimulated and unstimulated T cells
- Figure 4 (data not shown) – (A) Cytofluorometric analysis of TCR BV usage in response to vSAG9. (B) Relative percentage of TCR BV usage determined by qPCR analysis

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

α :	alpha
A.a. :	acide aminé
Ag :	antigène
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARAM :	“antigen recognition activation motif”
ARN :	acide ribonucléique
β :	bêta
β 2m :	bêta-2 microglobuline
C :	domaine constant du récepteur spécifique des cellules T
CDR :	région hypervariable du récepteur spécifique des cellules T et immunoglobulines
CLIP :	class II associated li chain peptide
CMH :	complexe majeur d’histocompatibilité
CMV :	cytomégalovirus
CPAg :	cellule présentatrice de l’antigène
CTL :	lymphocytes T cytotoxiques ou “cytotoxic T cells”
δ :	delta
D :	région de diversité du récepteur spécifique des cellules T
ε :	epsilon
η :	êta
EBV :	virus Epstein Barr
EDTA :	acide éthylènediaminetétraacétique
γ :	gamma
HLA :	complexe majeur d’histocompatibilité humain ou “Human Leukocyte Antigen”
HV4 :	“hypervariable region 4”
H-2 :	complexe majeur d’histocompatibilité de la souris

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS (suite)

Ig :	immunoglobuline
Ii :	chaîne invariante
Il :	interleukine
INF :	interféron
J :	région de jonction du récepteur spécifique de cellules T
kDa :	kilodalton
LMP :	protéine de faible poids moléculaire ou “low molecular weight protein”
LTR :	“long terminal repeat”
MAM :	mitogène produit par <i>Mycoplasma arthritidis</i>
MBP :	protéine basique de la myéline
MIIC :	“MHC class II compartment”
Mls :	“minor lymphocyte stimulating antigen”
MMTV :	virus de la tumeur mammaire de la souris ou “mouse mammary tumor virus”
orf :	cadre de lecture ouvert ou “open reading frame”
PCR :	réaction de polymérase en chaîne ou “polymerase chain reaction”
PHA :	phytohémagglutinine
PKC :	protéine kinase C
PTK :	tyrosines kinases
RAG :	“recombinase activating gene”
RcT :	récepteur spécifique des cellules T
RcB :	récepteur spécifique des cellules B
RE :	réticulum endoplasmique
RFLP :	“restriction fragment length polymorphism”
RSS :	séquences nucléotidiques de recombinaison ou “recombination signal sequences”
SAg :	superantigène
SEA :	entérotoxine A du staphylocoque

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS (suite)

SEB :	entérotoxine B du staphylocoque
SEC ₁₋₃ :	entérotoxine C ₁ à C ₃ du staphylocoque
SED :	entérotoxine D du staphylocoque
SEE :	entérotoxine E du staphylocoque
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise
TAP :	protéine associée au transport de l'antigène ou "transporter associated to antigen processing"
TdT :	"terminal deoxynucleotidyl transferase"
Th :	lymphocytes T auxiliaires ou "T helper"
TNF :	facteur de nécrose tumorale ou "tumor necrosis factor"
TSST-1 :	toxine du syndrome du choc toxique
V :	domaine variable du récepteur spécifique des cellules T
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
ζ :	zêta
ZAP :	protéine associée à la chaîne zêta ou "zeta-associated protein"
Zn ²⁺ :	ion zinc

REMERCIEMENTS

Mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, le D^r Rafick-Pierre Sékaly pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe de recherche du laboratoire d'immunologie. Le laboratoire du D^r Sékaly est un lieu d'apprentissage multidisciplinaire, un lieu de formation exceptionnel. En plus d'être un directeur, le D^r Sékaly demeure un déterminant majeur dans la relation maître-étudiant, face à la communauté scientifique et les opportunités professionnelles subséquentes.

Je tiens à remercier particulièrement le D^r François Denis, pour sa précieuse collaboration au cours de ce doctorat; j'apprécie sa grande patience, son appui et ses conseils judicieux. Il a éveillé en moi une méthode de pensée fondée sur le questionnement et la rigueur scientifique. Merci François pour ton amitié!

Je remercie chaleureusement mon collègue de travail D^r Hugo Soudeyns pour son aide et sa confiance lors de mon arrivée au laboratoire. Il est demeuré à l'écoute au cours de mes moments de panique, et je lui en suis reconnaissante. Merci également au D^r Najet Rebai pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire et de m'avoir transmis sa rigueur afin de toujours réussir le PCR quantitatif!

Merci à D^r Christine Jolicoeur, D^r Ursula Utz, Pascal Lavoie et Naglaa Shoukry pour leur amitié et leurs conseils.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire du D^r Sékaly, spécialement Jean-Pierre Fortin, Helen McGrath et Nancy Ringuette pour leur aide technique mais surtout pour tous les moments agréables que nous avons partagé. Mme Nicole Guay a été d'une aide inestimable.

Merci à tout le personnel de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal pour leur accueil et leur gentillesse.

Je remercie tous les collaborateurs qui ont contribué à la réalisation de tous les articles au cours de mon doctorat.

Je remercie le Programme National de Recherche et Développement en Matière de Santé (PNRDS-SIDA), Santé et Bien-Être Social Canada, et la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour leur soutien financier.

Finalement, je remercie mes parents, mes grands-parents et mon frère pour leur soutien moral et leurs encouragements. Je tiens particulièrement à remercier de tout mon coeur, mon époux Jean-Marc, pour sa patience inépuisable, sa compréhension et sa bonne humeur.

“Achievement...

A time for looking back with pride, for looking ahead with joy.”

À mes parents et grands-parents

À mon frère, Aldo

À mon époux, Jean-Marc

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.0 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

1.1 Généralités

Le système immunitaire défend l'organisme contre l'invasion par des agents pathogènes tels que les virus, les bactéries, les champignons et les protozoaires. Il est divisé en deux grands mécanismes de défense : l'immunité non spécifique (ou naturelle) et l'immunité spécifique (ou acquise) (Abbas *et al.*, 1994a).

1.2 Immunités non spécifique et spécifique

L'immunité non spécifique est la première ligne de défense contre l'invasion de l'organisme par des agents infectieux. La peau et les muqueuses constituent une barrière physique importante permettant de nous protéger contre les agressions extérieures. Les cellules phagocytaires (neutrophiles, monocytes et macrophages) éliminent les particules étrangères en les ingérant ou en sécrétant des substances toxiques. Les protéines du complément sont aussi impliquées dans la défense naturelle de l'organisme.

La réponse immunitaire dite spécifique est assurée quant à elle, par les lymphocytes. Ces derniers peuvent reconnaître les molécules étrangères à l'organisme, appelées antigènes (Ag), à l'aide de récepteurs spécifiques exprimés à leur surface. L'immunité spécifique comporte deux types de réponse immunitaire : l'immunité à médiation cellulaire et la réponse humorale. Les lymphocytes B, qui sont responsables de la réponse humorale sont caractérisés par la présence d'un récepteur pour l'antigène nommé immunoglobuline. Ces molécules sont ancrées dans la membrane et jouent un rôle de récepteur spécifique pour les antigènes. La liaison de l'antigène à l'immunoglobuline membranaire provoque la prolifération et la différenciation des lymphocytes B qui se transforment en cellules sécrétant des anticorps, les plasmocytes. L'immunité humorale nécessite une collaboration entre les lymphocytes T et les

lymphocytes B, pour aboutir à la production et la sécrétion par les lymphocytes B d'anticorps dirigés spécifiquement contre un antigène afin de le neutraliser.

La réponse immunitaire spécifique à médiation cellulaire est plus complexe et fait appel aux lymphocytes T. Les cellules T grâce à leur récepteur spécifique (RcT) reconnaissent les Ag sous forme de fragments peptidiques présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi exprimées à la surface des cellules présentatrices de l'Ag. Cette reconnaissance spécifique de l'Ag par le RcT correspond au phénomène de la restriction par le CMH (Zinkernagel et Doherty, 1974).

2.0 MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS LA RECONNAISSANCE ANTIGÉNIQUE

L'événement central d'une réponse immunitaire spécifique contre des agents pathogènes fait appel à la reconnaissance par le récepteur T de peptides antigéniques présentés par les molécules du CMH. Dans les prochaines sections, la structure et les fonctions de ce complexe trimoléculaire, CMH-antigène-RcT, seront abordées.

2.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité sont des glycoprotéines membranaires hautement polymorphiques capables de lier des fragments peptidiques de protéines et de les présenter afin qu'ils soient reconnus par les lymphocytes T. Les gènes du CMH humain ou locus HLA (Human Leukocyte Antigen) de l'homme sont situés sur le chromosome 6 tandis que chez la souris, on les retrouve sur le chromosome 17 (locus H-2) (Hansen *et al.*, 1993). Le CMH code pour deux classes principales d'antigènes : les molécules de classe I et les molécules de classe II (Robinson et Kindt, 1989; Hansen *et al.*, 1993).

2.1.1 Organisation des gènes du CMH

Le CMH est un ensemble de gènes polymorphes. La diversité isotypique et le polymorphisme allélique sont apparus avec l'évolution probablement à cause d'un phénomène de pression sélective créé par les pathogènes. En effet, la présence d'allèles du CMH permet à l'organisme de se défendre contre une large proportion de pathogènes. Ces mécanismes ont permis de diversifier les molécules de classe I et II du CMH assurant ainsi une présentation efficace d'une grande diversité de peptides antigéniques.

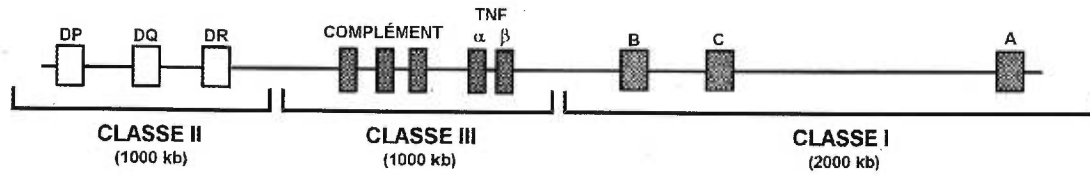
Chez les molécules de classe I, trois isotypes classiques sont codés par les gènes nommés HLA-A, B, C chez l'humain et H-2 K, D, L chez la souris (Stephan *et al.*, 1986; Lawlor *et al.*, 1990). Ces protéines sont associées à la β 2-microglobuline (β 2m) à la surface cellulaire (Bjorkman et Parham, 1990). Les molécules de classe II existent sous cinq isotypes HLA-DR, DP, DQ, DN, DO et deux isotypes murins I-E et I-A (Kaufman *et al.*, 1984). Les molécules de classe II murines I-A sont homologues aux HLA-DQ et les molécules I-E sont homologues aux HLA-DR. Les molécules de classe II présentent un polymorphisme et la diversité de ces molécules est complexe. Plusieurs allèles correspondent à chaque locus et l'ensemble des allèles présent sur un chromosome se nomme un haplotype. Les molécules HLA-classe II de différents isotypes, sont des hétérodimères composés de deux chaînes α et β codées par les gènes A et B du locus correspondant. Tous les gènes ne sont pas polymorphes, car dans le locus DR ou IE, la chaîne α n'est codée que par un seul gène sur le locus, elle est donc monomorphe tandis qu'on retrouve cinq gènes pour la chaîne β de DR (Gorga, 1992).

Récemment, une série de nouveaux gènes ont été identifiés. Ils sont situés sur le locus classe II du CMH (figure 1), ils sont inductibles par l'interféron γ et codent pour un transporteur de peptides : le complexe TAP1/TAP2 (transporter associated to antigen processing) ainsi que pour des sous-unités LMP2 et LMP7 (low molecular

weight protein) d'un complexe protéolytique cytoplasmique nommé protéasome (Spies et DeMars, 1991; Goldberg et Rock, 1992). Les protéines TAP et LMP sont aussi polymorphiques. Au niveau du bras court du chromosome 6, dans la région HLA-classe II, on retrouve aussi les gènes HLA DMA et DMB (Kelly *et al.*, 1991). La structure tridimensionnelle hypothétique des molécules HLA-DM est similaire à celle des molécules HLA-DR par leur organisation en domaines $\alpha 1$, $\beta 1$, et $\alpha 2$, $\beta 2$. Ces molécules interviendraient dans le transport et le repliement conformationnel nécessaire à la bonne fixation des peptides dans la niche peptidique des molécules du CMH de classe II. La molécule HLA-DM serait aussi nécessaire pour l'élimination de la chaîne invariante associée aux classe II permettant ainsi aux peptides antigéniques de se lier à la molécule d'histocompatibilité (Morris *et al.*, 1994).

Il existe un troisième groupe de gènes non-polymorphes qui n'interviennent pas dans la présentation de l'antigène. Ces molécules dites classe III, sont les cytokines TNF- α et β (facteur de nécrose tumorale) ainsi que les composantes du complément (C2, C4, facteur B) (figure 1) Ces molécules participent à la régulation de l'expression des molécules de classe I et classe II du CMH (Hansen *et al.*, 1993).

ORGANISATION GÉNÉRIQUE DU COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITÉ HUMAIN



CARTE DU LOCUS CLASSE II

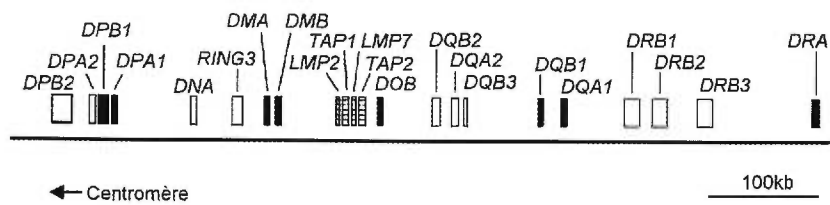


Figure 1. Organisation des gènes du complexe majeur d'histocompatibilité.

A) Localisation des gènes de classe I, II et III du locus du CMH. **B)** Cartographie des gènes situés dans le locus classe II du CMH.

2.1.2 Les molécules de classe I du CMH

2.1.2.1 Structure protéique et cristallographique

Les molécules de classe I sont des hétérodimères composés de la chaîne lourde transmembranaire de 44 kDa comportant trois domaines extracellulaires $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et de la chaîne légère soluble et monomorphe de 12 kDa, la $\beta 2$ -microglobuline ($\beta 2m$) qui est codée hors du locus du CMH (Bjorkman et Parham, 1990). La $\beta 2m$ non glycosylée est liée de façon non covalente avec le domaine $\alpha 3$ de la chaîne lourde et cette interaction est nécessaire pour l'expression des molécules de classe I à la surface cellulaire (Danliczyk et Delovitch, 1994; Pedersen *et al.*, 1995). La liaison d'un peptide est également essentielle pour le repliement dans l'espace de la chaîne α , l'association avec la $\beta 2m$ et le transport du complexe à la surface cellulaire (Townsend *et al.*, 1989). Les molécules de classe I sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme. L'expression des molécules de classe I à la surface cellulaire peut être modulée par des cytokines telles l'INF γ (interféron- γ), le TNF- α et β (Hansen *et al.*, 1993). La molécule de classe I du CMH est le co-récepteur de la molécule CD8 exprimée à la surface des lymphocytes T cytotoxiques (lymphocytes T CD8⁺) qui reconnaissent leur Ag en association avec les molécules de classe I du CMH (Hansen *et al.*, 1993).

Les études cristallographiques des molécules de classe I HLA-A2 (Bjorkman *et al.*, 1987) ont permis de déterminer leur structure tridimensionnelle. La partie proximale de la molécule est constituée par deux domaines de type immunoglobuline, formés par la $\beta 2m$ et le domaine $\alpha 3$ de la chaîne lourde. La partie distale, quant à elle, est formée par les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de la chaîne lourde. Les domaines forment une plate-forme fermée aux extrémités créant ainsi la niche à peptide. La plate-forme est composée de huit feuillets antiparallèles β ; elle est bordée de chaque côté par une hélice α . La plupart des résidus polymorphiques se situent au niveau des deux hélices α ou dans le plancher β avec leurs chaînes latérales pointées vers le peptide ou le R_CT

(Bjorkman *et al.*, 1987; Bjorkman et Parham, 1990). La structure d'un deuxième cristal de molécule de classe I (HLA-Aw68) a permis de conclure que le polymorphisme se limite surtout à des changements locaux et sont restreints à la niche peptidique (Garret *et al.*, 1989).

En 1991, les groupes de Madden *et al.* et Jardetzky *et al.* isolent et purifient des peptides provenant de la niche peptidique de l'antigène de classe I humain, HLA-B27. Ces groupes montrent que la configuration de la niche à peptides des molécules de classe I permet de loger des peptides de 9 à 11 acides aminés. Les extrémités du peptide forment des liens hydrogènes avec la molécule de classe I tandis que le centre du peptide peut se courber vers l'extérieur de la niche permettant l'insertion des peptides plus longs. Les résidus protubérants sont des points de contact pour les boucles CDR3 du R_cT (Garboczi, 1996) (figure 2).

2.1.3 Les molécules de classe II du CMH

2.1.3.1 Structure protéique et cristallographique

Les molécules de classe II sont des hétérodimères formés de deux chaînes polymorphes α et β de 34 et de 28 kDa respectivement. Ces chaînes sont des glycoprotéines membranaires de type I associées de façon non covalente. Les chaînes α et β se composent de deux domaines extracellulaires de 90 acides aminés ($\alpha 1$ et $\alpha 2$; $\beta 1$ et $\beta 2$), d'une région transmembranaire ainsi que d'une partie cytoplasmique (Robinson et Kindt, 1989). Chaque chaîne est glycosylée et les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$, comme chez les molécules de classe I, forment une niche où se lie le peptide antigénique. Les molécules de classe II ne sont exprimées que sur certaines cellules spécialisées du système immunitaire telles les cellules B, les cellules T activées humaines, les macrophages, les cellules de Langerhans, les cellules interdigitantes et les cellules épithéliales thymiques (Germain, 1994). L'expression des molécules CMH-classe II n'est pas seulement confinée à ces cellules spécialisées (CPAg professionnelles) mais peut être induite sur les cellules endothéliales ou les cellules β

du pancréas par des cytokines telles l'INF- γ) (Peterlin *et al.*, 1990). La molécule de classe II du CMH est le co-récepteur de la molécule CD4 exprimée à la surface des lymphocytes T auxiliaires (lymphocytes T CD4⁺). Les lymphocytes T CD4 reconnaissent leur Ag en association avec les molécules de classe II du CMH (Kaufman *et al.*, 1984).

L'étude cristallographique de la molécules HLA-DR1 (Brown *et al.*, 1993) a révélé l'existence d'une niche à peptide constituée par les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ (figure 2). La structure tridimensionnelle de la niche à peptide est presque identique à celle des molécules de classe I : deux hélices α parallèles surmontent un plancher de feuillet β . La différence majeure entre les molécules de classe I et de classe II consiste en une ouverture des deux extrémités de la niche chez les molécules de classe II. Cette ouverture permet aux molécules de classe II de lier des peptides de taille plus longue, soit de 15 à 24 résidus. La majorité des résidus polymorphes sont localisés dans les domaines $\alpha 1$ et $\beta 1$ et sont responsables de la liaison du peptide antigénique ou de l'interaction avec le RcT. Cette variabilité permet aux différents allèles de molécules du CMH de classe II de lier des peptides ayant des séquences très différentes. De plus, le cristal de la molécule DR1 montre la présence d'un dimère d'hétérodimères $\alpha\beta$ (Brown *et al.*, 1993). Les deux molécules DR1 associées en dimère consiste en leur image miroir.

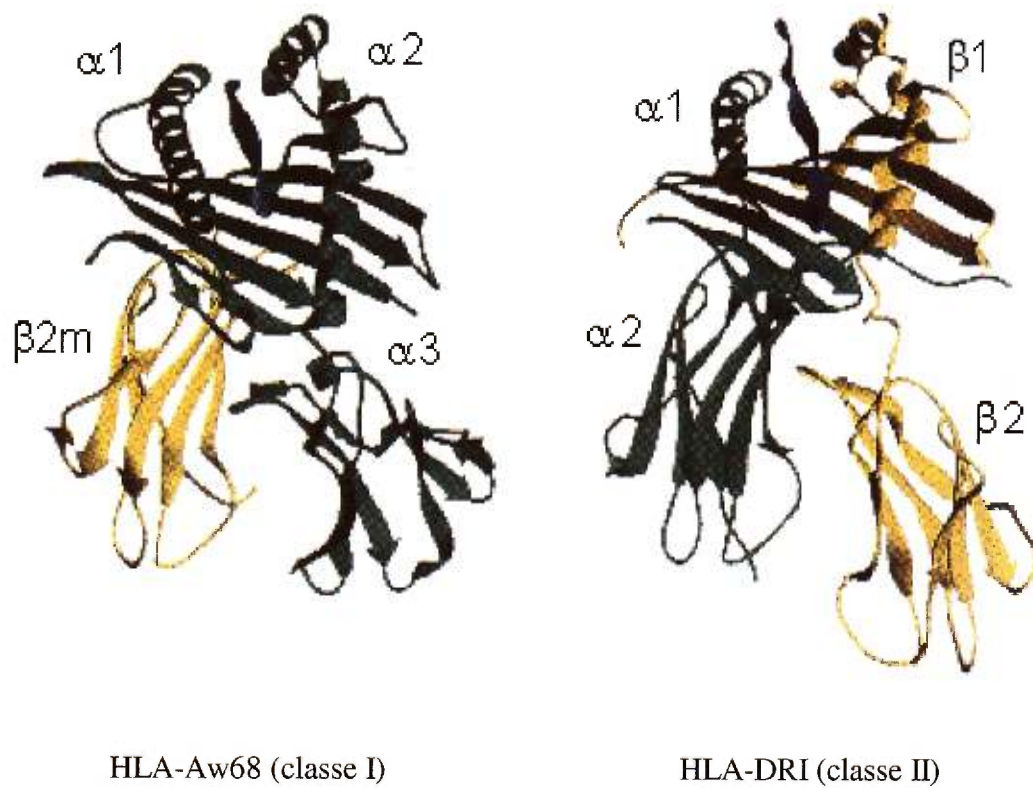


Figure 2. Structures cristallographiques des molécules de classe I et II du CMH. Les régions en vert représentent les domaines α et les régions en jaune, les domaines β . Les peptides (bleu) se lient dans la niche peptidique, formée des feuillettes antiparallèles β et des deux hélices α . L'organisation des domaines classe I ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3, \beta 2m$) et classe II ($\alpha 1\alpha 2, \beta 1\beta 2$) est différente mais leur structure cristallographique est similaire. (figure tirée de Stern et Wiley, 1994).

2.1.4 La présentation de l'antigène aux lymphocytes T

Les RcT reconnaissent les peptides antigéniques associés à aux molécules du CMH de classe I ou de classe II. Pour être reconnu par les cellules T, l'antigène doit subir une fragmentation en peptide ("processing"). Cette fragmentation nécessite un métabolisme cellulaire actif et comporte les étapes suivantes : une protéolyse en peptides, l'association de certains de ces peptides à des molécules du CMH et l'expression à la membrane cellulaire des complexes peptide-molécule du CMH. La section suivante décrira les sites de dégradation des Ag, leur association aux molécules du CMH ainsi que les deux voies de présentation de l'antigène.

2.1.4.1 La présentation de l'antigène par les molécules de classe I du CMH

Les molécules de classe I du CMH présentent aux lymphocytes T cytotoxiques des antigènes endogènes synthétisés par la cellule présentatrice et dégradés en peptides dans le cytosol (Braciale, 1992). Ceci constitue la voie endogène de présentation et assure que les cellules infectées par un virus ou autres agents pathogènes soient détruites par les lymphocytes T cytotoxiques (figure 3). Les peptides qui se lient aux molécules de classe I sont d'origine virale, tumorale ou provenant des protéines du soi.

Les antigènes présents dans le cytoplasme cellulaire sont dégradés en peptides par un complexe protéolytique cytoplasmique appelé protéasome. Le rôle des protéasomes dans le "processing" des Ag est renforcé par la présence dans le locus classe II du CMH de deux gènes, LMP2 et LMP7 codant pour des sous-unités des protéasomes (Goldberg et Rock, 1992). Ensuite les protéines TAP1/TAP2 sont responsables du passage des peptides du cytosol vers le RE. Des lignées déficitaires dans l'assemblage des molécules de CMH-classe I a permis de montrer que TAP 1 et TAP 2 étaient nécessaires pour la présentation de l'antigène endogène par les CMH-classe I. Les lignées cellulaires, telles RMA8 et T2 (Townsend *et al.*, 1989; Cerundolo *et al.*, 1990), peuvent exprimer les molécules de classe I à la surface cellulaire seulement en présence de peptides suggérant qu'elles sont déficitaires dans la

production de peptides. L'élimination des gènes TAP1/TAP2 dans les cellules T2 et la mutation du gène TAP1 dans les cellules RMA5 ont démontré l'importance de ces molécules dans l'assemblage et le transport intracellulaire des molécules de classe I (Pouis *et al.*, 1991; Spies et DeMars, 1991). L'importance de ces transporteurs dans la disponibilité des peptides dans le RE a été confirmée par la production de souris déficientes pour l'expression du gène TAP1 (Van Kaer *et al.*, 1992). Ces souris expriment peu de molécules classe I à la surface cellulaire et sont dépourvues de cellules T CD8⁺. Les peptides transportés dans le RE s'assemblent avec les hétérodimères de classe I. Ces complexes migrent vers l'appareil de Golgi puis à la surface cellulaire où ils sont reconnus par la cellule T.

2.1.4.2 La présentation de l'antigène par les molécules de classe II du CMH

Les molécules de classe II du CMH sont spécialisées dans la présentation d'antigènes d'origine exogène (Roche et Cresswell, 1990) (figure 3). Dans le RE, trois dimères $\alpha\beta$ s'associent à un trimère de chaîne invariante (Ii) formant ainsi des nonamères qui seront exportés vers l'appareil de Golgi (Roche *et al.*, 1991; Cresswell, 1992). La Ii existe sous quatre isoformes chez l'homme et deux isoformes chez la souris. L'isoforme principale p33 est une protéine monomorphe transmembranaire de type II avec une portion N-terminale intracytoplasmique de 30 a.a.. Elle possède une région transmembranaire de 256 a.a. servant à la translocation de la chaîne Ii dans le RE et une région C-terminale de 160 a.a. portant deux sites de glycosylation. (Claesson *et al.*, 1983; Strubin *et al.*, 1984; Cresswell, 1992).

L'importance de la chaîne invariante dans la présentation de l'Ag a été confirmée grâce à l'obtention par recombinaison homologe de souris dépourvues de chaîne Ii (Viville *et al.*, 1993). Les CPAg de ces souris sont incapables de présenter aux lymphocytes T un Ag natif provenant de la voie exogène confirmant la nécessité du transport de molécules de classe II aux endosomes. La chaîne invariante est impliquée dans le repliement des molécules de classe II puisque la synthèse des

molécules de classe II en absence de la chaîne Ii provoque la perte de certains épitopes d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces molécules de classe II (Anderson et Miller, 1992). Récemment, Busch *et al.*, (1996) ont montré qu'en absence de chaîne Ii, la majorité des molécules de classe II forment des complexes stables en se liant avec des protéines résidant dans le RE et sont ensuite transportées à la surface cellulaire. La chaîne Ii empêche l'association des molécules de classe II à des peptides endogènes présents dans le RE et l'appareil de Golgi (Neeffjes et Momburg, 1993). Le transport des molécules de classe II-chaîne Ii jusqu'aux endosomes s'effectue grâce à une séquence présente dans la partie intracytoplasmique de la chaîne Ii. La délétion de 15 a.a. amino-terminaux de l'isoforme p33 empêche le complexe classe II-chaîne Ii de migrer aux endosomes (Bakke et Dobberstein, 1990; Lotteau *et al.*, 1990). Il est possible que les complexes classe II-chaîne Ii migrent tout d'abord à la membrane cellulaire et sont ensuite internalisés dans les endosomes grâce à cette partie intracytoplasmique (Roche *et al.*, 1993). Dans les endosomes, la chaîne Ii subit une dégradation protéolytique à partir de son extrémité C-terminale. Des fragments de chaîne Ii restent associés aux dimères $\alpha\beta$. Ces fragments peptidiques nommés CLIP (class II associated Ii chain peptide) empêchent la liaison de peptides endogènes dans la niche lors de l'assemblage et le transport des molécules de classe II (Long *et al.*, 1994; Romagnoli et Germain, 1994). Dans les endosomes, le peptide CLIP est enlevé pour permettre la liaison des peptides exogènes. Ce processus est aidé par l'interaction du complexe classe II-Ii avec des molécules chaperonnes, les molécules DM, mises en évidence dans le compartiment appelé MIIC (MHC class II compartment) (Sherman *et al.*, 1995; Sanderson *et al.*, 1996). Ces molécules DM catalysent la dissociation du complexe classe II-CLIP et facilitent la liaison des peptides antigéniques qui sont ensuite exportés à la surface cellulaire (Denzin et Cresswell, 1995; Sloan *et al.*, 1995).

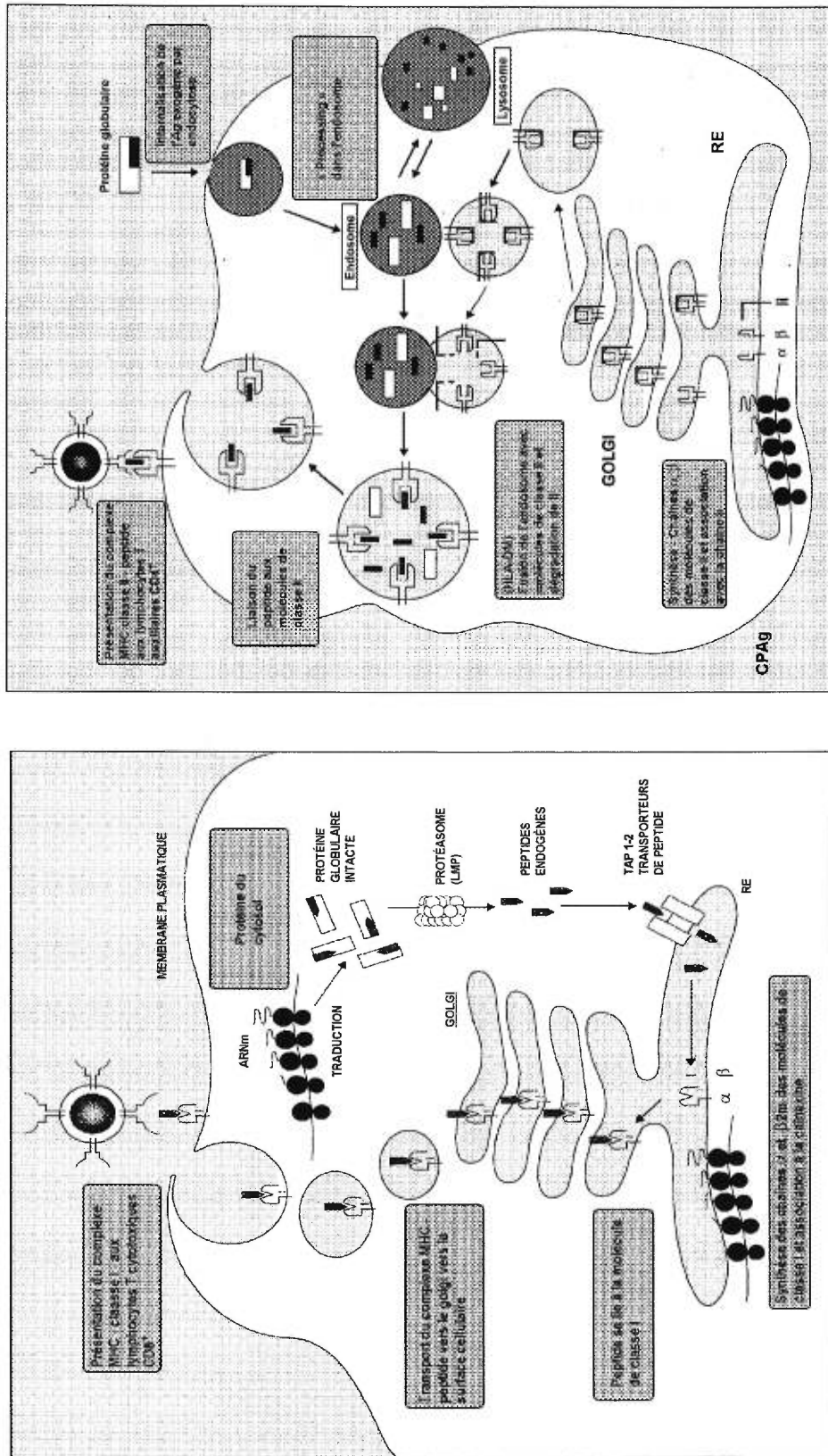


Figure 3. La présentation de l'antigène aux lymphocytes T. **A)** Présentation des peptides d'origine endogène par les molécules de classe I. Les protéasomes dégradent les protéines en peptides. Ces derniers sont transportés par les protéines TAP dans le RE où ils s'associent aux molécules de classe I. **B)** L'internalisation de l'antigène, sa dégradation en peptides et l'association de ces peptides d'origine exogène avec les molécules de classe II au niveau des endosomes. La dégradation de la chaîne Ii et la collaboration de hétérodimères HLA-DM pour le retrait des peptides CLIP libèrent la niche peptidique de la molécule de classe II facilitant ainsi la liaison du peptide antigénique (schéma modifié de Abbas *et al.*, 1994b).

2.2 Le récepteur à l'antigène des lymphocytes T

Les lymphocytes T possèdent à leur surface une classe de molécules leur permettant de reconnaître de manière spécifique une grande variété de protéines ou de cellules étrangères au soi. Ces molécules, nommées récepteurs spécifiques pour l'antigène des lymphocytes (RcT) présentent une structure en domaine qui est homologue à la famille des immunoglobulines (Tonegawa, 1983; Siu *et al.*, 1984). Le RcT reconnaît un fragment peptidique en association avec les molécules de classe I ou de classe II du CMH.

2.2.1 Organisation des gènes du récepteur T $\alpha\beta$

Le récepteur T est un hétérodimère constitué de deux chaînes glycoprotéiques, α et β ou γ et δ associées au complexe CD3 (Kronenberg *et al.*, 1986). Chaque chaîne α , β , γ et δ des récepteurs T comporte une région variable, une région jonctionnelle et une région constante ayant une structure semblable au domaine des immunoglobulines. Chez l'homme, il existe environ 100 segments de gènes variables (V), 70 segments jonctionnels (J) et un seul segment constant (C) pour la chaîne α et ces segments sont localisés sur le chromosome 14 (Wilson *et al.*, 1988; Satyanarayama *et al.*, 1988). Pour la chaîne β , on retrouve 65 segments de gènes V, 2D (diversité), 13J et 2C tous localisés sur le chromosome 7 (Hood *et al.*, 1985; Toyonaga *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1988; Robinson, 1991; Robinson *et al.*, 1993). Le locus qui contient les gènes V, D, J et C de la chaîne β est organisé afin que chaque région C β possède à proximité un gène D β et une série de gènes J β (figure 4). C'est le choix du segment D β et J β qui déterminera quelle région C β sera utilisée par la chaîne β du RcT. Le locus de la chaîne α du RcT contient les segments V δ , D δ , J δ et C δ codant pour la chaîne δ du RcT $\gamma\delta$ (Satyanarayana *et al.*, 1988). Les segments de gènes V α et V β sont regroupés en 33 et 30 familles respectivement (Ferradini *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1994; Arden *et al.*, 1995; Rowen *et al.*, 1996). L'homologie quant à la séquence nucléotidique entre

les membres d'une même famille est d'au moins 75 % tandis que celle entre les différentes familles varie entre 30 à 75 % (Wilson *et al.*, 1988).

Tout récemment, la séquence complète de l'ADN génomique de la chaîne β du RcT a été identifiée (Rowen *et al.*, 1996). Le locus de la chaîne β du RcT couvre 685 kilobases sur le chromosome 7. Cette région code pour 65 segments de gènes V dont seulement 46 sont fonctionnels et 19 sont des pseudogènes causés par des codons de terminaison ou un mauvais cadre de lecture (Rowen *et al.*, 1996). Tous les gènes V sont organisés dans l'orientation 5'-(V β -D β 1-J β 1.1-1.6-C β 1-D β 2-J β 2.1-2.7-C β 2-V β 20)-3' à l'exception de la V β 20 qui elle est dans l'orientation inverse à la fin du locus β . Par ailleurs, un groupement de six segments de gènes V β a été identifié à l'extérieur du locus β du RcT sur le chromosome 9 diminuant le nombre de ces régions pouvant être utilisées lors du réarrangement des chaînes β (Robinson *et al.*, 1993). Une autre caractéristique du locus β du RcT inclue, la présence d'un polymorphisme insertion/délétion résultant en allèles nuls pour des segments de V β (Seboun *et al.*, 1989; Rowen *et al.*, 1996).

2.2.2 Le réarrangement du récepteur T $\alpha\beta$

Les réarrangements somatiques des gènes des RcT sont très semblables à ceux des immunoglobulines (Tonegawa, 1983). L'ordre des réarrangements des gènes des RcT semble être γ et δ , puis β et α . Lorsque le locus γ et le locus δ sont fonctionnellement réarrangés, la cellule T exprime le récepteur $\gamma\delta$ à sa surface. Si les réarrangements γ et δ ne sont pas productifs, les loci β et α sont ensuite réarrangés. Le réarrangement fonctionnel des deux loci permet l'expression du récepteur $\alpha\beta$ à la surface des lymphocytes T.

La première étape du réarrangement consiste en la réunion d'un segment D β avec J β . A l'assemblage D β -J β se lie le segment V β pour former un gène V β (Raulet

et al., 1985). Le gène β réarrangé est transcrit en ARN primaire dont un épissage élimine l'intron séparant le gène $V\beta$ de $C\beta$. La séquence d'ARNm est ensuite traduite en protéines. Les segments $V\beta$, $D\beta$ et $J\beta$ et $V\alpha$, $J\alpha$ peuvent se combiner de façon aléatoire afin de donner naissance à un gène $V\beta$ ou $V\alpha$ particulier. Ces différentes combinaisons représentent la clef de la diversification génétique (Siu *et al.*, 1984; Toyonaga *et al.*, 1985). Lorsqu'on étudie les mécanismes d'assemblage des RcT, il y a en aval des extrémités 3' des segments génétiques V, de chaque côté des segments D, et en amont (5') des segments J, des séquences conservées. Ces séquences nucléotidiques se retrouvent uniquement dans les immunoglobulines et les RcT : ce sont les séquences nucléotidiques de recombinaison (RSS). Elles se composent d'un heptamère possédant une séquence conservée d'un segment à un autre (consensus CACAGTG) et d'un nonamère riche en adénine et thymine. Ces heptamères et nonamères sont séparés par un élément intercalaire de séquence non conservée de 12 ou 23 paires de bases. Les séquences heptamériques et nonamériques qui suivent un segment génétique donné sont complémentaires de celles qui précèdent le segment génétique avec lequel ce premier peut s'assembler. Les recombinaisons RAG-1 et RAG-2 sont essentielles au processus du réarrangement (Schatz *et al.*, 1989; Oettinger *et al.*, 1990). Leur rôle majeur dans la recombinaison V(D)J a été démontré par la création de souris chez lesquelles l'activité de RAG-1 ou RAG-2 a été supprimée par recombinaison homologue. Dans les deux cas, un déficit immunitaire majeur lié à l'absence de réarrangements de RcT et de RcB (récepteur spécifique de cellules B) et par conséquent absence de cellules T ou B matures est observé (Mombaerts *et al.*, 1992; Shinkai *et al.*, 1992).

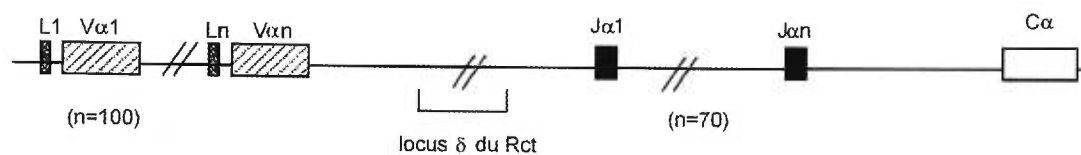
Les jonctions codantes sont modifiées par des délétions et des additions de séquences N ou de courtes séquences palindromiques P, ces dernières n'étant observées qu'en l'absence de délétion des séquences codantes. L'addition de séquence N est en partie due à l'activité de l'enzyme TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) exprimée dans les cellules lymphoïdes immatures, notamment chez

l'adulte. Le rôle de la TdT a été confirmé par des souris chez lesquelles l'activité a été supprimée par recombinaison homologue (Komori *et al.*, 1993; Gilfillan *et al.*, 1993). En résumé, la jonction codante est créée par alignement, réparation et ligation. Les réparations des jonctions codantes impliquent deux enzymes, soit Ku80 ou une sérine/thréonine (ADN-PK). Les souris *scid* présentent un déficit immunitaire combiné sévère dû à une incapacité de couper les jonctions codantes, étape préalable à la réparation puis à la ligation des extrémités codantes. Les souris *scid* et les souris *Ku80^{-/-}* ne peuvent donc pas recombinaison les gènes Ig et RcT (Blunt *et al.*, 1995; Nussenzweig *et al.*, 1996).

L'exclusion allélique permet d'assurer que chaque lymphocyte T ou B n'exprime seulement qu'un récepteur produit par un seul des deux allèles. Le réarrangement fonctionnel de la chaîne β sur un allèle, inhibe le réarrangement de l'autre allèle. La chaîne α du RcT n'est pas strictement soumise à l'exclusion allélique. Une grande proportion des cellules T périphériques (>30 %) possèdent deux chaînes α fonctionnelles et réarrangées (Malissen *et al.*, 1988; Casanova *et al.*, 1991; Padovan *et al.* 1993). La présence d'un transcrite fonctionnel n'inhibe pas toujours le réarrangement sur l'autre allèle du locus α . Dans ce cas, la chaîne α du RcT s'associant plus efficacement avec la chaîne β sera celle qui est exprimée à la surface cellulaire (Malissen *et al.*, 1992). Cette grande flexibilité permet probablement d'augmenter le nombre de lymphocytes T qui seront sélectionnés positivement lors de la différenciation thymique (Petrie *et al.*, 1993). Généralement, un seul RcT fonctionnel de séquence unique est exprimé par un lymphocyte T d'où le concept de "clonalité des cellules T". Cependant Padovan *et al.*, (1995) ont décrit dernièrement que 1 à 3 % des cellules T périphériques peuvent exprimer deux chaînes β fonctionnelles suggérant que certaines cellules T peuvent exprimer 4 différents RcT à leur surface. De plus, il a été démontré qu'un RcT pouvait reconnaître plusieurs peptides distincts (Bhardwaj *et al.*, 1993). Par exemple, Wucherpfennig et Strominger (1995) ont démontré que des clones de cellules T spécifiques pour une portion de

l'autoantigène MBP (protéine basique de la myéline), pouvaient également reconnaître d'autres peptides dérivés d'antigènes étrangers; virus de l'*Herpes simplex*, adénovirus. La notion de clonalité des cellules T ne semble donc pas absolue.

LOCUS α du RcT



(L) séquence signal

LOCUS β du RcT



(L) séquence signal

Figure 4. Organisation génétique des locus α et β du RcT. Chez le locus α , il existe environ 100 segments de gènes V, 70J et un segment C. Pour la chaîne β , il y a environ 65 segments V, 2D, 13J et 2C. Le réarrangement des segments de gènes V-J-C et V-D-J-C permet la formation des gènes complets codant pour les chaînes α et β du RcT.

2.2.3 La diversité du récepteur T $\alpha\beta$

La diversité des chaînes des récepteurs T dépend de plusieurs mécanismes : Premièrement, la diversité combinatoire est une conséquence du nombre de gènes V et de segments D et J. L'utilisation d'un grand nombre de segments de gènes différents permet leur association en différentes combinaisons pour la formation de la région variable. Dans le cas de la chaîne β , chacun des 47 gènes fonctionnels de $V\beta$ peuvent réarranger avec un des deux segments $D\beta$ et un des 13 segments $J\beta$. Certains réarrangements, soit la réunion des segments $D\beta 1$ et $J\beta 2$, soit $D\beta 1$ avec $D\beta 2/J\beta 2$ ont été décrits (Ferradini *et al.*, 1991). Pour la chaîne α du RcT, il n'y a pas de segments D, mais 75 segments de $J\alpha$ sont présents. Deuxièmement, la flexibilité jonctionnelle qui consiste en un assemblage imprécis des segments de gènes lors du réarrangement peut occasionner l'élimination de nucléotides à la fin des segments V, D et J augmentant ainsi la diversité des chaînes du RcT. Troisièmement, le segment de gène D peut être utilisé dans les trois cadres de lecture (Rowen *et al.*, 1996). Quatrièmement, l'ajout de nucléotides (régions N) aux points de jonction V-J, V-D et D-J lors du réarrangement et les régions P, contribuent à la diversité. Les régions P sont plus souvent utilisées lors du réarrangement des Igs (Rosenberg *et al.*, 1992). Cette addition de régions N est catalysée par l'enzyme TdT (Komori *et al.*, 1993; Gilfillan *et al.*, 1993). Cinquièmement, l'association de différentes chaînes α avec les différentes chaînes β permet d'augmenter la taille du répertoire. Ces mécanismes qui engendrent la diversité peuvent produire environ 10^{15} combinaisons possibles du RcT $\alpha\beta$. L'hypermutation somatique qui substitue des nucléotides de la région V des Igs semblerait être restreinte à la chaîne α du RcT (Ikuta *et al.*, 1985; Zheng *et al.*, 1994).

Finalement, le polymorphisme allélique des segments $V\alpha$ et $V\beta$ dans la population humaine contribue à diversifier le répertoire de lymphocytes T (Cornélis *et al.*, 1993; Reyburn *et al.*, 1993). Plusieurs gènes fonctionnels $V\beta$ montrent un polymorphisme allélique au niveau du RcT (Wei *et al.*, 1994; Arden *et al.*, 1995). Ces

polymorphismes retrouvés dans les exons de la région V du RcT, ont permis de créer plusieurs haplotypes au niveau du locus β du RcT. Un des exemples le mieux étudié est celui de la V β 6.7. La V β 6.7 possède 2 allèles : a et b pouvant être distingués par RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Posnett *et al.*, 1986; Li *et al.*, 1990; Vissinga *et al.*, 1994; Liao *et al.*, 1996a; Liao *et al.*, 1996b). Ces allèles diffèrent par 2 substitutions d'acides aminés aux positions 38 et 72. Ces différences sont suffisantes pour avoir un impact sur la réponse aux SAg, fournissant ainsi une preuve directe de l'influence du polymorphisme sur la fonction du RcT (Prashar *et al.*, 1991; Dobrescu *et al.*, 1995a; Ciurli *et al.*, soumis, a). Le polymorphisme allélique peut conduire à la présence d'allèles non exprimés possédant un phénotype nul, c'est le cas de la V β 20 (Charmley *et al.*, 1993). Des polymorphismes ayant lieu à l'extérieur des exons du RcT peuvent avoir des conséquences sur l'expression de certains gènes. Par exemple, une mutation dans l'élément intercalaire de séquence non conservée des RSS est associée à une faible expression de la V β 3 chez certains individus (Posnett *et al.*, 1994; Donahue *et al.*, 1994). De plus, le polymorphisme semble jouer un rôle dans la susceptibilité des individus à développer certaines maladies auto-immunes. Par exemple, un allèle de la V β 6.1 est associé à l'arthrite rhumatoïde juvénile. Une seule substitution d'un a.a. empêche l'expression de l'allèle qui ne peut former un RcT fonctionnel (mutation nulle) (Seboun *et al.*, 1989; Luyrink *et al.*, 1993).

2.2.4 Structure et fonctions du récepteur T $\alpha\beta$

Le récepteur T est une glycoprotéine membranaire formée de deux chaînes reliées par un pont disulfure. La majorité des cellules T (>90 %) du sang périphérique expriment un RcT $\alpha\beta$ et 1 à 10 % des lymphocytes T périphériques, expriment un RcT $\gamma\delta$ (Haas *et al.*, 1993). La localisation anatomique des lymphocytes T $\gamma\delta$ matures est principalement restreinte aux muqueuses de l'intestin et de la peau (Porcelli *et al.*, 1991). L'expression par les cellules T des hétérodimères $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ est mutuellement

exclusive. Les RcT $\gamma\delta$ semblent reconnaître des antigènes solubles, des protéines membranaires mais sans que celles-ci soient dégradées, ni présentées par les molécules du CMH, ainsi que des métabolites ou des produits de dégradation du complexe de polyisoprénoides présents dans la paroi cellulaire des bactéries (revue par Kaufman, 1996; De Libero, 1997). Les RcT $\alpha\beta$, quant à eux, reconnaissent un fragment peptidique en association avec les molécules de classe I ou classe II du CMH (Davis et Bjorkman, 1988).

La similitude du RcT et de Igs a permis de proposer un modèle de la structure du RcT basé sur la structure cristallographique des Igs. Tout comme le RcT, les Igs se composent de régions variables (V-J et V-D-J) et constantes. Les régions constantes du RcT et des Igs se nomment charpente et les domaines V contiennent 3 régions hypervariables CDR (complementary-determining-region) responsables de la reconnaissance antigénique. Les régions hypervariables du RcT sont composées des a.a. 25-31, 48-56 et 93-104 formant respectivement les CDR1, CDR2 et CDR3 de la chaîne α . Les CDR1-3 de la chaîne β du RcT incluent les résidus 26-31, 46-70, 95-106 (Toyonaga et Mak, 1987; Chothia *et al.*, 1988; Kabat *et al.*, 1991). Une quatrième région HV4 ou CDR4 située entre les a.a. 68 à 76 de la chaîne β jouerait un rôle critique dans la reconnaissance des SAgs (Pullen *et al.*, 1990; Pullen *et al.*, 1991). Cette structure du RcT a permis de proposer un modèle illustrant la reconnaissance antigénique par le RcT. Les a.a. formant les CDR1 et CDR2 sont codés dans le génome par la région V et sont moins variables que les CDR3 qui sont codés par une juxtaposition des segments V-J ou V-D-J. Les CDR1-2 des chaînes α et β du RcT reconnaîtraient les molécules du CMH tandis que les CDR3 interagiraient avec le peptide antigénique (Davis et Bjorkman, 1988; Claverie *et al.*, 1989). Décrivons brièvement les principales évidences expérimentales supportant ce modèle de reconnaissance antigénique.

L'importance du CDR3 du RcT dans la liaison du peptide a été démontrée par les travaux de Engel et Hedrick (1988). Ils ont remarqué que les cellules T capables de reconnaître le peptide 88-104 du cytochrome C du papillon dans le contexte des molécules de classe II du CMH I-E^s chez la souris utilisaient les régions V α 11.1 et V β 3 du RcT. Un acide aspartique était toujours présent en position 100 du CDR3 de la chaîne β du RcT (Hedrick *et al.*, 1988). La mutation de l'acide aspartique abolit la reconnaissance de l'antigène (Engel et Hedrick, 1988). Jorgensen *et al.*, (1992) ont clairement démontré le rôle du CDR3 du RcT dans la reconnaissance du peptide. Ils ont observé que des substitutions de charges dans un peptide entraînent des changements de charges dans les jonctions VJ ou VDJ des CDR3 des chaînes α et β du RcT spécifique au peptide. Le RcT adapte sa région CDR3 au peptide modifié en substituant les nucléotides N des jonctions VDJ. De plus, les régions CDR3 des chaînes V α et V β du RcT reconnaissent des résidus différents sur le peptide.

Le choix du segment J β du RcT durant le réarrangement joue aussi un rôle dans la reconnaissance antigénique. Au moins 4 nucléotides de l'ADN génomique du segment J β contribue à la portion C-terminale du CDR3. Ces résidus polymorphiques différents entre les segments J β , ont une influence sur la reconnaissance des SA_g par les cellules T possédant un RcT spécifique (Ciurli *et al.*, soumis, a).

La mutation de certains résidus dans les boucles CDR1-2 affecte la reconnaissance du complexe peptide-molécules du CMH suggérant qu'il existe une interaction de ces régions avec les molécules du CMH. Une évidence plus directe d'une telle interaction a été montrée par Hong *et al.*, (1992). Le transfert des régions CDR1 et CDR2 de la chaîne α d'un RcT dans un RcT ne reconnaissant pas I-A^d permet maintenant la reconnaissance allogénique de cette molécule de classe II du CMH (Hong *et al.*, 1992).

Garboczi *et al.*, (1996) ont montré pour la première fois un cristal du complexe molécule HLA-A2 de classe I du CMH-peptide viral tax-RcT. Ce complexe indique que les régions CDR1-2 des 2 chaînes du RcT interagissent avec les hélices α des domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ du CMH, tandis que la région CDR3 des chaînes α et β interagissent avec la partie N-terminale et C-terminale du peptide respectivement.

Récemment, la structure tridimensionnelle des chaînes α et β du RcT a été déterminée (Bentley *et al.*, 1995; Fields *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1996; Fields et Mariuzza, 1996). Ces structures cristallographiques confirment ce qui avait été postulé pour la structure des Igs (figure 5). Plusieurs caractéristiques structurales présentes dans le RcT sont absentes chez les Igs. Par exemple, les domaines $V\beta$ et $C\beta$ sont très près l'un de l'autre tandis que pour les Igs, ces domaines sont plus éloignés. De plus, la chaîne $V\alpha$ du RcT possède une topologie très différente de celle des Igs. La chaîne α du RcT est capable de former un homodimère en solution et aussi dans la structure cristallographique (Fields *et al.*, 1995). Le modèle du RcT sous forme de dimère d'hétérodimères aurait beaucoup de similitudes avec le dimère d'hétérodimères des molécules de classe II. Les boucles du CDR3 de chacune des chaînes α et β des RcT sont capables de lier les peptides antigéniques dans les niches des molécules de classe II HLA-DR1 : Le CDR3 de la chaîne α interagit avec la portion N-terminale du peptide et le CDR3 de la chaîne $V\beta$ avec la portion C-terminale du peptide. Le domaine $\alpha 1$ de la molécule de classe II interagirait avec les boucles CDR1-2 de la chaîne β du RcT et le domaine $\beta 1$ avec les boucles CDR1-2 de la chaîne α (Fields et Mariuzza, 1996). Ce modèle confirme les expériences de mutagenèse décrites plus haut, par Jorgensen *et al.*, (1992).

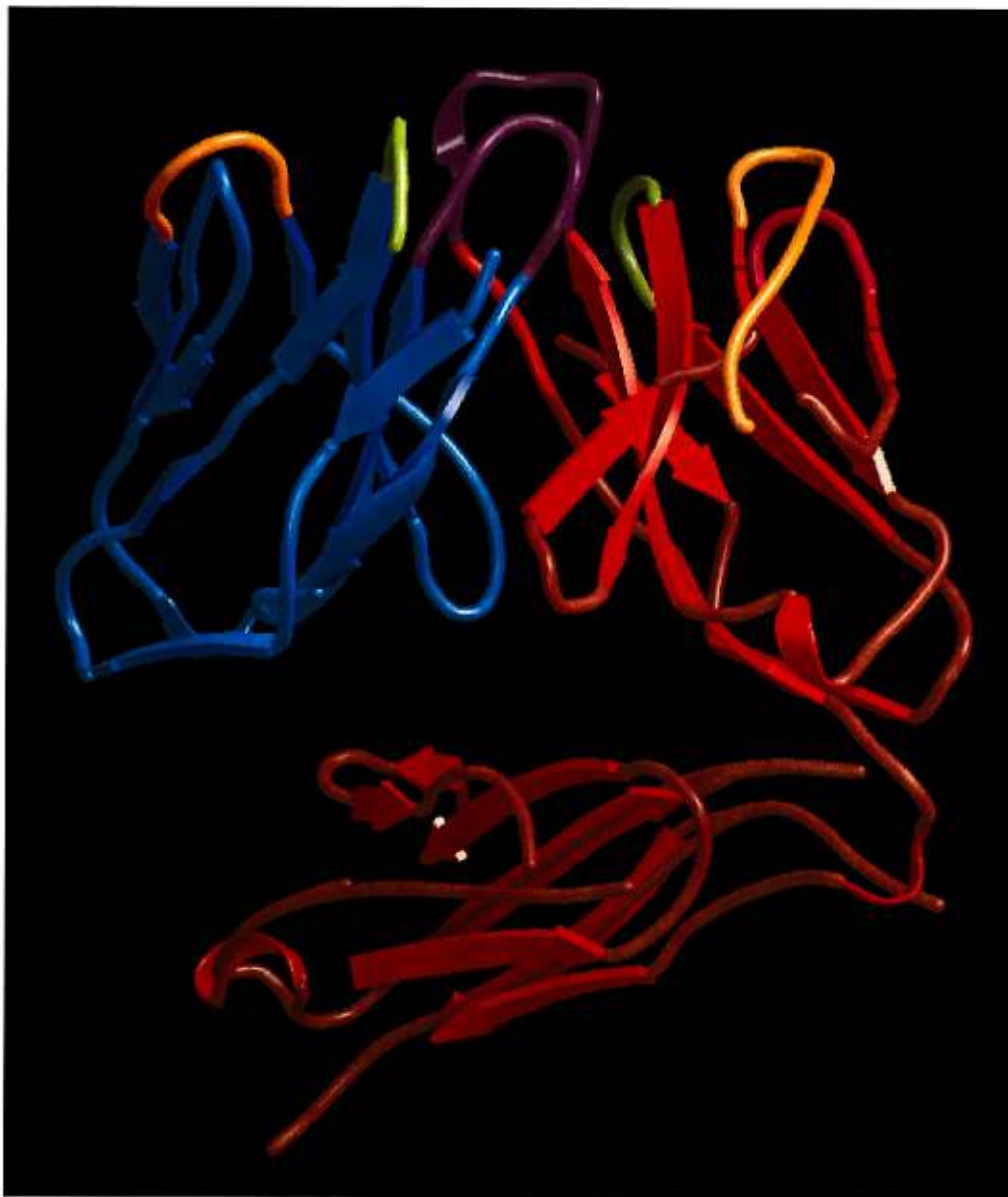


Figure 5. Structure tridimensionnelle des chaînes α et β du RcT.

Modélisation de la chaîne β du RcT (rouge) et du domaine $V\alpha$ (bleu) produite par Molscrip (Kraulis, 1991) (IRIS Indigo 2, Silicon Graphics). Les régions CDR1 (vert), CDR2 (orange), CDR3 (violet) et HV4 (rose). (Bentley *et al.*, 1995; Fields *et al.*, 1996; Garboczi *et al.*, 1996).

2.2.5 Le complexe RcT/CD3 et la transduction des signaux d'activation du récepteur T

Le lymphocyte T reconnaît l'Ag par l'intermédiaire d'un complexe de molécules de surface formé par le RcT et le complexe CD3. Le complexe est composé de huit chaînes polypeptidiques regroupées en quatre dimères : α/β , γ/ϵ , δ/ϵ et ζ/ζ (Samelson *et al.*, 1985; Klausner *et al.*, 1990; Altman *et al.*, 1990) (figure 6). Le dimère ζ/ζ peut être substitué par un dimère ζ/η . Dans une population clonale de cellules T, 90 % des RcT sont associés à un dimère ζ/ζ alors que seulement 10 % des RcT sont associés à un dimère ζ/η (Baniyash *et al.*, 1988; Klausner *et al.*, 1990). Le complexe CD3 est requis pour l'expression du RcT à la surface cellulaire. L'assemblage du complexe RcT/CD3 a lieu dans le RE de la cellule et seuls les complexes complets migreront vers l'appareil de Golgi avant d'être exprimés en surface (Altman *et al.*, 1990).

Le RcT est incapable de transmettre un signal intracellulaire puisqu'il possède une partie intracytoplasmique très courte (Klausner *et al.*, 1990). Le complexe CD3 (γ , δ , ϵ) qui est lié de façon non covalente au RcT ne confère aucune spécificité antigénique au complexe RcT/CD3 mais est responsable de la transmission des signaux externes vers l'intérieur de la cellule. Les chaînes du complexe CD3 sont des protéines transmembranaires ayant une partie intracytoplasmique importante (Altman *et al.*, 1990) (figure 6).

Le signal transmis suite à la reconnaissance de l'antigène par le RcT implique la phosphorylation des protéines du CD3 sur les résidus tyrosine, par des tyrosines kinases (PTK) (June *et al.*, 1990). Plusieurs PTK sont exprimées dans les lymphocytes T, mais seulement trois d'entre elles sont associées à des protéines impliquées dans l'activation des cellules T. Il existe deux types de PTK spécifiques des cellules T : deux PTK de la famille Src : $p56^{lck}$ et $p59^{fyn}$ et une PTK de la famille Syk, ZAP-70. La tyrosine kinase $p56^{lck}$ est associée à CD4 et CD8 α , (Veillette *et al.*,

1988) et sa présence est essentielle à l'activation cellulaire puisqu'en son absence la stimulation cellulaire est compromise (Straus et Weiss, 1992). La PTK p59^{fyn} est associée à la chaîne ζ du CD3 (Appleby *et al.*, 1992). L'activation de p56^{lck} et p59^{fyn} requiert la déphosphorylation des résidus tyrosine situés en position C-terminale de ces tyrosines kinases. Une des enzymes impliquée dans cette déphosphorylation est la phosphatase CD45 (Mustelin *et al.*, 1992). CD45 est nécessaire à la transduction des signaux par les récepteurs des lymphocytes T. Suite à son activation, p56^{lck} peut phosphoryler la protéine ζ du complexe CD3 (Veillette *et al.*, 1989) et se lie alors à ζ ou ϵ au niveau d'un domaine cytoplasmique spécifique appelé ARAM (antigen recognition activation motif) (Weiss et Littman, 1994; Chan *et al.*, 1994; Hatada *et al.*, 1995). La chaîne ζ phosphorylée est alors capable de s'associer à d'autres PTK comme ZAP-70 (Straus et Weiss, 1993; Iwashima *et al.*, 1994). La stimulation du RcT induit la phosphorylation sur tyrosine d'une protéine cytoplasmique, PLC γ 1. La PLC γ 1 activée hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 2,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). La production de DAG provoque l'activation de la protéine kinase C (PKC). IP3, de son côté, induit une augmentation de la concentration du calcium intracytoplasmique libre. Ces seconds messagers activeront à leur tour la transcription de gènes de l'IL-2 (Schwartz, 1992; Clipstone et Crabtree, 1992; Weiss et Littman, 1994; Cantrell, 1996) (figure 7).

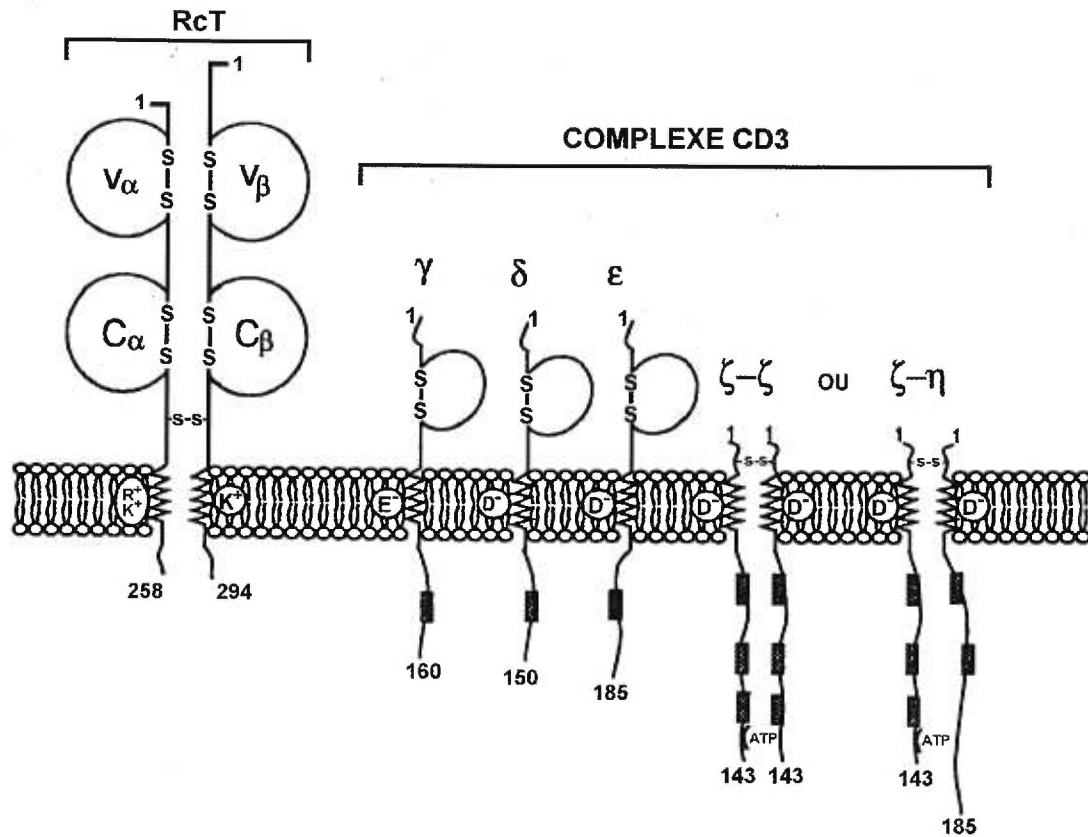


Figure 6. Représentation schématique du complexe R α T/CD3. Les chaînes $\alpha\beta$ sont associées de façon non covalente aux chaînes $\gamma\delta\epsilon\zeta\eta$. Le motif ARAM composé de résidus leucine et tyrosine est présent en une copie dans la partie intracytoplasmique des protéines du CD3 et en trois copies pour la chaîne ζ .

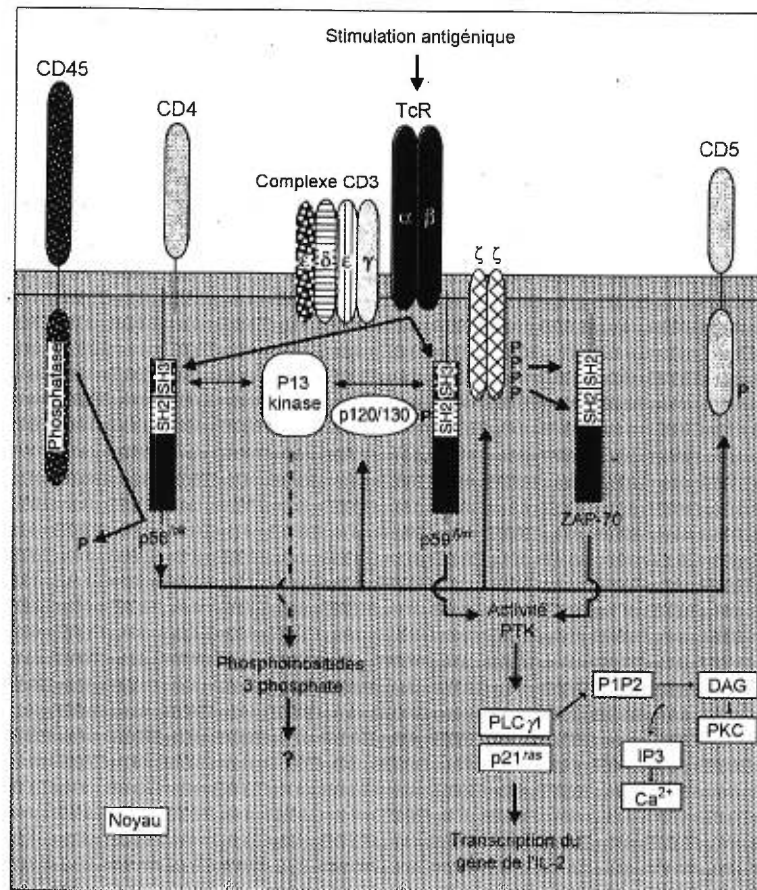


Figure 7. La transduction du signal après stimulation du complexe R α T/CD3. La stimulation antigénique est responsable de l'activation de la PTK p56^{lck} qui phosphoryle la chaîne ζ . Celle-ci interagit avec la PTK ZAP-70 via les motifs ARAM. Une série de phosphorylations sur des résidus tyrosine permet l'activation de protéines cytoplasmiques comme la PLC γ et de protéines membranaires, telles que CD3 δ et γ , CD5. La PTK p59^{fyn} associée à la chaîne ζ et au CD3, ainsi qu'à une protéine non identifiée de 120/130 kDa est activée après la stimulation du complexe R α T/CD3. La phosphatase CD45 régule les PTK p56^{lck} et p59^{fyn} en agissant sur la phosphorylation d'une tyrosine en C-terminale. La déphosphorylation du résidu tyrosine permet leur activation. La PLC γ activée hydrolyse PIP2 en DAG et IP3. Le DAG active la PKC et IP3 augmente la Ca²⁺ intracytoplasmique. Ces seconds messagers participent à l'initiation de la transcription de gènes de l'IL-2 (schéma modifié de Hérold *et al.*, 1995).

2.3 Les lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques

Il existe deux populations distinctes de lymphocytes T : les cellules T auxiliaires (T helper; Th) et les cellules T cytotoxiques (cytotoxic T cells; CTL). Les cellules Th expriment à leur surface la molécule accessoire CD4 et les CTL expriment la molécule CD8. Ces molécules sont les co-récepteurs impliqués dans l'interaction CMH/peptide/RcT. Les molécules CD4 et CD8 se lient aux régions non polymorphiques des molécules du CMH-classe II et CMH-classe I respectivement et augmentent la force de liaison entre le lymphocyte et la CPAg (Konig *et al.*, 1992). Elles participent également aux signaux de transduction lors de la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le RcT (Julius *et al.*, 1993). À l'aide de la molécule CD4, les lymphocytes Th ($CD4^+CD8^-$) reconnaissent les antigènes exogènes présentés par les molécules du CMH-classe II et les CTL ($CD4^-CD8^+$) reconnaissent à l'aide de la molécule CD8 les antigènes endogènes présentés par les molécules du CMH-classe I (figure 8).

La fonction de chacune de ces deux populations de lymphocytes T découle directement de la nature de l'antigène reconnu. Ainsi lors de l'établissement d'une réponse immunitaire de type humorale, pour les lymphocytes T auxiliaires, l'antigène exogène est capturé par les immunoglobulines de surface des lymphocytes B. L'antigène est ensuite dégradé et les peptides antigéniques produits s'associent aux molécules de classe II. Les complexes peptide-classe II exprimés à la surface des cellules B sont reconnus par les lymphocytes $CD4^+$. Cette interaction B-T aboutit à l'activation des cellules B. Suite à l'activation des cellules $CD4^+$, celles-ci sécrètent des lymphokines qui permettent la prolifération des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines. Les cellules T cytotoxiques vont lyser directement les cellules ayant présenté un antigène viral ou tumoral afin de limiter l'atteinte de l'hôte (Hedrick, 1989).

LYMPHOCYTE T CD8⁺LYMPHOCYTE T CD4⁺

CLASSE I

CLASSE II

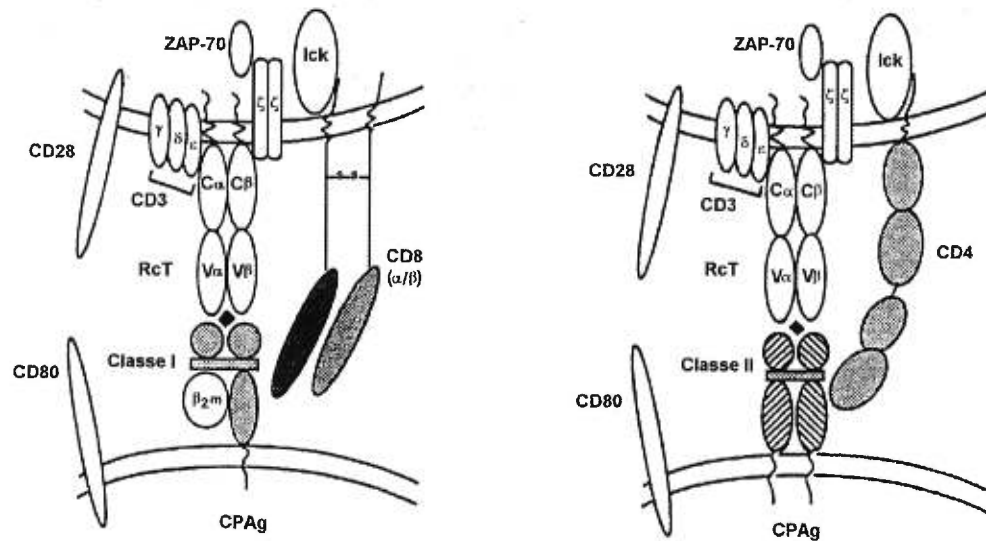


Figure 8. Présentation et reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T.

Le RcT des lymphocytes T CD4⁺ reconnaît par la région variable (V) de ses sous-unités αβ un peptide antigénique dans le contexte des molécules de classe II du CMH. Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent le peptide présenté par les molécules de classe I du CMH. Les molécules membranaires CD28 et CD80 participent au processus d'activation du lymphocyte T et de la CPAg.

Les lymphocytes T sont aussi capables d'interagir avec un type d'antigène appelé superantigène (SAg). Contrairement aux Ag conventionnels, la présentation du SAg n'est pas restreinte pour le CMH. En effet, les SAg interagissent avec une région du RcT qui est distincte de celle impliquée dans la reconnaissance des Ag conventionnels (Choi *et al.*, 1990; Pullen *et al.*, 1990; Pullen *et al.*, 1991). De plus, les SAg stimulent une très grande proportion de lymphocytes T comparativement aux Ag conventionnels. Les SAg bactériens peuvent se lier à différents allèles et isotypes des molécules de classe II et ne requièrent aucune dégradation. Par contre, les SAg viraux tel *Mtv-7* (ou vSAg7), nécessiteront une protéolyse partielle sans par contre se lier sous forme de peptides dans la niche des molécules de classe II du CMH (Winslow *et al.*, 1992; Winslow *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1995).

Jusqu'à présent, nous avons vu que l'interaction entre la molécule du CMH, le peptide et le RcT est la pierre angulaire de la reconnaissance antigénique et qu'il y a déjà à ce niveau une sélection des antigènes reconnus sans toutefois qu'il y ait discrimination entre le soi et le non-soi.

3.0 L'ÉDUCATION THYMIQUE

L'élaboration d'un répertoire de lymphocytes T dirigé préférentiellement contre les antigènes du non-soi se déroule dans le thymus. Puisque les molécules du CMH sont incapables de distinguer entre le soi et le non-soi et que, par le réarrangement aléatoire des RcT, les cellules T vont acquérir des récepteurs pouvant reconnaître le soi, le non-soi ou produire des récepteurs non fonctionnels, un mécanisme complexe de maturation et de sélection des lymphocytes T a été mis en place : l'éducation thymique.

3.1 La maturation des précurseurs des lymphocytes T

La maturation des cellules T dans le thymus se fait préférentiellement pendant la vie foetale. Les précurseurs des lymphocytes T formés initialement dans le foie foetal, puis dans la moelle osseuse colonisent le thymus au sein duquel ils subissent plusieurs étapes de maturation (Pardoll et Carrera, 1992). Au cours de l'ontogénie, les cellules précurseurs des lymphocytes T humains provenant de la moelle osseuse se différencient en prothymocytes puis en thymocytes et enfin en lymphocytes T matures dans le thymus (figure 9). La maturation des thymocytes se caractérise par l'acquisition ou la perte successive des marqueurs de surface (Fowlkes *et al.*, 1988). Initialement, les précurseurs de lymphocytes T entrant dans le thymus n'expriment pas en surface de RcT ni les molécules CD4 et CD8 qui caractérisent les cellules T matures. Une fois dans le cortex du thymus, les cellules précurseurs doubles négatives ($CD4^-CD8^-RcT^-$) acquièrent l'expression des molécules $CD4^+$, $CD8^+$, se sont les cellules doubles positives ou thymocytes immatures ($CD4^+CD8^+RcT^-$). Dans ces cellules, la chaîne β du RcT est réarrangée et précède l'apparition des molécules CD4, CD8. La poursuite de la maturation se fera seulement lorsque la chaîne β réarrangée du RcT apparaîtra en surface. La chaîne β sera accompagnée des composantes du complexe CD3 et d'une protéine de 33 kDa (gp33) nommée la chaîne pré-RcT α (Groettrup *et al.*, 1993). Ce complexe serait impliqué dans l'expansion clonale des thymocytes immatures via des signaux d'activation produit par la tyrosine $p56^{lck}$ (Saint-Ruf *et al.*, 1994). Par la suite les lymphocytes T vont acquérir les co-récepteurs CD4 et CD8, et réarrangeront la chaîne α du RcT. A ce stade, les thymocytes expriment un faible niveau de RcT ($CD4^+CD8^+RcT^{bas}$). Seulement 5 % de tous les précurseurs des lymphocytes T vont compléter chacune des étapes et se retrouver en périphérie pour former les cellules T matures (Ritter et Boyd, 1993).

Au cours de leur migration du cortex vers la médulla thymique, les thymocytes $CD4^+CD8^+RcT^{bas}$ sont soumis à deux étapes distinctes de sélection : une sélection positive, processus par lequel seuls les lymphocytes T possédant un RcT fonctionnel

pouvant reconnaître une molécule du CMH échapperont à la mort programmée (apoptose), et par une sélection négative, processus par lequel les lymphocytes T possédant un RcT capable de reconnaître les Ag du soi vont être éliminés avant d'atteindre la périphérie. Lorsque la sélection positive est complétée, le lymphocyte T va acquérir le phénotype $CD4^+CD8^+$ s'il est sélectionné par une molécule du CMH-classe I, et $CD4^+CD8^-$ s'il est sélectionné par une molécule du CMH-classe II. Le mode d'acquisition des co-récepteurs CD4 et CD8 durant la sélection positive fait partie d'un intense débat depuis plusieurs années. Brièvement, il existe deux modèles : le modèle instructif et le modèle stochastique. Selon le modèle instructif, les cellules T $CD4^+CD8^+$ sont sélectionnées par les cellules accessoires du thymus. Une certaine affinité entre le RcT du thymocyte et les molécules classe II du CMH provoque l'augmentation des niveaux d'expression du RcT du thymocyte et la diminution d'expression de la molécule CD8. Par contre, si le RcT du thymocyte a une affinité pour les molécules classe I du CMH, le thymocyte sera informé d'augmenter ses niveaux du RcT et diminuer l'expression de la molécule CD4. Selon, le modèle stochastique, l'acquisition du phénotype $CD4^+CD8^-$ ou $CD4^+CD8^+$ par le lymphocyte T précéderait la sélection positive de façon aléatoire. Cette théorie suppose qu'un même signal de survie est envoyé à tous les RcT, peu importe leur élément de restriction (revue par Chan *et al.*, 1993; von Boehmer, 1994).

Dans le processus normal de maturation, les lymphocytes T vont également être sujets à la sélection négative. La sélection négative éliminera par apoptose (Fadock, 1992; Williams et Smith, 1993) ou inactivation (anergie) tous les thymocytes ayant un RcT dont l'affinité ou l'avidité pour les molécules du CMH associées à un peptide du soi est trop forte (Murphy *et al.*, 1990). Ceci permet d'éliminer les cellules T potentiellement dangereuses, car susceptibles d'induire des réactions auto-immunes après leur émergence du thymus. La sélection négative permet de créer un répertoire de cellules T pouvant reconnaître le non-soi et initier une réponse immunitaire en périphérie. La délétion clonale lors de la sélection négative a été étudiée grâce aux

SAg. Kappler *et al.*, (1988) ont démontré que l'expression des SAg codés par le virus de la tumeur mammaire de la souris (MMTV) durant la vie foetale, induisait une élimination massive des lymphocytes T porteurs de V β spécifiques d'un SAg.

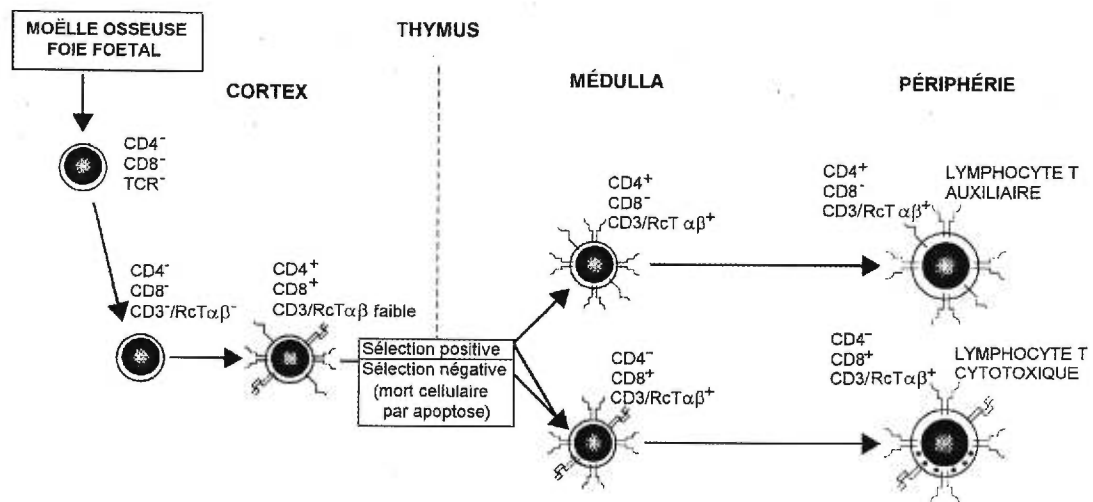


Figure 9. Développement des lymphocytes T dans le thymus. Les prothymocytes ($CD4^+CD8^-CD3/RcT^-$) provenant de la moelle osseuse sont soumis à une sélection positive et négative dans le thymus. Les thymocytes se différencient en cellules doubles positives ($CD4^+CD8^+CD3/RcT^-$) avant d'acquérir l'expression du complexe CD3/RCT. Les thymocytes dont le RcT a une certaine affinité pour les molécules du soi sont sélectionnés positivement et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Les thymocytes qui auront une forte affinité pour les molécules du soi sont éliminés. Les cellules sélectionnées positivement par les molécules de classe I du CMH sont $CD4^+CD8^+CD3/RcT^{élevé}$ et les cellules sélectionnées positivement par les molécules de classe II du CMH sont $CD4^+CD8^-CD3/RcT^{élevé}$ (schéma modifié de Abbas *et al.*, 1994c).

3.2 Le répertoire des cellules T humaines

La grande diversité des lymphocytes, déterminée par le réarrangement de plusieurs gènes, est responsable de la spécificité d'un récepteur T pour un Ag donné. L'ensemble des RcT exprimés par les cellules T matures d'un individu se nomme *répertoire*. Le répertoire des cellules T est créé par la sélection thymique et dépend des molécules du CMH d'un individu. Des individus qui partagent les mêmes allèles du CMH auront des répertoires plus similaires que des individus qui ne partagent aucun allèle du CMH (Gulwani-Akolkar *et al.*, 1991). Cependant l'étude du répertoire V β des lymphocytes T se complique par la grande hétérogénéité de la population humaine. Par contre, il est possible de contourner la difficulté en étudiant le RcT chez des individus possédant les mêmes allèles au niveau du locus CMH : les jumeaux monozygotes. Les RcT des répertoires V α et V β exprimés par les cellules CD4 et CD8 sont comparables chez les jumeaux monozygotes, contrairement à des frères et soeurs possédant des haplotypes identiques au niveau de leur CMH (Malhotra *et al.*, 1992; Hawes *et al.*, 1993; Akolkar *et al.*, 1993; Ciurli *et al.*, soumis, b). Le répertoire des cellules T humaines peut être influencé par des déterminants génétiques ou des facteurs environnementaux, mais le répertoire macroscopique demeure stable tout le temps (Malhotra *et al.*, 1992; Ciurli *et al.*, soumis, b).

Les méthodes utilisées pour analyser le répertoire des cellules T se divisent en deux groupes : la cytofluorométrie en flux qui utilise des Acs monoclonaux spécifiques pour les segments de V α et de V β ou des techniques moléculaires qui permettent de quantifier les niveaux d'ARNm du RcT. Ces deux groupes de techniques sont différents, mais complémentaires. Plusieurs Ac monoclonaux pour les segments V β ont été générés et ces derniers couvrent environ 65 % du répertoire V β total (Posnett *et al.*, 1996). Par contre, pour les segments V α seulement des Ac dirigés contre V α 2.3, V α 12, V α 23 ont été générés. Les Ac monoclonaux spécifiques aux segments V α sont plus difficiles à produire peut-être parce que la V α est beaucoup moins exposée que la V β dans le complexe RcT/CD3 (Moss et Bell, 1995). Les techniques

moléculaires se divisent, soit en protection à la RNase, soit en techniques de PCR semi-quantitatif, qui utilisent un ensemble d'oligonucléotides spécifiques pour tous les membres du répertoire V β (Choi *et al.*, 1989; Genevée *et al.*, 1992; Panzara *et al.*, 1992; Labrecque *et al.*, 1993; Soudeyns *et al.*, 1993, Rebai *et al.*, 1994; Ciurli *et al.*, soumis, b), et finalement en une technique automatique nommée immunoscope (Pannetier *et al.*, 1993, 1995). L'analyse par cytofluorométrie est une technique reproductible et directe; par contre, elle ne permet pas une analyse complète du répertoire V β puisque tous les Acs monoclonaux ne sont pas disponibles (Posnett *et al.*, 1996). D'autre part, le PCR semi-quantitatif représente une analyse plus détaillée du répertoire puisqu'il existe des oligonucléotides bien caractérisés qui couvrent tout le répertoire V β . Il faut toutefois tenir compte de plusieurs paramètres, comme la spécificité de l'amplification, la cinétique et la linéarité. Néanmoins, quand ces techniques sont jumelées au séquençage du RcT, l'expansion des populations oligoclonales de cellules T devient plus évidente.

La chaîne V β du RcT joue un rôle critique dans la reconnaissance des SAg bactériens et viraux (Pullen *et al.*, 1990; Pullen *et al.*, 1991). Ces techniques de cytofluorométrie et de PCR ont été utilisées pour mettre en évidence la présence des SAg chez les souris infectées par différentes souches de MMTV ou bien des MMTV intégrés dans leur génome puisque ces dernières montraient des lacunes dans leur répertoire V β des cellules T. Dans les prochaines sections de cette thèse, l'analyse de la chaîne β du RcT par des techniques moléculaires et cellulaires permettra de mieux comprendre l'effet d'une réponse antivirale *in vivo* en l'occurrence le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et l'effet d'une réponse superantigénique MMTV *in vitro* sur le répertoire V β des cellules T.

4.0 LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

En périphérie, le lymphocyte T mature est confronté à deux types de situations. La CPAg présente soit un Ag étranger (non-soi), soit un autoantigène (soi). Le lymphocyte T choisira de développer une réponse immunitaire si l'antigène étranger représente un danger pour l'intégrité de l'hôte ou bien de ne pas répondre à l'antigène si la réponse peut mettre en péril l'intégrité. Il ne répondra pas à l'antigène soit par un mécanisme de tolérance périphérique ou en ignorant l'autoantigène.

4.1 La réponse immunitaire périphérique

L'activation d'un lymphocyte par un antigène étranger fait appel à une interaction entre plusieurs molécules présentes sur la CPAg et sur la cellule T. On divise ces molécules en trois familles : premièrement, les molécules impliquées dans la reconnaissance spécifique de l'Ag c'est-à-dire les molécules du CMH, le complexe R_cT/CD3, les co-récepteurs CD4 et CD8. Deuxièmement, les molécules impliquées dans l'adhésion entre la CPAg et le lymphocyte T comme LFA-3/CD2, ICAM-1/LFA-1, VCAM/VLA-4 respectivement. Et finalement, les molécules de co-stimulation qui fournissent les signaux nécessaires pour une activation complète du lymphocyte T (Guinan *et al.*, 1994).

Le lymphocyte T a besoin de recevoir au moins deux signaux afin d'être activé et de pouvoir effectuer ses fonctions. Le premier signal menant à l'activation cellulaire est fourni par le complexe R_cT/CD3 lors de la reconnaissance spécifique d'un Ag présenté par la molécule du CMH (Kupfer et Singer, 1989). Lors de cette réponse antigénique, plusieurs molécules accessoires exprimées sur le lymphocyte T et leurs ligands exprimés sur les CPAg interagissent. L'interaction des molécules CD28 et/ou CTLA4 exprimées par les cellules T avec leur ligand B7 (CD80) exprimé en surface des CPAg professionnelles activées, induit un second signal essentiel à la réponse antigénique et à la sécrétion de l'interleukine-2 (IL-2) par le lymphocyte (Linsley *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1992). Une seconde molécule B7-2 (CD86) qui partage

une homologie avec la molécule B7 (CD80) et qui interagit avec CD28 et/ou CTLA4 a été décrite (Freeman *et al.*, 1993; Hatchcock *et al.*, 1995). Les lymphocytes activés ne requièrent pas le second signal fournit par l'interaction CD28-B7. La reconnaissance de l'antigène par un lymphocyte T activé en absence de ce co-signal, induit une paralysie fonctionnelle ou anergie du lymphocyte T.

Une fois que le lymphocyte T est activé par ces deux signaux, il commencera à sécréter diverses cytokines incluant l'IL-2, -3, -4, -5, -6, -10 et -13, le TNF- α et l'INF- γ . À partir du patron de sécrétion des cytokines et des marqueurs de surface, les cellules T sont classifiées en plusieurs catégories. Il y a le lymphocyte T naïf ou mémoire. Le lymphocyte T naïf n'a jamais été activé par un Ag et sera de phénotype CD45RA⁺ L-sélectine^{hi} et intégrine^{lo}. Le lymphocyte T mémoire a déjà été activé par son Ag et sera de phénotype CD45RO⁺ L-sélectine^{lo} et intégrine^{hi} (Sanders *et al.*, 1988). Lors de son activation le lymphocyte T naïf sécrétera de hauts niveaux d'IL-2 mais peu ou pas des autres cytokines (Constant *et al.*, 1994). Par contre, le lymphocyte T mémoire réactivé produira plusieurs cytokines (IL-3, -4, -5, -6, etc.) accompagné ou non d'IL-2 (Sanders *et al.*, 1988).

Le lymphocytes Th (CD4) activés sécrètent plusieurs lymphokines. Selon le patron de sécrétion, ces lymphocytes se divisent en deux sous-populations distinctes appelées Th1 et Th2. Les Th1 sécrètent de l'IL-2, l'INF- γ , le TNF- α et interviennent lors de la réponse à médiation cellulaire. La production de cytokines par les Th1 permet aux cellules T CD8 de proliférer et de se différencier. Les Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 et permettent d'amplifier la production d'anticorps par les lymphocytes B (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann et Coffman, 1989).

4.2 La réponse immunitaire antivirale

Presque toutes les cellules expriment les molécules du CMH-classe I et sont donc soumises à la surveillance immunologique effectuée par les lymphocytes T

cytotoxiques (CTL). Les CTL possèdent toute une machinerie leur permettant de détruire une cible vivante. À leur sortie du thymus, les pré-CTL expriment le RcT $\alpha\beta$ fonctionnel et sont capables de reconnaître l'Ag présenté par les molécules du CMH-classe I mais ne peuvent lyser les cellules infectées. Afin de se différencier en CTL fonctionnels les CD8 pré-CTL requièrent deux signaux : la reconnaissance d'un Ag associé aux molécules du CMH-classe I et les cytokines telles l'IL-2, l'INF- γ , et plusieurs autres produites par les cellules Th1. À ce moment, les CTL se différencient et lysent les cellules infectées (Abbas *et al.*, 1994d). Il existe deux mécanismes majeurs et indépendants de cytotoxicité par les cellules T : l'engagement du RcT par des Ag du CMH à la surface de la cellule cible induit à la fois, l'exocytose granulaire et l'expression du ligand Fas. Lorsque les CTL rencontrent une cellule cible, des granules contenus dans la cellule CTL libèrent à l'interface entre le CTL et la cible une molécule, appelée perforine et des sérine estérases appelées granzymes pouvant introduire des pores dans la membrane et déclencher des cascades apoptotiques dans la cellule cible respectivement (Heusel *et al.*, 1994). Certains ligands peuvent se lier à leurs récepteurs à la surface d'une cellule et induire la transduction d'un signal de mort. Le mécanisme dépendant de Fas implique, à la surface de la cellule cible, Fas pour la transduction d'un signal de mort cellulaire ou apoptose et des molécules du CMH pour assurer la reconnaissance spécifique. Symétriquement, à la surface des CTL activées, sont impliqués le RcT et le ligand de Fas (Lowin *et al.*, 1994). Les CTL peuvent également sécréter des cytokines comme l'INF- γ et le TNF- α , qui sont cytotoxiques (revue par Kägi *et al.*, 1996).

Cette thèse porte sur les perturbations du répertoire des cellules T humaines suite à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Décrivons brièvement l'immunopathogénèse d'une infection à VIH.

Le virus VIH est un membre de la famille des *Retroviridae*, plus spécifiquement de la sous-famille des *Lentivirinae*. Chez les lentivirus, le génome viral persiste sous forme de provirus en s'intégrant au génome cellulaire. Les séquences nucléotidiques de différents isolats du virus établissent clairement qu'il s'agit d'un rétrovirus avec ses séquences LTR (long terminal repeats) aux deux extrémités du génome et ses trois gènes principaux: *gag*, *pol* et *env*, lesquels codent pour les protéines de la capsid, les différentes enzymes dont l'ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse) et les glycoprotéines de l'enveloppe respectivement (Ratner *et al.*, 1985). En plus de ces trois gènes classiques, le génome du VIH renferme six autres gènes (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu* et *vpr*) ayant une fonction de régulation. Seuls *tat* et *rev* sont essentiels à la réplication du VIH (Dayton *et al.*, 1986).

L'infection au VIH se traduit par une déplétion continue des cellules T CD4⁺ grâce à une interaction entre la glycoprotéine gp 120 de l'enveloppe du virion et la molécule CD4 exprimée à la surface de la cellule cible (Dalglish *et al.*, 1984). Cette déplétion des cellules CD4 dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes finit par engendrer chez le patient un état d'immunodéficience appelé SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) dont les conséquences sont mortelles. Les premiers jours suivant une infection primaire au VIH, le système immunitaire se mobilise et entraîne des perturbations du compartiment lymphocytaire. Cette infection primaire est caractérisée par la chute drastique du nombre de lymphocytes CD4 ainsi qu'une augmentation significative du nombre de lymphocytes CD8. Alors que la réponse humorale prend plusieurs semaines à s'établir, la réponse cytotoxique, entre en jeu dès les premiers jours après l'infection. La réponse cytotoxique forme la première ligne de défense contre le VIH. Malgré les nombreuses recherches, les mécanismes précis par lesquels le VIH induit la déplétion des CD4 ne sont pas très bien caractérisés. On a proposé plusieurs mécanismes pour expliquer la façon par laquelle le VIH détruit les défenses immunitaires. Le VIH peut être cytopathique pour les cellules T CD4

(Zagury *et al.*, 1986). Le VIH pourrait aussi induire un état d'anergie et l'apoptose chez ces cellules CD4 cibles et même chez les cellules CD4 saines (Banda *et al.*, 1992; Meygaard *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1995). D'autres mécanismes incluent la lyse des cellules CD4 infectées par les cellules CD8 activées, ces dernières sont amplifiées durant l'infection (Watret *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1994) et la présence d'une protéine aux propriétés superantigéniques dans le VIH (Imberti *et al.*, 1991; Dalgleish *et al.*, 1992; Soudeyns *et al.*, 1993; Rebai *et al.*, 1994). Ces deux derniers mécanismes entraînent des changements majeurs dans le répertoire V β des cellules T chez des patients infectés par le VIH. Puisque les SAg sont connus chez la souris, et qu'ils induisent une prolifération des cellules T V β spécifiques *in vitro* et une expansion suivie d'une destruction de ces cellules *in vivo* (Kappler *et al.*, 1988; White *et al.*, 1989) un SAg dans HIV pourrait anergiser ou éliminer un grand nombre de cellules T exprimant des V β spécifiques. Ou encore, une activité cytotoxique dirigée spécifiquement contre les Ag du VIH pourrait induire une expansion des cellules CD8 V β spécifiques et ces CTL lyseraient les cellules CD4 cibles (Pantaleo *et al.*, 1994).

5.0 LES SUPERANTIGÈNES

Le terme superantigène a été utilisé pour la première fois par Kappler et Marrack en 1989, afin de décrire la stimulation massive des lymphocytes T dépendante d'une interaction avec la chaîne V β du RcT (White *et al.*, 1989). Ce phénomène fut rapidement corrélé avec une classe d'antigènes endogènes murins connue sous le nom de Mls (minor lymphocyte stimulating antigen). En 1973, Festenstein décrit pour la première fois, l'existence des Mls chez la souris. Ces produits endogènes provenant de la rate de deux souris identiques au niveau du locus du CMH provoquaient une stimulation massive des lymphocytes T (Festenstein, 1973).

Plusieurs groupes ont montré à l'aide d'études génétiques, la co-ségrégation du locus Mls avec les MMTV (mouse mammary tumor virus) qui sont intégrés dans le

génomique. Le groupe de Marrack a démontré que l'élimination des cellules T $V\beta 14^+$ chez les souris C3H/HeJ ne se produisait que dans les souriceaux allaités par leur mère suggérant que le SAg provenait d'un agent infectieux produit dans le lait. Cet agent infectieux est aussi un rétrovirus MMTV et ces études suggèrent que le rétrovirus MMTV codait pour un SAg (Marrack *et al.*, 1991). Le LTR (long terminal repeat) du rétrovirus MMTV situé en 3' contient une phase de lecture ouverte (*orf*). La transfection du gène *orf* dans des cellules B exprimant les molécules de classe II permet de stimuler les lymphocytes T exprimant la bonne région $V\beta$ du rat (Choi *et al.*, 1991; Woodland *et al.*, 1991; Beutner *et al.*, 1992; Pullen *et al.*, 1992).

5.1 Définition d'un superantigène

Les SAg sont des protéines solubles qui se lient aux molécules de classe II du CMH. Ils stimulent des populations de lymphocytes T qui expriment un segment $V\beta$ spécifique du RcT. Les SAg peuvent stimuler de 5 à 20 % des lymphocytes T contrairement à un antigène conventionnel qui stimule $1/10^5$ à $1/10^6$ des cellules T. Les SAg, d'origine bactérienne ou virale, diffèrent des antigènes conventionnels pour au moins quatre raisons. La présentation des SAg au système immunitaire est la conséquence de leur association aux molécules de classe II du CMH, qui n'implique pas le site de fixation au peptide. La présentation des SAg aux cellules T est dite non restreinte car le polymorphisme des classes II du CMH a peu d'influence sur l'association avec les SAg. Les SAg sont présentés aux lymphocytes T sous leur forme native, sans dégradation préalable en peptides. Par contre, certains SAg viraux nécessitent une protéolyse partielle sans toutefois se lier sous forme de peptides dans la niche des molécules de classe II. Enfin, l'interaction du SAg avec les régions $V\beta$ du RcT résulte de la stimulation des lymphocytes T.

5.2 Les familles de superantigènes

Les SAg peuvent être produits par des agents bactériens ou viraux ou bien ils sont intégrés dans le génome de l'hôte. On peut diviser les SAg en deux grandes classes, soient les SAg bactériens ou viraux. Les SAg viraux endogènes, observés uniquement chez la souris sont représentés par les Mls. Plusieurs molécules bactériennes dotées de propriétés superantigéniques ont été décrites. Les plus étudiées sont les entérotoxines produites par *Staphylococcus aureus*. Différentes souches de *Staphylococcus aureus* produisent des exotoxines dont on connaît plusieurs sérotypes : A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, H et TSST-1. Les SAg viraux exogènes sont représentés par le rétrovirus des tumeurs mammaires de la souris (MMTV) et le virus de la nucléocapside de la rage chez l'homme. On soupçonne la présence de SAg dans des infections virales humaines telles EBV (Sutkowski *et al.*, 1996), CMV (Dobrescu *et al.*, 1995a, 1995b), VIH (Dadaglio *et al.*, 1994; Torres et Jonhson, 1994; Akolkar *et al.*, 1995), virus spuma (Weissenberger *et al.*, 1994) mais elles demeurent encore à l'étude. Récemment, on a identifié un SAg d'origine végétale. C'est une lectine, l'agglutinine qui est produite par la plante *Urtica dioica*, et elle possède les propriétés d'un SAg (Galelli et Truffa-Bachi, 1993).

5.2.1 Les superantigènes exogènes

Les SAg exogènes sont des protéines solubles produites par des bactéries ou des virus. Le SAg du rétrovirus de MMTV, étroitement lié à son cycle viral, est essentiel à la dissémination du virus. Les entérotoxines qui provoquent l'empoisonnement alimentaire causé par *Staphylococcus aureus* sont les plus étudiées.

5.2.1.1 Les superantigènes bactériens : les entérotoxines de *Staphylococcus aureus* : prototype du superantigène

Des colonies de bactéries de la famille de *Staphylococcus aureus* se trouvent habituellement sur la peau. Différentes souches produisent des exotoxines qui se différencient par la présence de plusieurs sérotypes (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, H). Les

entérotoxines de *Staphylococcus aureus* sont responsables de 25 % des empoisonnements alimentaires et des troubles gastro-intestinaux (Bergdoll, 1985). Ces entérotoxines sont de puissants mitogènes pouvant stimuler les lymphocytes T arborant des régions V β spécifiques du RcT à des concentrations de 10^{-9} M (Peavy *et al.*, 1970; Langford *et al.*, 1978; Fleischer et Schrezenmeier, 1988) (tableau 1). Ces protéines, de masse moléculaire de 26 à 30 kDa et constituées d'environ 250 a.a., résistent à toutes les protéases et sont insensibles à la dénaturation puisqu'elles agissent au niveau de l'estomac (Bergdoll, 1985). Les alignements de séquence de *Staphylococcus aureus* montrent une similitude de 50 à 90 % et permettent de diviser ces entérotoxines en deux groupes selon l'homologie de leur séquence d'acides aminés. Le premier groupe inclut SEA, SED, SEE ayant une homologie de 80 %. Le deuxième groupe se compose de SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃. Cependant SEA et SEB ne partagent que 57 % de leur séquence (Fraser et Hudson, 1995). Toutes ces toxines possèdent deux résidus cystéine permettant la formation d'un pont disulfure ayant la forme d'une boucle dans la partie centrale de la séquence. Ce pont disulfure semblerait influencer l'affinité et l'avidité de la toxine pour le RcT (Grossman *et al.*, 1991). D'autres souches de *Staphylococcus aureus* produisent la toxine du choc toxique. L'exotoxine TSST-1 (toxic shock syndrome toxin) de masse moléculaire de 22 kDa ne provoque pas d'effets entérotoxiques, mais elle est associée chez la femme au choc toxique que causent les tampons hygiéniques (Chesney, 1984). Elle diffère beaucoup des autres entérotoxines de *Staphylococcus aureus* puisqu'elle ne partage que 45 % de similitude et ne possède pas de pont disulfure. TSST-1 stimule également certains segments V β du RcT (tableau 1).

D'autres pathogènes humains tels *Streptococcus pyogenes* produit les toxines SPE-A, B et C (Wannamaker et Schlievert, 1988). Ces toxines provoquent également un choc toxique sévère chez l'homme. D'autres micro-organismes produisent des molécules possédant les caractéristiques d'un SAg. La bactérie *Clostridium perfringens* produit une toxine CPET qui est responsable des intoxications

alimentaires. CPET possède très peu d'homologie avec les autres SAg et stimule les V β 6.9 et V β 22 (tableau 1) (Bowness *et al.*, 1992). La bactérie *Mycoplasma arthritidis* peut causer l'arthrite chez les souris et les rats (Atkin *et al.*, 1986; Cole *et al.*, 1989). Cette bactérie excrète dans son surnageant de culture, une protéine soluble nommée MAM. Cette protéine peut induire la prolifération des lymphocytes T à une concentration de 10^{-14} M. MAM stimule les V β 6, 8.1-8.3 chez la souris (Cole *et al.*, 1989) et la V β 17 chez l'homme (Posnett *et al.*, 1993a; Bhardwaj *et al.*, 1994) (tableau 1). La séquence en a.a. montre que MAM est dépourvue des résidus cystéine et qu'elle ne possède aucune homologie avec les autres SAg bactériens (Cole *et al.*, 1996).

Tableau 1. Les superantigènes bactériens et spécificité V β

Toxine	V β humaines ¹	V β murinés ¹
SEA	1.1, 5.3, 6.3, 6.4, 7.3, 7.4, 9.1, 23.1	1, 3, 10, 11, 12, 17
SED	1.1, 5.3, 6.9, 7.4, 8.1	11, 15, 17
SEE	5.1, 6.3, 6.4, 6.9, 8.1	3, 7, 8.3, 11, 17
SEB	3.2, 8.1, 12, 14, 15, 17,20	7, 8.1-3
EC1	3.2, 12	8.2, 8.3, 7, 11
SEC2	12, 13, 14, 15, 17, 20	8.2, 10
SEC3	5, 12	7, 8.2
TSST	2.1, 8.1	15, 16
SPE-A	2, 12, 14, 15	ND
SPE-B	8	ND
SPE-C	1, 2, 5.1, 10	ND
MAM	ND	6, 8.1-3
<i>C. perfringens</i>	6.9,22	ND

¹ Compilés d'après Choi *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1991; Fraser et Hudson, 1995.

ND : non déterminé

5.2.1.2 Les superantigènes viraux

Jusqu'à maintenant le nombre de SAg viraux connus est restreint. Le premier SAg viral identifié fut celui du rétrovirus MMTV. Certains de ces rétrovirus sont d'origine exogène et leur transmission par le lait maternel permet d'infecter une nouvelle génération d'hôtes. Tous les virus MMTV exogènes étudiés jusqu'à maintenant codent pour un SAg dans leur LTR en 3' (Marrack *et al.*, 1991, Acha-

Orbea *et al.*, 1991; Acha-Orbea *et al.*, 1993) et possèdent les mêmes caractéristiques que les rétrovirus MMTV intégrés dans le génome de la souris.

Chez l'homme, le seul et unique SAg viral décrit est celui de la nucléocapside du virus de la rage. Herzog *et al.*, (1992) ont montré que la nucléocapside du virus était capable de stimuler *in vitro* les lymphocytes T d'individus vaccinés ou non et que cette activation ressemblait beaucoup à une stimulation superantigénique. Le virus de la rage se compose d'un brin d'ARN négatif codant pour trois protéines : N, NS et L. La protéine N de la nucléocapside du virus de la rage possède l'activité superantigénique, car cette protéine purifiée ou recombinante se lie aux molécules de classe II du CMH et stimule la région V β 8 du RcT (Lafon *et al.*, 1992). Tout comme les autres SAg, la nucléocapside ne requiert pas une dégradation en fragments peptidiques et n'est pas restreinte par les molécules du CMH par contre, l'isotype DQ lie plus efficacement le SAg. En 1993, Lafon *et al.*, confirment les propriétés superantigéniques de la nucléocapside du virus de la rage en l'injectant à des souris. Suite à l'injection, ils observent une prolifération sélective des lymphocytes T V β 6⁺ et V β 7⁺.

La présence de SAg dans d'autres infections virales est soupçonnée. Dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), il a été proposé que la disparition des cellules T CD4⁺ périphériques chez des patients infectés serait causée par un SAg codé par le virus (Imberti *et al.*, 1991). Le génome du VIH contient un gène, *nef*, qui comme le SAg de MMTV est codé dans le LTR 3'. Jusqu'à maintenant, le rôle de *nef* dans le cycle viral du VIH-1 demeure incertain mais le gène *nef* semble être impliqué dans la diminution de l'expression de la molécule CD4 (Trono *et al.*, 1995). Une étude plus récente propose que le virus CMV retrouvé chez un grand nombre de patients infectés par le VIH code pour un SAg. Chez les patients infectés par le CMV, le SAg viral pourrait jouer un rôle dans la survie des cellules T V β 12 CD4⁺ qui serviraient de réservoir pour le VIH (Dobrescu *et al.*, 1995b). La protéine

bel-3 présente dans le spuma virus agirait aussi comme un SAg (Weissenberger *et al.*, 1994). Il semblerait également qu'il y aurait un SAg associé au virus EBV, puisqu'on a montré que les cellules V β 13⁺ sont préférentiellement stimulées (Sutkowski *et al.*, 1996).

5.2.2 Les superantigènes endogènes

Le locus Mls code pour les SAg endogènes chez la souris (Abe *et al.*, 1987; Abe et Hoodes, 1988; Blackman *et al.*, 1992; Acha-Orbea *et al.*, 1993). Une intégration de ces séquences virales dans le génome de l'hôte permet une transmission verticale du SAg. Les produits Mls sont codés par des provirus de MMTV et plusieurs groupes ont montré à l'aide d'études génétiques, une co-ségrégation du locus Mls avec les MMTV (Dyson *et al.*, 1991; Frankel *et al.*, 1991).

Les SAg endogènes viraux de MMTV sont exprimés et présentés par les lymphocytes B (Mazda *et al.*, 1991; Mohan *et al.*, 1993; Acha-Orbea, 1995). Les cellules dendritiques et les macrophages ne présentent pas très bien les SAg de MMTV et induisent l'anergie des cellules T V β réactives et non leur élimination (Molina *et al.*, 1989; Webb *et al.*, 1989; Inaba *et al.*, 1991; Acha-Orbea, 1995). Environ 50 *Mtv* endogènes ont été identifiés chez la souris. Les SAg endogènes viraux provoquent une modification importante du répertoire T de la souris. L'expression des *Mtv* non infectieux se produit dans le thymus lors de la sélection négative. L'expression des SAg provoque alors la délétion clonale des thymocytes réactifs (Tomonari *et al.*, 1993). Par exemple, une souris exprimant *Mtv-7* (Mls-1^a ou vSAG7) éliminera les cellules T exprimant V β s 6, 7, 8.1 et 9 (tableau 2) (Kappler *et al.*, 1988; MacDonald *et al.*, 1988). Chaque souche de souris exprime différents locus Mls auxquels correspond un patron de délétions V β s spécifiques (Salmons et Gunzburg, 1987).

Tableau 2. Les superantigènes viraux de MMTV et spécificité V β

SAg MMTV	Autre nom	V β murines
1	Mls-4, Mls ^c	3, 5
2		14
3		3, 5, 17
6	Mls-4, Mls ^c	3, 5
7	Mls-1, Mls ^a	6, 7, 8.1, 9
8	Dvb11.1	5, 11, 17
9	Etc-1, Dvb11.2	5, 11
11	Dvb11.3	5, 11
13	Mls-2, Mls ^c	3, 5
27		3, 5
43		6, 7, 9
44		3, 5, 8.1, 9
SW	Virus exogène	6, 7, 8.1
C3H, GR	Virus exogène	14

Compilé d'après MacDonald *et al.*, 1988, Pullen *et al.*, 1990, 1991, 1992, Acha-Orbea *et al.*, 1993

5.2.2.1 La structure du virus MMTV

MMTV est un rétrovirus de type B qui contient 8,5 kilobases d'ARN génomique. Durant la transcription réverse, les deux LTR se forment aux extrémités 5' et 3' du provirus. Cette molécule co-linéaire s'intègre au génome de l'hôte. Entre les deux LTR, le génome de MMTV code pour les protéines des gènes rétroviraux: *gag*, *pol* et *env* (Acha-Orbea et MacDonald, 1995). Le LTR en 3' du génome contient une phase de lecture ouverte (*orf*) codant pour une protéine de 320 a.a. soit le gène *sag* de MMTV (Choi *et al.*, 1992; Korman *et al.*, 1992). Pour la plupart des rétrovirus, incluant MMTV, le LTR contient le site d'initiation pour la transcription. Récemment, on a décrit un deuxième promoteur (^{MMTV}P2) qu'on croit responsable de l'expression du SAg dans les cellules B (Günzburg *et al.*, 1993). On connaît la séquence nucléotidique du SAg de MMTV ainsi que sa structure protéique. C'est une glycoprotéine membranaire de type II ayant une seule région hydrophobe interne agissant à la fois comme peptide signal et région transmembranaire, une région variable C-terminale extracellulaire de 30 a.a. tandis que la région N-terminale se trouve dans le cytoplasme. La séquence des différents *Mtv* est en grande partie conservée à l'exception de ces 30 a.a. en position C-terminale. Ces résidus sont importants puisqu'ils participent directement à l'interaction avec le RcT. De plus, les

SAg possédant la même spécificité V β sont très homologues dans cette région (Choi *et al.*, 1992). Cette protéine de type II contient 5 sites potentiels de N-glycosylation et 6 à 7 résidus cystéine. La séquence en a.a. révèle également la présence de divers motifs d'a.a. basiques. Ces motifs représentent des séquences de reconnaissance pour des endoprotéases. Ces dernières, nommées protéines convertases (PC), pourraient intervenir dans la transformation protéolytique de plusieurs glycoprotéines incluant la protéine *env* de MMTV (Stieneke-Gröber *et al.*, 1992).

La faible expression du SAg viral à la surface membranaire des cellules a quelque peu compliqué la caractérisation biochimique de cette protéine. À l'aide des anticorps monoclonaux, on a pu prouver que la protéine codée par *orf* était bien le SAg. On a détecté l'expression de *orf* à la surface des cellules B infectées par *Mtv-7* (Winslow *et al.*, 1992). Ces anticorps monoclonaux ont aussi inhibé *in vitro* une stimulation des lymphocytes T par des cellules de rate de souris Mls-1^a (*Mtv-7*) (Acha-Orbea *et al.*, 1992; Winslow *et al.*, 1992). L'injection de ces anticorps, *in vivo* chez la souris exprimant le SAg *Mtv-7* empêche l'élimination des lymphocytes T exprimant les régions V β du RcT appropriées (Acha-Orbea *et al.*, 1992).

La synthèse du gène *orf* donne lieu à un précurseur de 45 kDa. Les molécules de classe II du CMH sont essentielles pour la stimulation des lymphocytes T par les *Mtv*. La molécule de 45 kDa est clivée en une protéine active de 18,5 kDa qui elle aussi est associée aux molécules de classe II à la surface cellulaire (Winslow *et al.*, 1992). Récemment, Mottershead *et al.*, (1995) montrent une liaison directe de ce fragment de 18,5 kDa à des molécules de classe II solubles DR1 et DR4. Ce fragment résulte probablement d'une protéolyse au niveau des motifs RARR et RKRR (Park *et al.*, 1995). Ces motifs sont situés dans la région extracellulaire du SAg et représentent des sites de coupure pour une enzyme de la famille des furines (Park *et al.*, 1995).

5.2.2.2 La cycle de vie du virus MMTV

Le virus MMTV est surtout produit dans la glande mammaire, et des hormones telles la progestérone et la prolactine qui agissent sur le LTR en 5' de MMTV régulent son expression (Günzberg et Salmons, 1992). La majorité des lignées de cellules B et les cellules B normales expriment le MMTV cependant son expression est indépendante des hormones mais peut être augmentée par la stimulation des lymphocytes B par les lipopolysaccharides ou des cytokines comme l'IL-4 (Corley *et al.*, 1992).

Le cycle viral du rétrovirus MMTV débute par la transmission du virus du lait maternel au souriceau via l'intestin et nécessite la persistance du virus jusqu'au développement de la glande mammaire (Heston *et al.*, 1945). Le virus MMTV ne code pas pour son propre oncogène mais induit des tumeurs mammaires en s'intégrant dans le génome à proximité des proto-oncogènes *int* (Nusse, 1988). L'induction des tumeurs mammaires ne représente pas une étape importante dans le cycle viral. La persistance du virus semble nécessiter le fonctionnement adéquat du système immunitaire car des souris *nu/nu*, dépourvues de thymus et n'ayant pas de cellules T, ne sont pas exposées au développement des tumeurs induites par MMTV. Par contre, ces souris développent des tumeurs quand on leur injecte des cellules T de souris infectées (Tsubura *et al.*, 1988). Ces expériences suggèrent que les lymphocytes T servent de réservoir pour le virus MMTV jusqu'à ce que la glande mammaire se développe.

Plusieurs équipes ont étudié le rôle possible du SAg de MMTV dans le cycle viral et la transmission du virus. Des souris transgéniques pour le SAg exogène du virus MMTV (C3H) résistent à la transmission du virus par le lait maternel. Chez ces souris la résistance est corrélée avec l'élimination des lymphocytes T $CD4^+V\beta 14^+$ capables de reconnaître le SAg de MMTV C3H (Golovkina *et al.*, 1992). Ces expériences montrent que la réponse des cellules T aux SAg est nécessaire à l'infection des cellules B et à la dissémination du virus. Ces résultats ont été confirmés par des

études sur la transmission du virus exogène MMTV (SW) (Held *et al.*, 1992). Ce virus code pour un SAg ayant la même spécificité envers les régions V β du RcT que la SAg de *Mtv-7* intégré dans le génome des souris. Initialement, cette équipe a montré que lorsque le rétrovirus est injecté chez la souris dans le coussinet de la patte, il y avait une stimulation locale des lymphocytes T et B et que les lymphocytes B étaient infectés par MMTV (SW) (Held *et al.*, 1993a). Held *et al.*, (1993b) ont analysé la transmission de MMTV (SW) chez des souris Mls-1^a qui avaient éliminé les cellules T capables de reconnaître MMTV (SW) ou Mls-1^a. Ces souris ne pouvaient pas être infectées par MMTV (SW) et étaient incapables de transmettre le virus par le lait à des souriceaux. Leurs résultats suggèrent que la présence des cellules T réactives au SAg du virus est nécessaire pour la transmission de MMTV. De plus, des souris transgéniques exprimant le RcT V β 8.2 ne peuvent pas être infectées par MMTV (SW) car elles ne possèdent pas les cellules T réactives au SAg.

L'équipe de Pucillo *et al.*, (1993) a montré que l'expression de la molécule de classe II qui présente le SAg MMTV (C3H) est nécessaire pour la production de particules virales dans le lait. Ils ont comparé la production des particules virales et la présence d'ARN du virus dans la glande mammaire chez des souris transgéniques pour la molécules I-E et des souris n'exprimant pas I-E. L'expression de MMTV ne fut observée que dans les souris arborant I-E impliquant la présence du SAg dans le cycle viral. Chez ces souris la présence de MMTV (C3H) par I-E provoquent l'élimination des lymphocytes T V β 14⁺. Deux façons pour les souris de se protéger contre une infection à MMTV est d'exprimer le provirus *Mtv* amenant la disparition des cellules T réactives au SAg ou bien de ne pas exprimer la molécule de classe II à la surface de la cellule (Pucillo *et al.*, 1993).

Les cellules B présentes dans les plaques de Peyer de l'intestin sont les premières cellules à être infectées lorsque le souriceau boit le lait venant d'une mère infectée par MMTV. Des souris dépourvues de cellules B ne sont pas capables d'être infectées par MMTV et les cellules T réactives au SAg ne sont pas éliminées (Beutner *et al.*, 1994). De plus, des souris ayant une délétion pour le gène CD40 ligand (CD40L) présent sur les cellules T activées ne peuvent être infectées par MMTV. Le CD40L des cellules T agit sur le CD40 présent à la surface des cellules B afin d'augmenter le signal fourni par l'interaction CD28-B7. Chez les souris CD40L^{-/-}, il y a absence d'induction de B7-2 sur les cellules B et le SAg ne peut pas être présenté (Chervonsky *et al.*, 1995).

La première étape du cycle viral est l'infection des cellules B dans les plaques de Peyer de l'intestin des souris allaitées. L'infection permet la transcription du gène qui code pour le SAg et la synthèse du SAg par les lymphocytes B. Le SAg et les molécules de classe II des cellules B stimulent les cellules T réactives au SAg (exprimant les bonnes régions V β du R α T). La stimulation des lymphocytes T permet la production des lymphokines et active les lymphocytes B. Cette interaction permet l'expansion des cellules B amplifiant ainsi le nombre de lymphocytes B infectés. Le virus peut également être transféré à d'autres cellules T CD4 ou CD8. La transmission du MMTV à une autre génération de souris par le lait maternel nécessite l'infection de la glande mammaire. Alors, le cycle viral recommence. Les cellules T semblent être impliquées dans le transport du virus MMTV à la glande mammaire (figure 10).

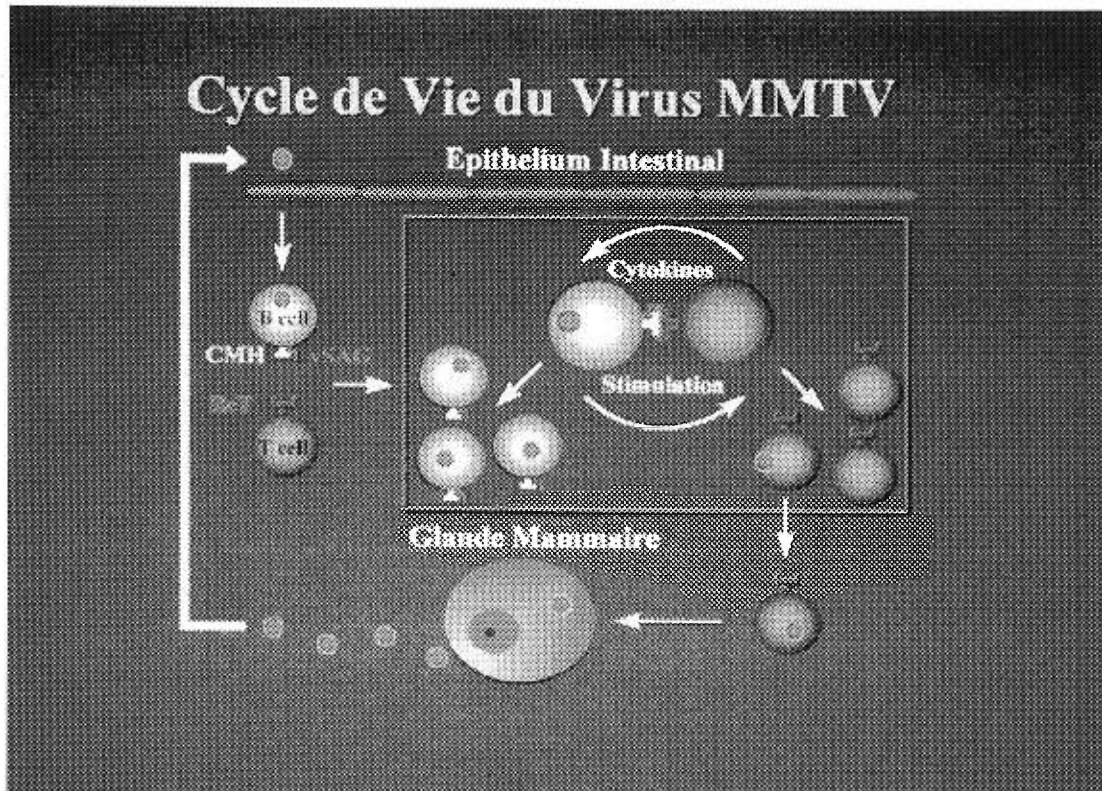


Figure 10. Le cycle de vie du virus MMTV.

5.3 La réponse immunitaire envers les superantigènes

Initialement, la stimulation d'un grand nombre de cellules T par plusieurs SAg suggérait que ces molécules agissaient comme des mitogènes des cellules T. Les mitogènes tels la concanavaline A et la phytohémagglutinine (PHA) stimulent les cellules T de façon non spécifique. Il existe deux différences importantes entre les SAg et les mitogènes des cellules T. La stimulation par un mitogène est indépendante des régions V β du RcT; par contre les SAg stimulent les cellules T exprimant certaines régions V β du RcT. De plus, une stimulation induite par le mitogène ne nécessite pas la présence des molécules de classe II. La réponse des cellules T suite à une stimulation superantigénique requiert la présence des molécules de classe II sur la CPAg ainsi que la reconnaissance des régions variables du RcT.

5.3.1 Le récepteur cellulaire des superantigènes

Plusieurs équipes ont montré que les molécules de classe II sont les récepteurs des SAg bactériens. La liaison de SEA marqué à la fluoroscéine sur les cellules B Raji ou sur les fibroblastes transfectés avec les chaînes α et β des molécules de classe II DR, DP, DQ permet d'induire une prolifération des lymphocytes T (Mollick *et al.*, 1989). La co-immunoprécipitation des molécules de classe II avec SEA et l'inhibition de la liaison de SEA aux molécules de classe II à l'aide d'anticorps anticlasse II montrent clairement que les SAg bactériens se lient spécifiquement aux molécules de classe II (Fisher *et al.*, 1989).

La capacité de différents allèles et isotypes de classe II à présenter les SAg bactériens suggère que le polymorphisme des classes II n'affecte pas la présentation des SAg aux lymphocytes T (Mollick *et al.*, 1989; Mollick *et al.*, 1991). Par contre, certains allèles sont incapables de présenter un SAg tandis que d'autres allèles se lient plus efficacement avec ce SAg (Mollick *et al.*, 1989; Herman *et al.*, 1990). Plusieurs groupes ont étudié la présentation de *Staphylococcus aureus* par différents isotypes de classe II humains et murins. En général, les toxines ont une plus grande affinité pour

les molécules de classe II humaines que pour les molécules de classe II murines. La molécule de classe II HLA-DR lie les SAg bactériens avec une plus grande affinité que DQ et DP et la molécule de classe II murine I-E lie plus facilement les SAg comparativement à I-A. Certaines exceptions ont été notées; on n'a observé aucune liaison du SAg TSST-1 sur les molécules de classe II DP, I-E et I-A^k (Mollick *et al.*, 1991; Scholl *et al.*, 1990). SEC₂ lie plus facilement DQ que DR (Herrmann *et al.*, 1989). La majorité des allèles de DR sont capables de lier et de présenter SEA sauf la molécule de classe II DRw53. Cette absence de liaison de SEA sur DRw53 est probablement due au polymorphisme allélique de la chaîne β de DR puisque la chaîne α est monomorphe (Herman *et al.*, 1990). SEB est présenté plus efficacement par la molécule de classe II murine I-E que I-A (White *et al.*, 1989).

La liaison des SAg aux molécules de classe II est peut s'avérer nécessaire pour permettre une interaction entre le RcT et la molécule de classe II. La liaison des SAg aux molécules de classe II n'implique pas un rôle pour la molécule CD4 car celle-ci n'est pas essentielle pour la présentation des lymphocytes aux SAg (Webb et Sprent, 1990).

Pour les SAg de MMTV, la co-expression du SAg et des molécules de classe II dans des CPAg est nécessaire pour stimuler des lymphocytes T. L'inhibition de cette stimulation par des anticorps dirigés contre les molécules de classe II, suggère qu'une interaction existe (Peck *et al.*, 1977). Récemment, la liaison du fragment de 18,5 kDa du gène *orf* à des molécules de classe II solubles a été citée (Mottershead *et al.*, 1995). La présence d'une hiérarchie observée *in vivo* et *in vitro* des différentes molécules de classe II à présenter les SAg MMTV montre l'existence d'une interaction (I-E>I-A^k>I-A^a>I-A^b>>>I-A^q) (Kappler *et al.*, 1988; Pullen *et al.*, 1988). L'allèle de classe II murin I-A^q ne présente pas *Mtv-7* aux lymphocytes T puisque aucune Vβ réactive n'a été supprimée chez les souris DBA/1 (MacDonald *et al.*, 1989). Des études de souris transgéniques ont clairement montré que les classes II interagissaient

avec les SAg viraux. Plusieurs résultats suggèrent que les chaînes α et β des classe II peuvent présenter le SAg viral. Des souris transgéniques exprimant la molécule de classe II mixte $E\alpha A\beta$ rétablissent partiellement l'élimination des cellules T réagissant à MIs-1^a. Puisque l'allèle A^b ($A\alpha\beta$) ne présente pas bien le SAg viral MIs-1^a, la contribution de la chaîne α dans la paire mixte est évidente (Anderson et David, 1989). Des souris I- $E\alpha\beta$ font disparaître les $V\beta$ 5.1, 5.2, 11, 17 et les souris transgéniques pour le dimère $DR\alpha/E\beta$ éliminent également les cellules T $V\beta 11^+$ (il existe 75 % d'homologie entre $E\alpha$ et $DR\alpha$). Dans une étude menée par Zhou *et al.* (1991), des souris I-E négatives mais transgéniques pour HLA-DQ β éliminent les $V\beta$ 5.1, 5.2, 11. Les gènes D β sont homologues à I-A qui ne suppriment pas ces $V\beta$. Ceci s'explique par le fait que la chaîne DQ β possède le même épitope critique que $E\alpha$ pour l'élimination des cellules T $V\beta$ spécifiques. De plus, lorsque des fibroblastes murins sont co-transfectés avec HLA-DR1 et un SAg viral, ces cellules peuvent stimuler des cellules T exprimant des $V\beta$ spécifiques (Subramanyam *et al.*, 1993; Labrecque *et al.*, 1993; Ciurli *et al.*, soumis, a). Toutefois, des transfectants utilisant d'autres allèles tels DR2A, DR2B et DRw53 ne stimulent pas les cellules T (Subramanyam *et al.*, 1993). Puisque que tous les allèles de DR ont une même chaîne α , ces résultats suggèrent un rôle critique pour la chaîne β . Récemment, on a noté que d'autres cofacteurs peuvent jouer un rôle dans cette interaction. Par exemple, la glycoprotéine gp52 de l'enveloppe de MMTV semble jouer un rôle de co-ligand dans la présentation du SAg (Golovkina *et al.*, 1994). Ces résultats, nous laissent croire que les interactions sont complexes et que les deux chaînes de la molécule de classe II contribuent à l'interaction avec le SAg viral (revue par Lavoie *et al.*, 1997).

5.3.2 Le rôle des molécules CD4 et CD8

Les SAg exogènes et endogènes présentés par les molécules de classe II stimulent *in vitro* et *in vivo* les lymphocytes T CD4 et CD8 (Webb et Sprent, 1990). La reconnaissance des SAg par le RcT est attribuable à une assez grande affinité et ne

nécessite pas l'interaction des molécules CD4 et CD8. Par contre, lorsque l'affinité du RcT pour un complexe SAg-MHC est faible, une stabilisation par une interaction CD4-molécules de classe II est requise. De plus, dans certains cas la transfection du gène codant pour la molécule CD4 dans des hybridomes T CD4 négatifs augmente la réponse aux SAg (Sékaly *et al.*, 1991). La réponse *in vitro* aux SAg de MMTV est souvent dominée par les lymphocytes T CD4⁺ et peut être inhibée par des anticorps anti-CD4 (revue par Janeway, 1991) mais une réponse par les cellules CD8 est aussi possible (Webb et Sprent, 1990; Labrecque *et al.*, 1993). Dans la reconnaissance des SAg de MMTV, la suppression a lieu au stade double positif (CD4⁺CD8⁺) et le rôle de la molécule CD4 dans cette destruction est controversé. Des expériences utilisant des anticorps anti-CD4 visent à bloquer la réponse CD4, mais il n'y a pas de suppression des molécules CD8 exprimant des régions V β particulières ce qui suggère un rôle critique des CD4 dans le processus d'élimination (Fowlkes *et al.*, 1988). Au contraire, des souris dépourvues de CD4 ont permis de montrer que l'expression des CD4 est essentielle seulement lorsque l'affinité du SAg pour le RcT est faible (Wallace *et al.*, 1992). L'injection de MMTV ou une infection par un virus exogène de MMTV provoquent l'élimination des V β spécifiques et une anergie préférentiellement dans la population de cellules CD4 positives (Webb et Sprent, 1990).

5.3.3 Les effets des superantigènes *in vivo*

L'entérotoxine SEB a été utilisée afin d'étudier *in vivo* la réponse immunitaire envers les SAg. L'injection de SEB *in vivo* chez des souris nouveau-nées provoque la suppression des cellules T V β 8⁺ (White *et al.*, 1989). Cette élimination des lymphocytes T se produit dans le thymus au stade double positif (CD4⁺CD8⁺). Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ exprimant la V β 8 du RcT seront absents des organes lymphoïdes périphériques de ces souris. En contrepartie, l'injection de SEB chez la souris adulte produit une prolifération des cellules CD4 et CD8 V β 8⁺ (Kawabe et Ochi, 1991; MacDonald *et al.*, 1991; Herrmann *et al.*, 1991). En plus de cette prolifération, il y a production de plusieurs lymphokines telles IL-1, IL-2, IL-3, IL-4,

IL-5, le TNF- α et d'INF- γ . Quatre jours après l'injection de SEB, il y a une prolifération suivie d'une diminution des cellules T V β 8⁺. Cette diminution est due à la mort par apoptose des cellules stimulées par SEB (Kawabe et Ochi, 1991). Les lymphocytes T V β 8⁺ qui restent ne prolifèrent pas lorsqu'ils sont mis en présence de SEB *in vitro*. Ces cellules dites anergiques (paralysie fonctionnelle) ne produisent pas d'IL-2 (Rellahan *et al.*, 1990; Kawabe et Ochi, 1990, MacDonald *et al.*, 1991). Cette paralysie fonctionnelle affecte seulement les cellules CD4 réagissant à SEB car les cellules sont capables de répondre *in vitro* à d'autres SAg comme SEA. L'injection de SEA provoque une réaction similaire à SEB par contre l'injection de TSST-1 n'induit pas d'anergie (Ochi *et al.*, 1993).

Toutefois, pour les SAg de MMTV, on remarque des différences. Lorsque des cellules B exprimant le SAg endogène *Mtv-7* sont injectées à des souris n'exprimant pas ce SAg, seulement les CD4⁺ exprimant la V β 6 prolifèrent. Les autres lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ capables de reconnaître *Mtv-7* ne sont pas amplifiées (Waanders et MacDonald, 1992). Uniquement les CD4⁺V β 6⁺ sont anergiques ou éliminés. Le même phénomène se produit lors de l'injection du virus infectieux MMTV (SW) (Held *et al.*, 1992). La stimulation d'une forte proportion de cellules T pour ensuite les éliminer ou les rendre anergiques a des conséquences sur le système immunitaire de l'hôte. Cette stimulation des lymphocytes T exprimant des V β spécifiques peut activer des lymphocytes T et B auto-réactifs et provoquer des maladies auto-immunes.

5.4 Les interactions des superantigènes avec les molécules de classe II du CMH

L'interaction des SAg de MMTV avec les molécules de classe II du CMH a été inférée à partir de données fonctionnelles. Jusqu'à présent, nous disposons comme preuve d'une interaction le fait que la reconnaissance des SAg de MMTV puisse être bloquée par des anticorps anticlasse II (Peck *et al.*, 1977). Des souris I-E⁻, c'est-à-dire qui n'expriment pas la molécule de classe II I-E sont incapables de présenter les

SAg de MMTV. De plus, il a été impossible de montrer une association entre les SAg de MMTV et les molécules de classe II par des études de co-immunoprécipitation. Par opposition, l'interaction des SAg bactériens avec les molécules de classe II est très bien caractérisée. Décrivons brièvement l'interaction des toxines SEA, SEB et TSST-1 de *Staphylococcus aureus* avec les molécules de classe II.

Une stimulation efficace des cellules T par les SAg bactériens de *Staphylococcus aureus* nécessite la liaison de la toxine sur les molécules de classe II. L'étude de la liaison et de la présentation des SAg bactériens a permis de définir les caractéristiques générales qui dictent cette interaction. Des mutations successives sur l'hélice α qui forme la paroi de la niche peptidique de la molécule de classe II affectent grandement la présentation de plusieurs peptides mais non celle de SEB. Contrairement à un peptide antigénique classique, les SAg bactériens se lient aux molécules de classe II en dehors de la niche à peptide des protéines du CMH (Dellabona *et al.*, 1990).

La résolution récente des données cristallographiques des toxines SEB et TSST-1 complexées aux molécules de classe II HLA-DR1 permet de préciser que ces SAg se lient en dehors du sillon de fixation peptidique des molécules de classe II (Jardetzky *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994). Malgré une structure tridimensionnelle comparable organisée en deux domaines, ces protéines possèdent des sites et des caractéristiques de fixation distincts sur les molécules de classe II. Des études de mutagenèse ont permis d'identifier trois régions fonctionnelles de SEB (Kappler *et al.*, 1992). Des mutations introduites dans la portion N-terminale (région 1) affectent la liaison de SEB aux molécules de classe II du CMH. Le même phénomène est observé pour des mutants dans la région 2. Tous ces résultats suggèrent fortement que SEB possède plusieurs régions de contact avec les molécules de classe II. La mutation des résidus 60-61 dans la région 3, affecte l'activation des cellules T, mais n'altère pas la liaison de la toxine aux molécules de classe II. Le cristal SEB-HLA-DR1 montre que

les mutations des résidus de SEB intervenant dans la liaison aux molécules de classe II ou au RcT sont exposés au solvant. L'analyse de la structure tertiaire de SEB-HLA-DR1 révèle que des résidus d'une même région (région 1) peuvent intervenir à la fois dans la liaison aux molécules de classe II et au RcT (Jardetzky *et al.*, 1994). La portion N-terminale de SEB interagit latéralement en se fixant sur la chaîne $\alpha 1$ de la molécule de classe II, ce qui ne provoque aucun changement dans la conformation de la molécule de classe II ou de la toxine (Swaminathan *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993). La liaison de SEB avec la molécule HLA-DR1 n'interagit pas avec le peptide contenu dans la niche peptidique (Wen *et al.*, 1996; Woodland *et al.*, 1997). TSST-1 interagit avec les régions $\alpha 1$ et $\beta 1$, c'est-à-dire des résidus situés de part et d'autre de la niche peptidique. Des études sur les sites actifs de TSST-1 montrent que contrairement à SEB, des résidus N-terminaux et des résidus à l'extrémité C-terminale de TSST-1 interagissent avec la molécule de classe II (Edwin et Kass, 1989; Acharya *et al.*, 1994). Le peptide contenu dans la niche peptidique influence la liaison de TSST-1 sur la molécule de classe II (Thibodeau *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1994). En résumé, ces résultats suggèrent que les sites de liaison de SEB et TSST-1 se chevauchent, mais qu'ils sont distincts.

La toxine SEA constitue une autre molécule dont la liaison aux molécules de classe II a fait l'objet d'études. Les caractéristiques de liaison de SEA sur différents allèles de la molécule HLA-DR fournissent les premiers indices servant à identifier le site de liaison de cette toxine. Puisque l'allèle DRw53 ne lie pas et ne présente pas SEA, des chimères entre les différents domaines d'un allèle qui présente SEA tel DR1 et DRw53 ont permis d'identifier le site de liaison de la toxine. SEA présente une interaction particulière puisqu'elle possède deux sites de liaison sur la molécule de classe II : un site de forte affinité dans la région $\beta 1$ et un site de faible affinité, près de celui de SEB sur $\alpha 1$ (Abrahmsen *et al.*, 1995; Tiedemann *et al.*, 1995). La région C-terminale de SEA assure l'ancrage de la toxine sur la chaîne β mais plusieurs régions N-terminales participent à la liaison de la toxine (Pontzer *et al.*, 1993). La

particularité des deux sites de liaison de SEA expliquerait que dans des expériences de compétition, SEA déplace la fixation de SEB et TSST-1. Le site de liaison de SEA sur la chaîne β 1 dépend de l'ion Zn^{2+} , une particularité originale de SEA suggérant la régulation par cet ion de l'établissement de l'interaction entre la toxine et le résidu histidine 81 de la molécule HLA-DR1 (Herman *et al.*, 1991; Fraser *et al.*, 1992; Karp et Long, 1992). Une mutation de l'histidine 81 par une alanine à cette position abolit la liaison et la présentation de SEA par la molécule de classe II. Fort probablement, la liaison de SEA est influencée par le peptide dans le sillon peptidique, mais il faudrait des études complémentaires de mutagenèse et le cristal SEA-HLA-DR1 afin de mieux pouvoir caractériser la structure de SEA.

Ces trois SAg provenant d'un seul pathogène, *Staphylococcus aureus*, possèdent des fonctions activatrices similaires mais utilisent des voies différentes pour y parvenir. La diversité des associations entre ces trois SAg et les molécules de classe II permet d'envisager autant de modes d'interaction avec les molécules de classe II qu'il y a de SAg différents.

5.5 Les interactions des superantigènes avec le récepteur T

5.5.1 Identification du site d'interaction des superantigènes sur la chaîne β du RcT: HV4

La chaîne β soluble du RcT a permis de révéler le rôle de la chaîne β du RcT dans la reconnaissance du complexe SAg-molécules de classe II. La chaîne murine $V\beta$ 3 soluble du RcT a la capacité de lier directement des cellules B classe II positives préincubées avec SEA (Gascoigne et Ames, 1991). Par contre, l'absence d'une liaison de SEA aux molécules de classe II empêche l'interaction de la chaîne $V\beta$ 3 avec la toxine. Un RcT $\alpha\beta$ soluble peut également reconnaître la toxine SEB lorsqu'elle est présentée par des cellules exprimant la molécule de classe II humaine. Ces expériences montrent clairement que la chaîne β du RcT interagit avec le SAg et dicte la spécificité

d'une telle interaction. De plus, la chaîne α du RcT joue également un rôle dans la reconnaissance des SAg.

La reconnaissance du complexe peptide antigénique-molécule de classe II par le RcT fait intervenir les régions CDR1, 2 et 3. La stimulation des cellules T par un SAg suggère que les régions CDR1, 2 et 3 n'interviennent pas dans la reconnaissance. Les régions exposées au solvant du RcT sont formées des brins β A, B, D et E et d'une quatrième boucle HV4 (*hypervariable region 4* ou CDR4) reliant les brins D et E. Cette région HV4 formée des a.a. 65 à 75 de la chaîne V β du RcT interagit avec les SAg (Choi *et al.*, 1990).

La région HV4 joue un rôle crucial dans la reconnaissance des SAg bactériens. La chaîne V β 13.2 humaine du RcT interagit avec SEC₂ et SEC₃ tandis que la chaîne V β 13.1 en est incapable. Lorsqu'on a comparé les séquences de ces deux gènes, on a noté une différence dans la région HV4. Des échanges réciproques des a.a. 70 à 80 des chaînes V β 13.1 et V β 13.2 ont permis d'identifier que la région HV4 (résidus 65 à 75) participe à l'interaction entre le SAg et le RcT (Choi *et al.*, 1990). On a observé des résultats similaires lorsqu'on a remplacé des résidus de la région HV4 de la V β 3 murine se liant à SEC₃ par des résidus de la V β 17a qui n'interagit pas avec SEC₃ abolissant ainsi la reconnaissance de ce SAg (White *et al.*, 1993). Ces deux régions V β sont capables de reconnaître SEA, donc des résidus différents de HV4 interagissent avec SEA. Dans une autre étude, des peptides correspondant à différentes régions du RcT sont utilisés pour inhiber l'activation des cellules T par les toxines de SE. Des peptides contenant les résidus 55 à 77 (région HV4) inhibent la reconnaissance de SEA par la chaîne V β 3 et abolit l'activation des cellules T V β 3⁺ par SEA (Pontzer *et al.*, 1992).

La région HV4 de la chaîne V β est également le site d'interaction pour les superantigènes de MMTV. Une substitution de résidus de la chaîne V β 8.2 (isolée à

partir de souris sauvages) qui reconnaît le SAg *Mtv-7* par ceux de la V β 8.2 (isolée à partir de souris de laboratoire) n'interagissant pas avec *Mtv-7* permet à cette dernière de gagner une réactivité au SAg. La présence d'un site de glycosylation dans la région HV4 de la V β 8.2 (des souris de laboratoire) provoque un encombrement stérique et empêche l'interaction entre le SAg *Mtv-7* et le RcT (Pullen *et al.*, 1990; Pullen *et al.*, 1991). Ces expériences de substitution montrent clairement que la région HV4 (résidus 70, 71) de la chaîne β et le résidu 22 du brin β B qui précède le CDR1 jouent un rôle critique dans la reconnaissance à Mls-1^a. Cazenave *et al.*, 1990 montrent qu'un SAg de MMTV endogène présenté par I-E n'élimine pas les cellules V β 17⁺ chez les souris sauvages, mais que chez les souris de laboratoire l'élimination a lieu. Des mutations naturelles aux positions 48 et 74 de la chaîne β du RcT empêchent l'interaction entre le SAg endogène et la V β 17 chez les souris sauvages. De plus, des peptides dans la région CDR4 inhibent la présentation de Mls-1^a aux lymphocytes T V β 6⁺ (MacNeil *et al.*, 1992).

Toutes ces expériences montrent que la région HV4 de la chaîne V β interagit avec les SAg viraux et bactériens. Par contre, certaines cellules T n'arrivent pas à reconnaître un SAg même si elles expriment la bonne région V β ; d'autres régions de la chaîne V β du RcT pourraient donc intervenir dans la reconnaissance des SAg.

5.5.2 Rôle de la chaîne V α et des résidus non HV4 dans la reconnaissance des superantigènes

L'expression de Mls-1^a endogène donne lieu à l'élimination partielle des cellules T ce qui suggère qu'une chaîne V α non transgénique pairée à une chaîne V β transgénique puisse réguler la reconnaissance de Mls-1^a. Des souris transgéniques pour la chaîne V β 8.1⁺ reconnaissant le SAg *Mtv-7* n'éliminent pas toutes les cellules V β 8.1⁺. Cette absence d'élimination totale des V β 8.1 suggère une influence de la chaîne α dans la délétion clonale (Blackman *et al.*, 1990). Afin de déterminer la

contribution de la chaîne α du RcT dans la reconnaissance à Mls-1^a et à SEB, en l'absence de la chaîne β , l'équipe de Smith *et al.*, (1992) a produit des hybridomes T exprimant la chaîne V β 8.1 provenant de souris transgéniques. Leurs résultats montrent que les hybridomes T V β 8.1 exprimant la V α 11.1 permettent la reconnaissance de Mtv-7 mais que l'utilisation de la chaîne V α 2 empêche cette reconnaissance. De ce fait, les cellules T V β 8.1⁺V α 2⁺ sont présentes dans les organes périphériques des souris Mls-1^a, mais les lymphocytes T V β 8.1⁺V α 11.1⁺ sont absents (Smith *et al.*, 1992). De plus, les lymphocytes T V β 8.1⁺V α 11.1⁺ reconnaissent le SAg SEB tandis que les lymphocytes T V β 8.1⁺V α 11.3⁺ ne réagissent pas à SEB. Tous ces résultats montrent l'influence de la chaîne α dans la reconnaissance aux SAg.

La présence d'une chaîne V α biaisée parmi des cellules T réactives à un SAg a aussi été observée chez des souris non transgéniques. On observe l'influence de la chaîne α du RcT dans la reconnaissance des SAg Mtv-7 et SEB lors de la stimulation *in vitro* des lymphocytes T V β 6⁺ et V β 8.2⁺. Vacchio *et al.*, (1992) montrent que les cellules T V β 6⁺ exprimant les V α 2, 3.2 et 8 sont sous-représentées comparativement aux cellules V β 6⁺V α 11⁺. La chaîne V α 11 est associée à une forte reconnaissance de Mls-1^a tandis que la chaîne V α 2 est associée à une faible reconnaissance pour les cellules T V β 8.1⁺ transgéniques et les cellules T V β 6⁺ non transgéniques. Ces résultats suggèrent que le rôle de la chaîne V α est indépendant de celui de la chaîne V β du RcT. De plus, la V α 11 est associée à une forte reconnaissance pour Mls-1^a et SEB suggérant que l'influence de la V α est également indépendante du SAg. Ces résultats ne sont pas confirmés par l'étude de Waanders *et al.*, (1993) et contrairement aux études précédentes, les cellules T V β 6⁺V α 11⁺ et les cellules V β 8.2⁺V α 11⁺ ne sont pas préférentiellement amplifiées suite à une stimulation *in vitro* par Mls-1^a ou suite à une infection *in vivo* à SEB respectivement. Récemment, Borrero *et al.*, (1995) montrent une association entre la V β 6 et la V α 4 dans une réponse à SEB (revue par Blackman et Woodland, 1996).

Les résultats de ces équipes indiquent que la chaîne α du RcT peut influencer de plusieurs façons la reconnaissance des SAg par les lymphocytes T, mais que l'effet varie pour des cellules T exprimant différentes chaînes V β et pour différents SAg.

Par ailleurs, des résultats suggèrent que les régions D β et J β du RcT peuvent aussi influencer la reconnaissance des SAg. L'expression de la molécule de classe II I-E permet la présentation d'un SAg de MMTV endogène et occasionne l'élimination presque totale des lymphocytes T V β 17⁺. Toutefois, on note l'absence de la région J β 1.1 dans les lymphocytes T V β 17 résiduels. Les souris I-E⁺ utilisent de préférence la J β 2.5, comparativement aux souris qui n'éliminent pas les lymphocytes T V β 17⁺ (souris I-E⁻) (Candéias *et al.*, 1991). Plus récemment, Chies *et al.*, (1996) démontrent une utilisation préférentielle de la V α et J β chez des cellules T V β 6⁺ qui survivent la délétion thymique chez les souris Mls-1^a. Dans d'autres études, les résidus CDR1 de la chaîne β du RcT semblent agir dans la reconnaissance du SAg Mls-1^a (Kang *et al.*, 1994). Des mutations dans les régions CDR1 et CDR2 ont un effet dans la reconnaissance des SAg bactériens (Patten *et al.*, 1993; Bellio *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1996). L'importance de la région CDR2 du RcT dans la reconnaissance de SEC et SEB a été caractérisée par des expériences de mutagenèse et des données cristallographiques de la toxine SEC complexée au RcT (Fields *et al.*, 1996b).

La reconnaissance du SAg par le RcT dépend de l'expression d'un élément V β particulier et le rôle des régions adjacentes ne semble pas neutre. La chaîne V α et la région J β sont susceptibles d'influencer l'interaction entre le SAg et le RcT. Woodland et Blackman (1993) proposent que le rôle de ces interactions soit important lorsque l'affinité du SAg pour une région V β est faible. Plus cette reconnaissance est faible, plus l'interaction entre les molécules de classe II et le RcT devrait être importante, faisant participer des molécules accessoires comme le CD4 et même le

peptide. Le résultat de ces interactions permet d'augmenter l'avidité du RcT pour le complexe SAg-classe II (Surman *et al.*, 1994; Blackman et Woodland, 1996).

5.6 Interaction entre le RcT et la molécule de classe II dans la reconnaissance des superantigènes

Des indices expérimentaux suggèrent que la reconnaissance des SAg par les lymphocytes T nécessite une interaction entre le RcT et les molécules de classe II. Les SAg peuvent se lier à la majorité des allèles et des isotypes de classe II, et le polymorphisme des molécules de classe II affecte leur présentation par les cellules T (Herman *et al.*, 1990; Yagi *et al.*, 1991). Certains hybridomes T reconnaissent un SAg de préférence lorsqu'il est présenté par une molécule de classe II spécifique (Blackman *et al.*, 1992). Des études menées par Labrecque *et al.*, (1994) montrent que la mutation du résidu histidine 81 situé sur la chaîne β de la molécule DR1 influence la capacité d'un hybridome T à reconnaître les toxines SEB et TSST-1. Par contre, cette mutation permet toujours à SEB et TSST-1 de se lier à la molécule DR1. Des études plus détaillées indiquent que des mutations sur des résidus de la molécule DR1 venant peut-être en contact avec le RcT peuvent réduire ou augmenter la réponse des hybridomes T à SEB. Ces mêmes mutations n'ont aucun effet sur la présentation de *Mtv-7* suggérant que des cellules T identiques peuvent interagir de façon différente avec les molécules de classe II durant la reconnaissance à SEB et TSST-1. L'influence des régions D β , J β , V α et J α du RcT lors de la reconnaissance des SAg bactériens et viraux résulte probablement d'une interaction RcT-molécule de classe II (Waanders *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1992; Vacchio *et al.*, 1992). Ces expériences de mutagenèse montrant l'existence d'une interaction entre le RcT et la molécule de classe II sont appuyées par le cristal de la toxine SEB complexée à la molécule HLA-DR1 (Swaminathan *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1993; Jardetzky *et al.*, 1994). Le cristal montre que l'orientation du complexe RcT-SAg-CMH diffère de 45° comparativement à l'orientation du complexe RcT-peptide-CMH. La superposition de la structure de SEC₂ complexée au RcT sur la structure de SEB complexée à HLA-DR1 suggère que

ces SAg agissent comme un levier entre le RcT et le CMH où seulement une région de la chaîne α du RcT touche la molécule du CMH (Fields *et al.*, 1996). En résumé, les données structurelles et fonctionnelles suggèrent que l'orientation du RcT-CMH durant la reconnaissance des SAg diffère de l'orientation du RcT-CMH durant la reconnaissance d'un antigène classique.

6.0 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL

La sélection clonale du répertoire des cellules T qui a lieu dans le thymus permet de sélectionner des RcT pouvant reconnaître les peptides étrangers associés aux molécules du CMH du soi. Cette double reconnaissance dans le contexte des molécules du soi ne devrait pas perturber l'organisme. Deux méthodes permettent d'analyser la structure et la dynamique du répertoire des cellules T : la technique de PCR quantitatif et la cytométrie en flux. Le répertoire des cellules T périphériques ou matures, résultat des processus de sélection thymique est influencé par les molécules du CMH. D'autres facteurs peuvent également jouer un rôle, tels les origines génétiques, les antigènes du soi exprimés au niveau du thymus ainsi que les facteurs environnementaux (l'exposition à des agents pathogènes).

Au cours de cette thèse, nous avons tenté d'abord de définir un répertoire normal de récepteurs T chez l'homme et d'évaluer la contribution des facteurs génétiques pouvant influencer la sélection du répertoire. Le répertoire des cellules T humaines est-il sélectionné de façon aléatoire ? Quels sont les déterminants génétiques qui influencent sa formation ? Existe-t-il d'autres déterminants environnementaux (exposition à des virus) ? L'étude du répertoire $V\alpha$ et $V\beta$ des lymphocytes T est cependant rendue difficile par la grande hétérogénéité de la population humaine. Par contre, il a été possible de contourner cet obstacle en étudiant le RcT chez des individus possédant un génotype identique, soit les jumeaux monozygotes. Cette analyse a été effectuée par cytométrie en flux, ce qui a permis de définir au niveau

macroscopique l'ensemble du répertoire exprimé par les cellules CD4⁺ et CD8⁺. De plus, comme l'analyse cytofluorométrique utilise des Ac monoclonaux ne couvrant que 65 % des familles de la chaîne β du R α T, nous avons développé le test de PCR quantitatif qui fait appel à des oligonucléotides spécifiques à toutes les familles de V α et V β . Certaines V β sont sélectionnées par les molécules de classe I du CMH et d'autres par les molécules de classe II du CMH durant la sélection thymique. Il est donc possible que les répertoires dans les cellules CD4 et CD8 soient différents. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé les répertoires V β sur des populations CD4 et CD8 purifiées.

Un deuxième point critique à considérer lors de l'analyse du répertoire T chez l'homme est sa stabilité. Quels sont les éléments qui peuvent affecter la stabilité ? Peu d'études ont porté sur une analyse longitudinale du répertoire T afin de déterminer l'effet d'expositions à des antigènes environnementaux et le renouvellement des cellules T. Pour ce faire, nous avons analysé, à deux reprises et à un an d'intervalle, le répertoire V β des lymphocytes T, d'une seule paire de jumeaux par PCR quantitatif et par cytométrie en flux.

Les virus sont des éléments qui peuvent perturber le répertoire T. Ainsi non seulement les virus codent pour des antigènes qui stimulent des réponses spécifiques à des peptides viraux, mais ils codent pour des SAg qui stimulent une forte proportion (5 à 25 %) de lymphocytes T exprimant les régions V β du R α T appropriées. La présence des SAg endogènes tel le MIs chez la souris influence le répertoire des cellules T puisque leur expression provoque l'élimination dans le thymus des lymphocytes T capables d'interagir avec le SAg. De la même façon, une infection par les SAg exogènes (MMTV) *in vivo* chez les souris provoquent la prolifération suivie de l'élimination ou l'anergie des lymphocytes T exprimant les régions V β spécifiques du R α T. L'influence des SAg sur le répertoire T, leur rôle possible dans la pathogénèse

de quelques maladies nécessitent une compréhension plus approfondie de leur mode d'interaction avec les cellules T.

Le deuxième objectif de cette thèse de doctorat consistait à étudier les perturbations du répertoire des cellules T humaines *in vivo* suite à une infection par un rétrovirus, le VIH. Le MMTV et le VIH, l'agent étiologique du SIDA, sont tous deux des rétrovirus. La destruction des cellules T CD4⁺ par le VIH, cause principale de la déficience immunitaire observée chez les individus infectés, pourrait être expliquée par l'activation et la suppression des cellules T exprimant des V β spécifiques du virus. Plusieurs études ont démontré que le répertoire T était fortement perturbé lors de l'infection par le VIH. Toutefois, ces analyses ont abouti à des résultats contradictoires qui s'expliqueraient par l'hétérogénéité des populations étudiées, le stade de la maladie ou encore le manque de sensibilité des méthodes utilisées pour la détection du virus. Nous avons voulu confirmer la présence de perturbations V β associées au VIH dans le répertoire des cellules T, ce qui pourrait soutenir l'hypothèse selon laquelle le VIH, tout comme d'autres virus pourrait être associé à un SAg. Puisque la présence de divers allèles du CMH peut mener à différentes réponses aux SAg, nous avons étudié le répertoire V β du RcT dans les lymphocytes CD4⁺ de neuf paires de jumeaux monozygotes discordants pour l'infection à VIH par PCR quantitatif et par cytométrie en flux. Cette approche expérimentale a permis de contourner tous les obstacles associés aux autres études.

Comme pour les molécules de classe II murines, le polymorphisme allélique et isotypique des molécules de classe II humaines affectent la présentation du SAg *Mtv-7*. Dans notre laboratoire, un système *in vitro* de stimulation a été mis au point et a permis de démontrer que les molécules de classe II humaines présentent efficacement le SAg de *Mtv-7* aux lymphocytes T humains. Ces résultats révèlent que les molécules de classe II humaines et les RcT humains possèdent toutes les caractéristiques permettant la reconnaissance des SAg endogènes de MMTV. Le polymorphisme allé-

lique des segments $V\alpha$ et $V\beta$ dans la population humaine contribue à diversifier les répertoires des lymphocytes T. Plusieurs gènes fonctionnels $V\beta$ montrent un polymorphisme allélique au niveau du RcT. Par exemple, les $V\beta 6.7a$ et $V\beta 6.7b$ diffèrent d'un acide aminé dans la région HV4 qui est impliquée dans la réponse aux SAg de MMTV. L'utilisation des SAg de MMTV permet l'étude fonctionnelle du polymorphisme des régions $V\beta$ du RcT. La présentation des SAg aux lymphocytes T humains provenant de différents individus permet de mettre en évidence l'utilisation ou la non-utilisation d'une certaine région $V\beta$ du RcT. Nous avons exploité cet aspect au cours de ce doctorat en analysant la nature et la structure du RcT en réponse à un autre superantigène rétroviral (*Mtv-9*) *in vitro* chez des individus normaux. Dans un premier temps, nous avons vérifié si les lymphocytes T humains pouvaient répondre au SAg de *Mtv-9*. Nous avons utilisé ce modèle de stimulation où des fibroblastes murins DAP exprimant la molécule de classe II humaine HLA-DR1 ont été transfectés avec de l'ADN codant pour le SAg de *Mtv-9* (vSAG9) afin de stimuler des cellules T humaines de trois individus normaux. Les fibroblastes sont des cellules faciles à transfecter, elles peuvent présenter de façon efficace les SAg exogènes aux lymphocytes T, de plus, elles n'expriment pas les SAg endogènes, ces derniers n'étant présents que dans les cellules B. Le répertoire de cellules T répondant au SAg de *Mtv-9* a été analysé par PCR quantitatif et par cytométrie en flux.

Les SAg viraux de MMTV stimulent les cellules T via la région HV4 de la chaîne β du RcT qui est distincte de la région CDR3 impliquée dans la reconnaissance des Ag présentés par les molécules du CMH. Plusieurs observations indiquent que les régions non HV4 influencent la réponse aux SAg et, par conséquent, qu'un contact entre le RcT et le CMH existe lors d'une réponse superantigénique. Dans un deuxième temps, nous avons étudié la contribution des éléments non HV4 dans la reconnaissance du SAg de *Mtv-9*. Pour ce faire, nous avons utilisé des techniques moléculaires telles que le clonage et le séquençage des gènes codant pour la chaîne β du RcT. L'interaction des SAg bactériens avec le RcT et le CMH est bien caractérisée

grâce aux études de cristallographie comparativement aux SAg viraux où aucun cristal de ces interactions n'existe. Notre système nous a permis de suggérer un modèle d'interaction CMH-SAg viral-RcT.

Dans l'ensemble, ces expériences nous ont permis de mieux comprendre la dynamique d'un répertoire de cellules T humaines ainsi que l'influence des SAg et des infections virales sur ce répertoire *in vitro* et *in vivo* respectivement.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1 : Study of the T-cell receptor repertoire in healthy human monozygotic twins.

Study of the T-cell receptor repertoire in healthy human monozygotic twins

Cristina Ciurli^(1,2), Najet Rebai⁽¹⁾ and Rafick-Pierre Sékaly^{(1,2,3) (*)}

*Correspondence and reprint requests should be addressed to Dr. Rafick-Pierre Sékaly, Immunology Laboratory, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110, av. des Pins Ouest, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7.

Email: SekalyR@IRCM.Umontreal.ca. Tel.: (514)-987-5549. FAX: (514)-987-5711.

Running title: T-cell receptor repertoire in monozygotic twins.

⁽¹⁾Immunology laboratory, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7, ⁽²⁾Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montréal, Montréal, Québec, Canada, and ⁽³⁾Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada.

Soumis pour publication dans *Research in Immunology*.

SUMMARY

T-cell receptor rearrangement is the basis for the expression of functional T-cell receptors that recognize antigenic peptides in the context of major histocompatibility complex molecules. The mechanisms that subsequently control the T-cell receptor selection and generation of the peripheral repertoire are not well understood, but seem to occur in a self antigen-driven manner. To determine whether the T-cell receptor repertoire is randomly shaped or whether genetic factors influence the shaping of the mature peripheral T-cell repertoire in humans, we studied the $\alpha\beta$ T-cell receptor repertoire of six pairs of healthy monozygotic twins. The twins were HLA-typed and their T-cell receptor repertoire was analyzed by two different and complementary techniques: flow cytometry and quantitative polymerase chain reaction using TCR AV- and BV- specific primers. Using these techniques, we were able to assess the expression of particular AVs and BVs in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell subpopulations. Our results indicate that the T-cell receptor AV and BV repertoires expressed by $CD4$ and $CD8$ cells were conserved within each pair of the six twins. However, the TCR AV and BV expression profiles within a given twin pair varied between the $CD4^+$ and $CD8^+$ compartments. A preferential usage of BV6, AV22 (as shown by quantitative polymerase chain reaction) and BV6S7*1 (as observed by flow cytometry) could be detected in the $CD4^+$ T lymphocytes. In $CD8^+$ T lymphocytes, BV7 and the AV7 (shown by quantitative polymerase chain reaction) predominated in comparison to other V segments. Differences in the expressed TCR BV profiles were observed between twin pairs. The BV profiles within a given twin pair were strikingly similar. No specific BV could be correlated with a particular HLA class I or II allele. To investigate whether the TCR repertoire was stable, one pair of monozygotic twins was studied on two occasions at intervals of one year. The percentage of $CD4$ and $CD8$ cells expressing a particular BV was found to be stable over the time period investigated. These observations suggest that the T-cell receptor repertoire is shaped by genetic factors and is quite stable over time.

Key words: T-cell receptor, AV and BV repertoires, monozygotic twins.

INTRODUCTION

The T-cell receptor (TCR) is a disulfide-linked cell surface heterodimer composed of one α and one β chain. The TCR is responsible for the specific interaction of T lymphocytes with conventional peptide antigens presented in the context of Major Histocompatibility Complex molecules (MHC). The TCR is created through the somatic rearrangement of noncontiguous variable (V), diversity (D) and joining (J) germline gene segments for the β chain. The α chain lacks the D segment (Toyonaga *et al.*, 1985). The variable gene segments of the TCR α and β chains are grouped into families based on nucleotide sequence homologies. The human germ-line TCRAV gene segment repertoire includes over 100 members combined in more than thirty three families, while the TCRBV repertoire includes 65 members combined in thirty families (Toyonaga *et al.*, 1987; Wilson *et al.*, 1988; Wei *et al.*, 1994; Arden *et al.*, 1995; Rowen *et al.*, 1996). The TCR repertoire of an individual can be analyzed by flow cytometric analysis, using monoclonal antibodies (mAbs) directed against the different V region determinants. The limited number of available mAbs reacting with the TCRAV remains a strong impediment to the use of this technique to analyze the AV repertoire. Over 80 different monoclonal antibodies are currently characterized, that recognize various BV determinants, covering approximately 65% of the expressed human BV repertoire (Ciurli *et al.*, 1996). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using oligonucleotide primers specific for all AV and BV families, has been used by a number of groups to study the expressed TCR repertoire in healthy subjects and various pathological conditions (Choi *et al.*, 1989; Panzara *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1992; Akolkar *et al.*, 1993; Labrecque *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Rebai *et al.*, 1994). Genetic analysis of large families with multiple siblings showed that the HLA genes can profoundly influence the human TCR repertoire (Gulwani-Akolkar *et al.*, 1991; Akolkar *et al.*, 1993). Akolkar *et al.*, 1993 have shown that some BV segments are preferentially expressed either on CD4⁺ or CD8⁺ cells. When they analyzed related and unrelated individuals they were able to show that some BVs such

as BV2, 5.1, and 9 were predominantly expressed on the CD4⁺ T cells whereas BV7, 14 were expressed preferentially on CD8⁺ T cells. Their data could be explained as the result of positive selection of CD8⁺ T cells on HLA class I molecules expressed in the thymus, and the selection of CD4⁺ T cells on HLA class II respectively. To study the effects of HLA genes on the TCR α segment usage, a similar analysis was performed for the AV segment (Gulwani-Akolkar *et al.* 1995). The results indicated that the AV repertoires between HLA identical siblings differed as much as the AV repertoires between HLA non-identical sibs. However, identical twins had more similar AV repertoires than HLA-identical sibs. Their data suggest that even if HLA genes play a minor role in the shaping of the AV repertoire, other non-HLA genes, such as polymorphism of the TCR, can influence the AV repertoire and the BV repertoire. In our study, we first analyzed the BV repertoire of two unrelated individuals by flow cytometry at intervals of 6 months. The repertoires in the CD4 and CD8 compartments showed pronounced differences between the two individuals but was stable over the time period monitored (6 months). We subsequently examined the TCR α and β chain V gene usage within the CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations by flow cytometry and qPCR of six pairs of monozygotic twins. We were able to see a high concordance of BV gene usage within a pair of twins when compared to non-HLA matched individuals. In addition, a high expression of the BV6 in CD4⁺ T cell subset was observed in all pairs of twins. No specific BV could be correlated with a particular allele and our observation supports previous data (Akolkar *et al.*, 1993). The study of monozygotic twins showed that the $\alpha\beta$ TCR repertoire is not a random process but reveals genetic predispositions to a certain pattern. When one pair of twins was studied on two occasions at intervals of one year, the percentage of CD4⁺ T cells expressing a unique BV was stable over the time period of one year. No major change in the repertoire in terms of BV proportions was seen but differences were detected in the CD8⁺ T cells.

ABBREVIATIONS

HLA :	Human Leukocyte Antigen
qPCR :	quantitative polymerase chain reaction
mAb :	monoclonal antibody
MHC :	Major Histocompatibility Complex
PBMCs :	peripheral blood mononuclear cells
TCR :	T-cell receptor
TCRAV :	TCR V α gene
TCRBV :	TCR V β gene
BV6S7*1 :	V β 6.7a

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Six pairs of monozygotic twins were chosen at random for this study. All six pairs are natives of Quebec, Canada. Five pairs are females and in their mid-twenties and one pair is male and in their forties. HLA typing was performed by standard serologic techniques (Société Canadienne de la Croix-Rouge, Montréal, Québec, Canada). The HLA types are listed in Table 1.

T cell subset preparation

Total peripheral blood lymphocytes isolated by Ficoll-Hypaque gradient were sorted with the FACScan (Becton Dickinson) in CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations of T cells and were subjected to a 24 hours stimulation in the presence of 1 µg/ml of PHA.

RNA preparation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from 30x10⁶ cells by the RNazol method (Cinna/Biotecx Laboratories, Houston, TX). Quantity and purity of RNA were measured by absorbance at 260 nm and the ratio of O.D.₂₆₀ to O.D.₂₈₀. Integrity of the RNA was tested on a 1% agarose gel stained with ethidium bromide. Total RNA (10-15 µg) was reverse transcribed into first-strand cDNA using random hexamers (Pharmacia LKB, Biotechnology, Uppsala, Sweden) and 5-10 units of Avian Myeloblastosis Virus reverse transcriptase (Life Sciences, St. Petersburg, FLI) per µg of RNA.

Analysis of the AV and BV repertoires by qPCR

For the PCR amplification 24 BV and 29 AV TCR family-specific oligonucleotide primers were used (Labrecque *et al.*, 1993; Rebai *et al.*, 1994). Several of these primers have been described (Choi *et al.*, 1989, Oksenberg *et al.*, 1990, and by Wucherpfennig *et al.*, 1990. The G-C content was ~40-60%. The specificity of the different AV and BV oligonucleotides was determined by crosshybridization (Rebai *et al.*, 1994). The cDNA preparation was precipitated and used for PCR BV analysis. PCR was performed in the geneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer Cetus) using Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer). The cDNA was subjected to the PCR analysis using 5' BV specific primers, and a universal 3' constant-region primer (BC). Both 5' and 3' AC primers were included in each PCR as internal controls. The 3' AC and 3' BC primer were radiolabeled with [γ - 32 P]ATP. Similarly, AV specific cDNA was amplified with AV specific primers and a 32 P-labeled C α primer. As controls, a pair of 5' BC forward and 3' BC reverse primers was included in each reaction to amplify a portion of BC RNA. Primer sequences of the TCRAV and BV specific oligonucleotides and of the control AC and BC oligonucleotides have been reported. (Labrecque *et al.*, 1993) The PCR reaction was carried out using 200 μ M dNTPs, 2U of Taq polymerase (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) in 1x Taq buffer (10mM Tris-HCL, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, and 0.01% {wt/vol} gelatin) in a final volume of 100ul. Amplification was performed for 30 s at 94° C, 45 s at 55° C and 60 s at 72° C for 25 cycles. Half the volume of each PCR mixture was loaded and separated on a 12% polyacrylamide gel containing 7M urea. Gels are exposed overnight on Kodak storable phosphor screens. The signal intensity for each BV obtained by volume integration using a PhosphorImager driven by the IMAGE-QUANT software (Molecular Dynamics) was normalized against the α -chain internal control and the relative percentage of BV expression was calculated by dividing the individual normalized values by the sum of all BV normalized values.

mAbs

Monoclonal antibodies against the human TCR β chain used in this study were: BV2, 3, 5.2, BV13S6 (JU74), 21.6, 22 (Immunotech Coulter, St-Laurent, Canada), BV5 (MH3-2), BV8 (MX6), BV8 (JR2), BV9 (MKB1), BV13S1 (H131), BV13S2 (H132), BV17 (C1), BV23 (HUT-78) (Immunotech TCR Workshop, T cell Sciences Inc., T cell Diagnostic, Woburn, MA, USA). BV6S7 (OT145) and BV12 (S511) were a generous gift from D.N. Posnett, Cornell University, New York, N.Y.. mAb specificity has been described previously (Posnett *et al.*, 1996).

BV repertoire by flow cytometry analysis

Cytofluorometric analysis was performed as described previously (Gulwani-Akolkar *et al.*, 1991). Total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) sorted in CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations of T cells were analyzed using two-color cytofluorometry on a FACScan (Becton Dickinson & Co.). Cells were counterstained with FITC-conjugated anti-CD4 and anti-CD8 mAbs. Thirty to 50,000 events were accumulated and analyzed for fluorescence in each experiment. Results were expressed on a four-decade logarithmic scale for each two-color histogram.

RESULTS

Analysis of the TCR repertoire in two unrelated individuals using BV specific mAbs

The TCR repertoires were examined in two randomly selected, healthy and unrelated individuals. The analysis was performed using eighteen different anti-BV mAbs. The data is expressed as the percentage of total CD4 and CD8 populations expressing a specific BV (fig. 1). The results show varying BV profiles between the two individuals as well as between the CD4 and CD8 subpopulations. In the CD4 subset, 2-3 BV segments (BV2, 8 and 17 in donor 1 and BV2 and BV17 in donor 2) represented $\geq 5\%$ of the total CD4 population. In the CD8⁺ compartment, BV3, BV5.2 and BV8 were $\geq 5\%$ in Donor 1 with BV5.2⁺ CD8⁺ T cells representing approximately 11% of total. A second critical issue to consider in analyzing the TCR repertoire in humans is the stability. Therefore, each individual was studied on two occasions at an interval of 6 months. We observed for both CD4 and CD8 compartments a remarkable stability of the TCR BV profiles (fig. 1).

Stability of the BV repertoire in one pair of monozygotic twins using qPCR at a time difference of one year

Peripheral T cells are always exposed to environmental antigens. This exposure can potentially stimulate T cell clones if they participate in the defense of the host. It is known that at birth the peripheral T cell repertoire of monozygotic twins is identical or closely related (Ebers *et al.*, 1986; Davey *et al.*, 1994). Adult monozygotic twins are likely to be exposed to different antigens. We addressed the question of whether repertoire in one set of monozygotic twins was stable over a one year period or whether it had diverged after potential challenges with environmental antigens. The BV expression was found highly concordant between the twins both in the CD4 and CD8 compartments. Moreover, the BV profiles of the CD4 compartment remained

remarkably stable within the one year time frame. In contrast, the CD8 subset showed striking changes (fig. 2).

Distribution of BV genes as determined by flow cytometry analysis

We analyzed the expression of the TCR repertoire with the available mAbs against the TCRBV gene products for 4 pairs of monozygotic twins (Table II). The BV6S7*1 expression detected by OT-145 mAb was higher in the CD4⁺ T cells subset in all four pairs of twins. BV7 and BV23 were highly expressed in the CD8 compartment of all pairs of twins. BV8 detected by either MX6 or JR2 mAbs showed nearly equal percentages in the CD4 and CD8 T cell subsets for the 4 pairs of twins. The BV5 expression detected either by 3D11 or MH3-2 mAbs did not show any specific skewing towards CD4 or CD8 T cells. Some pairs of twins such as AM-MM, AT-JT, and CM-IM expressed high levels of BV5 in the CD4 subset whereas DL-VL had low expression of BV5 in the CD4 subset. Expression in the CD4 subset was concordant within each pair of twins for the BV5 expression, but significant differences were noted in the CD8 compartment. In the CM-IM twin pair, a 1.5 fold difference was seen in the CD8 compartment and in the AM-MM twin pair, a 4.5 fold difference was noted in the CD8 compartment. All available mAbs recognizing the various BV determinants cover about 65% of our patient cohort. To obtain a better characterization of the repertoire, we performed a qPCR analysis using oligonucleotides designed to amplify all TCRBV family members.

Quantitative PCR analysis of the BV repertoire in healthy monozygotic twins

To determine if genetic factors influence the shaping of the T-cell receptor repertoire in humans, we studied the TCRBV repertoire of six pairs of monozygotic twins and the AV repertoire of three pairs of twins. Since monozygotic twins are genetically identical, it is possible to demonstrate whether the TCR repertoire is determined by inherited factors or whether the expression is shaped by post-thymic modulations exerted by antigens, superantigens or mitogens. Figure 3 shows the

complete TCRBV region usage patterns in sorted CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes subsets in one pair of monozygotic twins (CM-IM) as analyzed by qPCR. The twin pair CM-IM shows a striking similarity in both their CD4⁺ and CD8⁺ compartments. A high expression of BVs 2, 4, 6, 7, 13, and 18 in the CD4⁺ T cells subset is noticeable. The BVs 2, 4, 7, 13 are highly expressed in the CD8⁺ T cells subset. The overall frequency patterns of BV gene usage were conserved with all pairs of twins (data not shown). The BV6 was higher in CD4⁺ T cells versus CD8 whereas BV7 was higher in CD8⁺ T cells, a similar skewing was also seen in the other pairs of twins (fig. 4). BV6 was abundant in all pairs of twins in the CD4 compartment and when compared to the CD8 compartment. A 3.5 fold difference was detected in the CM-IM and AT-JT pairs, a 2.6 difference for JoR-JhR and DL-VL and a 1.75 difference for JoH-JnN, and AM-MM pairs (fig. 4). BV7 was highly expressed in the CD8 subset except for twin pair AM-MM, where the BV7 was not preferentially expressed in either the CD4 or the CD8 subset. A comparison of the data obtained from cytofluorometry and qPCR shows their correlations. However, some skewing seen with flow cytometry was not seen with qPCR. For example, the expression of BV5 and BV17 was lower in qPCR than with flow cytometry. Any vast differences could be explained by the fact that mAbs used in flow cytometry only cover 65% of the repertoire. There was no trend in BV usage which could be correlated with any of the HLA alleles.

Quantitative PCR analysis of the AV repertoire in healthy monozygotic twins

We then analyzed the TCRAV repertoire of three pairs of twins by qPCR by using AV segment-specific primers. Analysis was performed on both purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells. For the CM/IM pair of twins (fig. 5) there is a high usage frequency of the AVs 1, 2, 22, 23 in the CD4 compartment and AVs 1, 2, 7 in the CD8 compartment. Similar AVs were also expressed in the other two pairs of twins: (AM/MM) : AVs1, 2, 4, 22, 26 (CD4), and AVs 7, 22, 26 (CD8) and for (JhR/JoR): AVs1, 22, 26 (CD4), and AVs 1, 7, 26 (CD8) (data not shown) The AV22 was higher in the CD4 cells versus CD8 cells and AV7 was higher in the CD8 cells versus the CD4 cells (fig. 6). We have observed in our

study that the relative usage frequencies of individual V gene families remains constant between twins. It should be noted that a greater consistency between twins was observed in the BV gene usage compared with the AV.

DISCUSSION

We know little about the different mechanisms controlling the shaping of the mature peripheral T cell repertoire. In humans, it is not very clear if the repertoire is originally expressed at random before a thymic selection occurs. It is also not known how genetic factors modify the repertoire. Most of our knowledge on the T cell receptor repertoire comes from studies in mice. Genetic influences are apparent in inbred strains of mice (Vacchio *et al.*, 1989). Mice with deletions in their TCRBV genomic repertoire fail to respond or respond weakly to MHC-antigen combinations that require one of the deleted TCRBV genes (Nanda *et al.*, 1991). Up to now a complete deletion of an entire V gene family has not been observed in humans. However, two independent insertion/deletion related polymorphisms (Seboun *et al.*, 1989; Robinson *et al.*, 1993) and null alleles have been identified (Malhorta *et al.*, 1992; Barron *et al.*, 1995). In mice it has been reported that various V genes were skewed towards the CD4 or CD8 subsets (Utsunomyia *et al.*, 1989; Liao *et al.*, 1990). As humans are an outbred population a potential skewing is hard to investigate. Our study is an attempt to define the normal, functional TCR repertoire in humans and delineate the genetic and environmental factors that influence the repertoire. When we compared the TCRBV distribution in the unfractionated PBMCs of two HLA-unrelated individuals, wide variations in the usage of different BV gene segments were seen. The T-cell repertoires show vast differences among individuals, the most dramatic being seen among unrelated individuals, followed by siblings and monozygotic twins (Malhorta *et al.*, 1992). When the TCR repertoire was analyzed in pairs of monozygotic twins, no significant differences were observed in the BV repertoire of the CD4⁺ T cells subset. In contrast, differences were noted for BV

expression within the CD8 subset. The differences in the TCR profiles that were observed within a pair of twins can potentially be inferred to lifelong antigenic challenge resulting in a continuous reshaping of the repertoire. The overall patterns of gene usage frequency and skewing to the CD4 and CD8 subsets were similar within a pair of twins versus when we compared unrelated individuals. However, the TCRBV repertoire of monozygotic twins remained stable during one year even after taking into account that environmental antigens and post-thymic modulations such as mitogens, might have influenced the T-cell receptor repertoire. The V region expression to either CD4 or CD8 has been shown in mice and more recently in humans (Davey *et al.*, 1991; Hawes *et al.*, 1993). Within the CD4⁺ and CD8⁺ T cells, we found significant skewing of the usage of several AVs (AV7, AV22) and the BV6 gene families in either of the subsets, apparently independent of HLA haplotypes. Our findings are consistent with other reports on the skewing of BV6, 7, and 22 (Akolkar *et al.*, 1993; Hawes *et al.*, 1993). Some BVs seem to be positively selected predominantly by HLA class II gene products whereas other BVs were positively selected predominantly by HLA class I gene products. We observed a discrepancy between the CD4 and CD8 distribution data obtained by using V segment-specific mAbs, 3D11, MH3-2 and C1 specific for BV5 and BV17 respectively, and the qPCR. Our data with qPCR fail to show a high expression of either BV5 or BV17 in the CD4⁺ or CD8⁺ populations. Maybe the reactivity of the BV specific mAbs is dependent upon which AV chain is paired with the BV chain. Some AV-BV TCR combinations can preferentially be detected by the mAb and there could be a high or low expression in either CD4 or CD8 populations. It was shown that CDR3 and AV elements can affect the reactivity of a BV-specific mAb (Kanagawa *et al.*, 1991). The fact that some skewing seen with qPCR were not seen by flow cytometry can be due to the lack of mAbs but also because mAbs might recognize only one member of the V gene family and oligonucleotide PCR primers are designed to amplify all members of a family of V gene products.

The BV repertoire was more consistent between the twins than the AV repertoire. DerSimonian *et al.*, 1991 have shown that the AV chain plays a role in the recognition and binding of foreign antigens and the expression of the AV chain in the periphery could be more influenced by post-thymic modulations. In the monozygotic twins variations were also more seen in the CD8 compartment. The CD8⁺ T cells recognize peptides that are derived from cytosolic proteins generated by an endogenous pathway. These proteins are presented in the context of class I. In contrast the CD4⁺ T cells recognize peptides from extracellular and membrane proteins generated by the exogenous pathways in the context of class II. Taken together, we demonstrated that genetically identical individuals show similar TCR BV and AV expression profiles and therefore that the TCR repertoire generation underlies genetic influences. Once formed, TCR repertoires remain stable at least in the CD4 compartments.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant #RG-544/95M from the Human Frontier Foundation to RPS. RPS holds a MRC Scientists Award and CC is the recipient of a studentship from the National Health Research Development Program (NHRDP) of Canada. The authors are grateful to Dr. Ursula Utz for critical reading this manuscript.

REFERENCES

- Akolkar, P.N., Gulwani-Akolar, B., Pergolizzi, R., Bigler, R.D. & Silver, J. (1993), Influence of HLA genes on T cell receptor V segment frequencies and expression levels in peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, 150, 2761-2773.
- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D. & Mak, T.W. (1995), Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics*. 42, 455-500.
- Barron, K.S. & Robinson, M.A. (1994), The human T-cell receptor variable gene segment TCRBV6S1 has two null alleles. *Hum.Immunol.*, 40, 17-19.
- Choi, Y., Kotzin, L., Herron, J., Callahan, P., Marrack, P. & Kappler, J. (1989), Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, 8491-8945.
- Ciurli, C., Sékaly, R.-P. & Soudeyns, H. (1996), Study of the T cell receptor repertoire in viral immunodeficiency disease. *Springer Semin. Immunopathol.*, 17, 319-332.
- Davey, M.P., Meyer, M.M., Munkirs, D.D., Babcock, D., Braun, P.M., Hayden, J.B. & Bakke, A.C. (1991), T-cell receptor variable β genes show differential expression in CD4 and CD8 T cells. *Hum. Immunol.*, 32, 194-202.
- Davey, M.P., Meyer, M.M. & Bakke, A.C. (1994), T cell receptor V β gene expression in monozygotic twins. Discordance in CD8 subset and in disease states. *J. Immunol.*, 152, 315-321.
- DerSimonian, H., Band, H. & Brenner, M.B. (1991), Increased frequency of T cell receptor V α 12.1 expression on CD8⁺ T cells: evidence that V α participates in shaping the peripheral T cell repertoire. *J. Exp. Med.*, 174, 639-648.
- Grunewald, J., Janson, C.H. & Wigzell, H. (1991), Biased expression of individuals T cell receptor V gene segments in CD4⁺ and CD8⁺ human peripheral blood T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 21, 819-822.
- Gulwani-Akolkar, B., Posnett, D.N., Janson, C.H., Grunewald, J., Wigzell, H., Akolkar, P., Gregerson, P.K. & Silver, J. (1991), T cell receptor V-segment frequencies in peripheral blood T cells correlate with human leukocyte antigen type. *J. Exp. Med.*, 174, 1139-1146.

- Hawes, G.E., Struyk, L. & van den Elsen, J. (1993), Differential usage of T cell receptor V gene segments in CD4⁺ and CD8⁺ subsets of T lymphocytes in monozygotic twins. *J. Immunol.*, 150, 2033-2045.
- Kanagawa, O., Utsunomiya, Y., Bill, J., Palmer, E., Moore, M.W. & Carbone, F.R. (1991), Conformational difference of T cell antigen receptors revealed by monoclonal antibodies to mouse V β 5 T cell receptor for antigen determinants. *J. Immunol.*, 147, 1307-1314.
- Labrecque, N., McGrath, H., Subramanyam, M., Huber, B.T. & Sékaly, R.P. (1993), Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigens: V β restriction and conserved evolutionary features. *J. Exp. Med.*, 177, 1735-1743.
- Liao, N.-S., Maltzman, J. & Raulet, D.H. (1989), Positive selection determines T cell receptor V β 14 usage by CD8⁺ cells. *J. Exp. Med.*, 170, 135-143.
- Malhotra, U., Spielman, R. & Concannon, P. (1992), Variability in T cell receptor V β gene usage in human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, 149, 1802-1808.
- Matis, L.A. (1990), The molecular basis of T cell specificity. *Annu. Rev. Immunol.*, 8, 65-82.
- Nanda, N.K., Apple, R. & Sercarz, E. (1991), Limitations in plasticity of the T-cell receptor repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9503-9507.
- Oksenberg, J.R., Stuart, S., Begovich, A.B., Bell, R., Erlich, H.A., Steinman, L. & Bernard, C.C.A. (1990), Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V α transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature*, 345, 344-346.
- Posnett, D.N., Romagné, F., Necker, A., Kotzin, B.L. & Sékaly, R.-P. (1996), Summary: First human TCR monoclonal antibody workshop. *The Immunologist*, 4, 5-8.
- Rebai, N., Pantaleo, G., Demarest, J.F., Ciurli, C., Soudeyns, H., Adelsberger, J.W., Vaccarezza, M., Walker, R.E., Sékaly, R.-P. & Fauci, A.S. (1994), Analysis of the T-cell receptor β -chain variable-region (V β) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus: Evidence for perturbations of specific V β segments in CD4⁺ T cells of the virus-positive twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 1529-1533.
- Robinson, M.A., Mitchell, M.P., Wei, S., Day, C.E., Zhao, T.M., & Concannon, P. (1993), Organization of human T cell receptor beta-chains genes: clusters of V beta genes are present on chromosomes 7 and 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 2433-2437.

- Rowen, L., Koop, B.F. & Hood, L. (1996), The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science*, 272, 1755-1762.
- Seboun, E., Robinson, M.A., Kindt & Hauser, S.L. (1989), Insertion/deletion-related polymorphisms in the human T-cell receptor beta gene complex. *J. Exp. Med.*, 170, 1263-1271.
- Toyonaga, B. & Mak, T.W. (1987), Genes of the T cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 5, 585-620.
- Toyonaga, B., Yoshikai, Y., Vadasz, V., Chin, B. & Mak, T.W. (1985), Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8624-8628.
- Utsunomiya, Y., Bill, J., Palmer, E., Gollob, K., Takagaki, Y. & Kanagawa, O. (1989), Analysis of a monoclonal rat antibody directed to the α -chain variable region ($V\alpha 3$) of the mouse T cell antigen receptor. *J. Immunol.*, 143, 2602-2608.
- Vacchio, M.S. & Hodes, R.J. (1989), Selective decreases in T cell receptor $V\beta$ expression: decreased expression of multiple MHC and non-MHC gene products. *J. Exp. Med.*, 170, 1335-1346.
- Wei, S., Charmley, P., Robinson, M.A. & Concannon, P. (1994), The extent of the human germ-line receptor $V\beta$ gene segment repertoire. *Immunogenetics*, 40, 27-36.
- Wilson, R.K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R.K. & Good, L.E., (1988), Structure, organization and polymorphism of murine and human T cell receptor α and β gene families. *Immunol. Rev.*, 101, 149-172.
- Wucherpfenig, K., Ota, K., Endo, N., Swidan, J.G., Rosenzweig, A., Weiner, H.L. & Hafler, D.A. (1990), Shared human T cell receptor $V\beta$ usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science*, 248, 1016-1018.

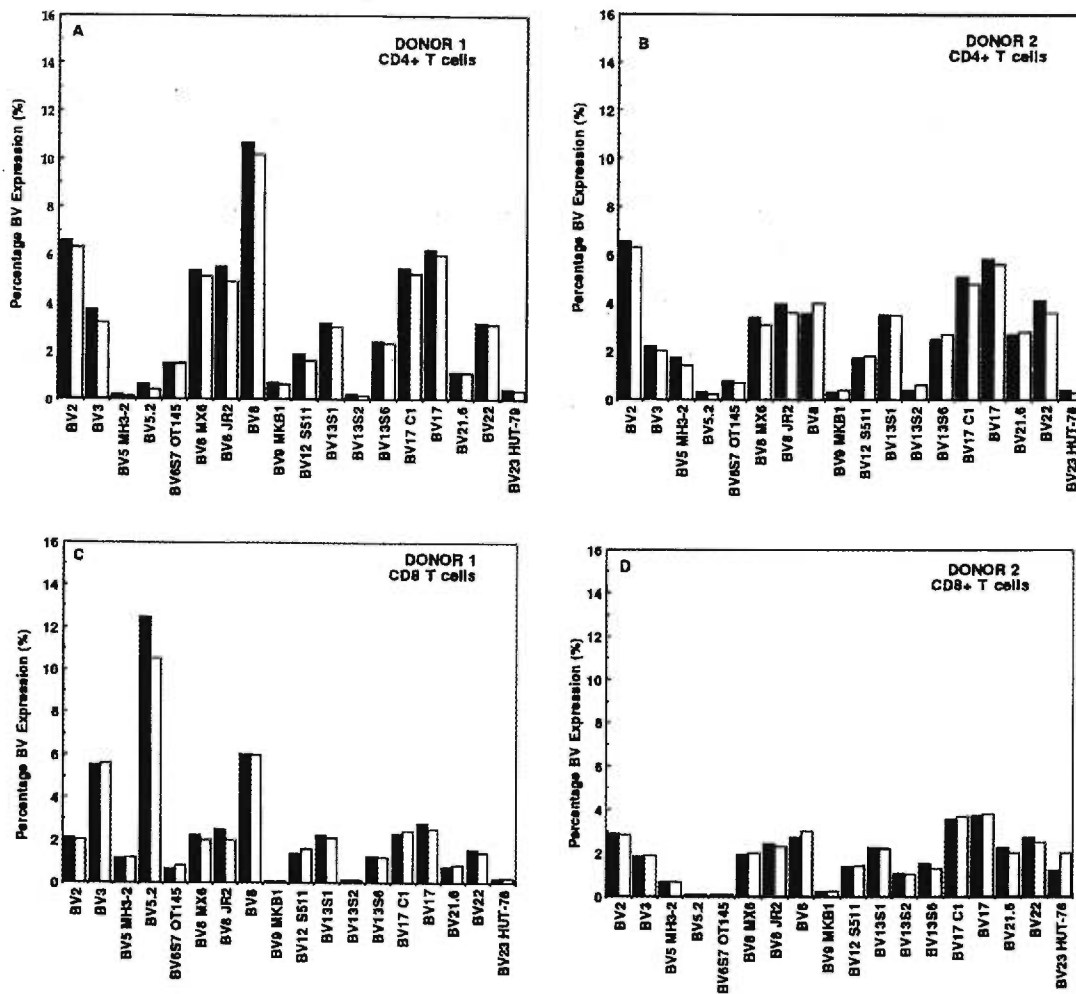


Figure 1. Flow cytometry analysis of the TCRBV repertoire: Percentage of BV CD4⁺ T cells in two healthy, unrelated non-HLA matched individuals (Panel A and B); percentage of BV CD8⁺ T cells (Panel C and D). Solid bars represent the initial BV repertoire, open bars represent the BV repertoire of the same donor 6 months later.

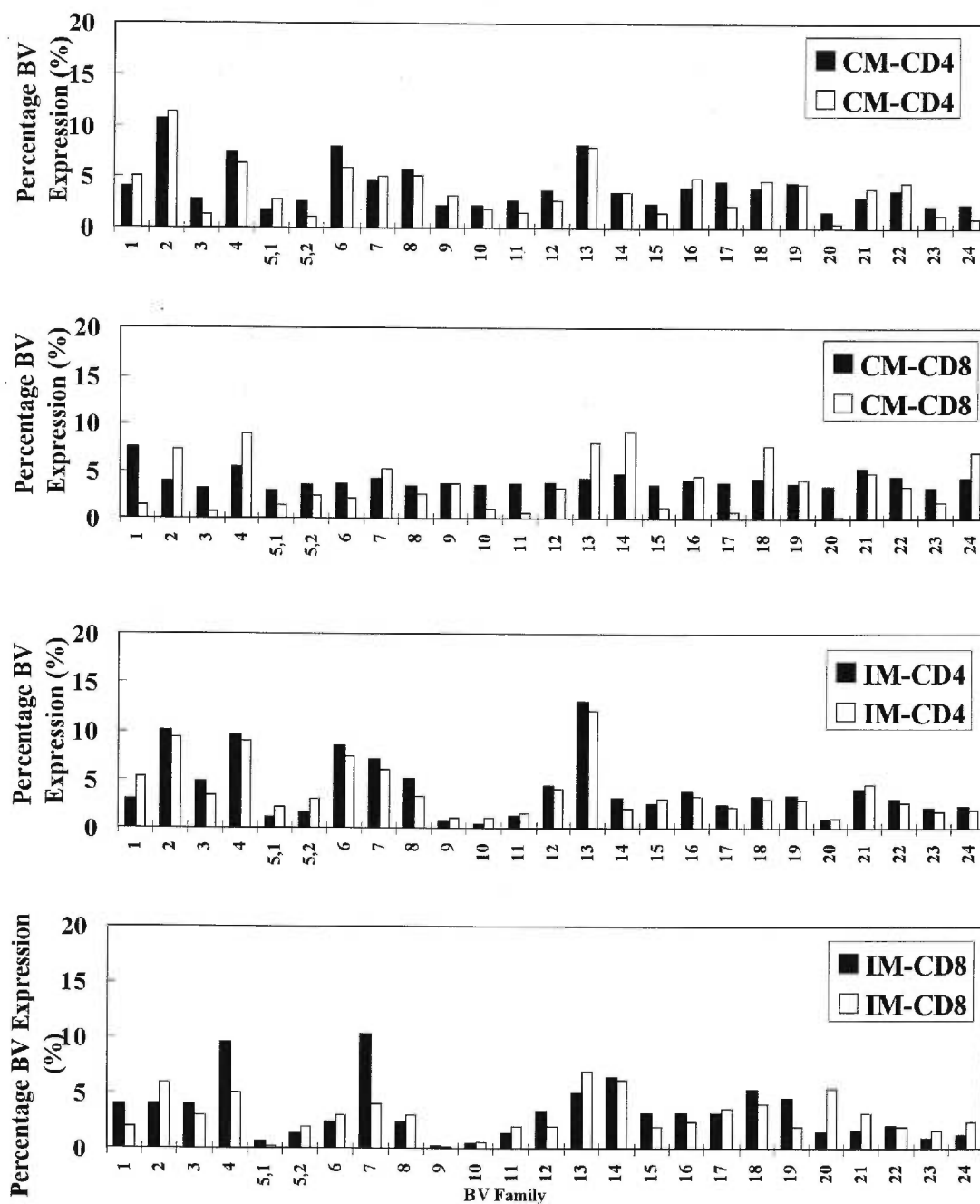


Figure 2. Quantitative PCR analysis of the TCRBV repertoire in a pair of monozygotic twins (CM-IM). Percentage of BV expression in CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells from CM-IM. Solid bars represent the initial BV repertoire, open bars represent BV repertoire of the same donor 1 year later.

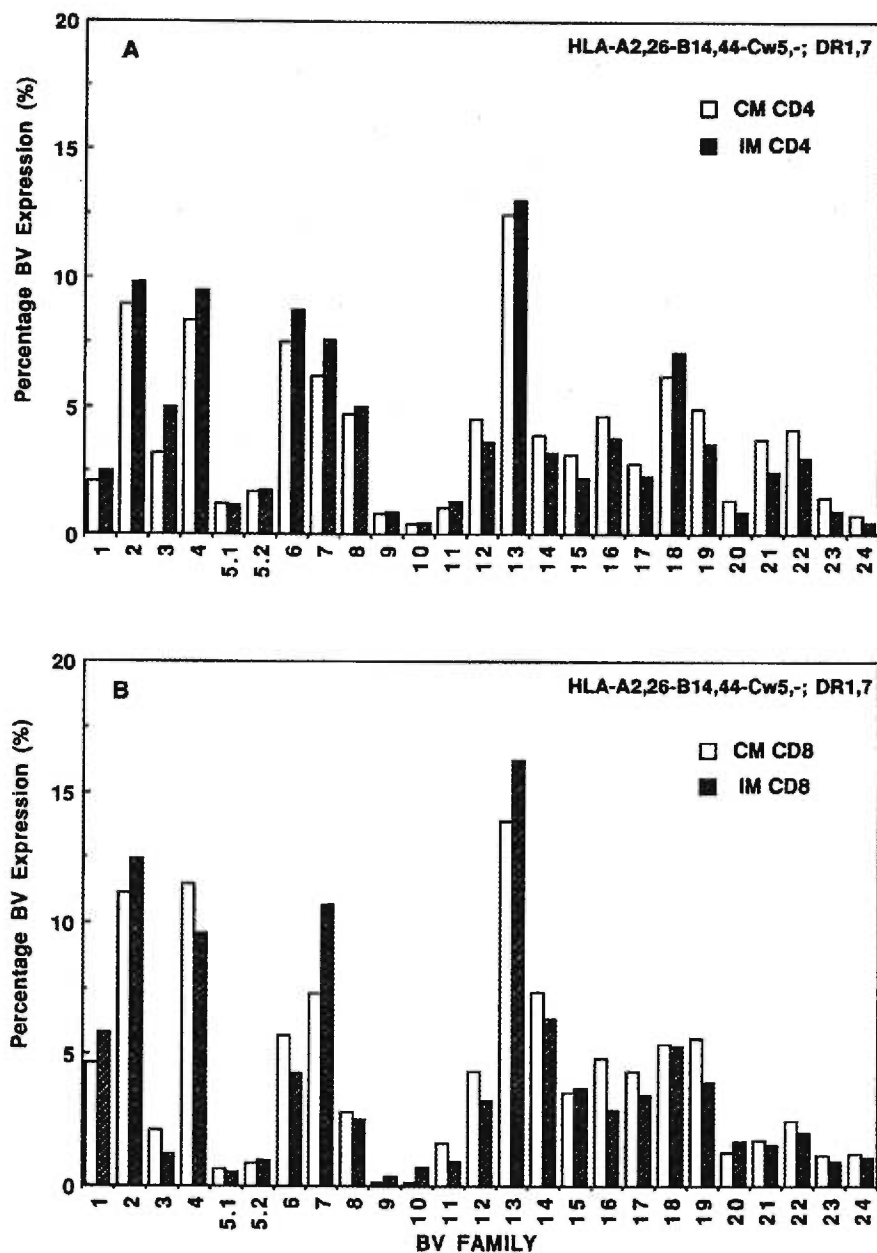


Figure 3. The complete TCRBV region usage patterns in sorted CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T lymphocyte subsets of monozygotic twins CM-IM determined by quantitative PCR. The signal intensity for each BV obtained by volume integration was normalized against the α -chain internal control and the relative percentage of BV expression was calculated by dividing the individual normalized values by the sum of all normalized values.

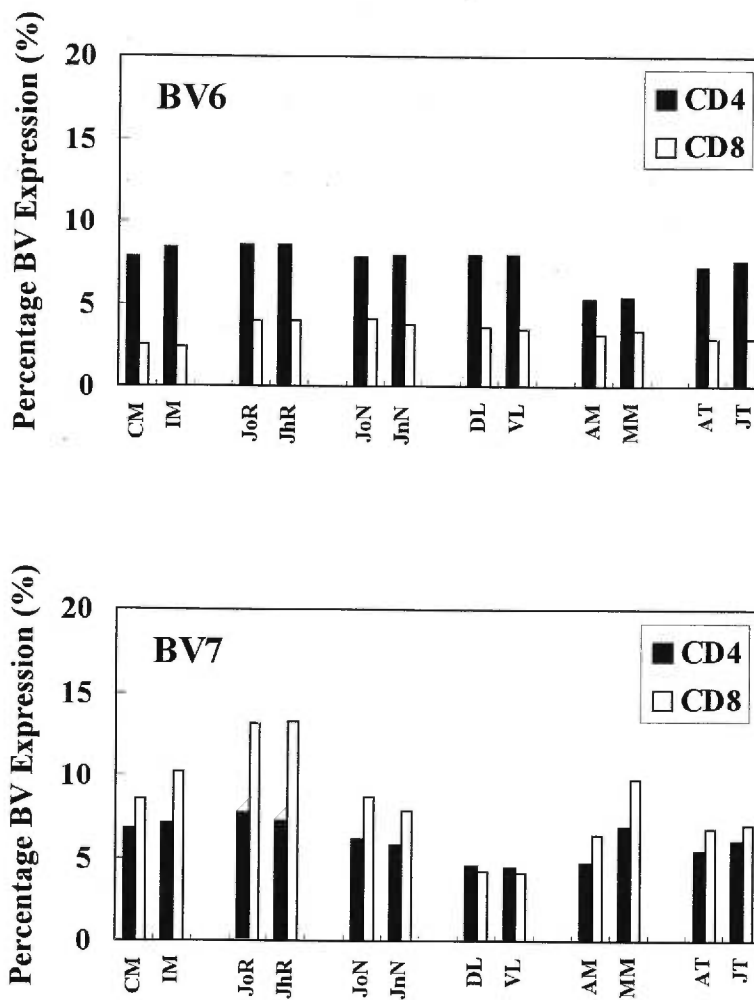


Figure 4. Skewing patterns of the TCRBV6, 7 region genes of the BV CD4⁺ and CD8⁺ subsets within 6 pairs of monozygotic twins. The relative skewing of the V gene usage between the subsets is very conserved within both individuals of a twin pair.

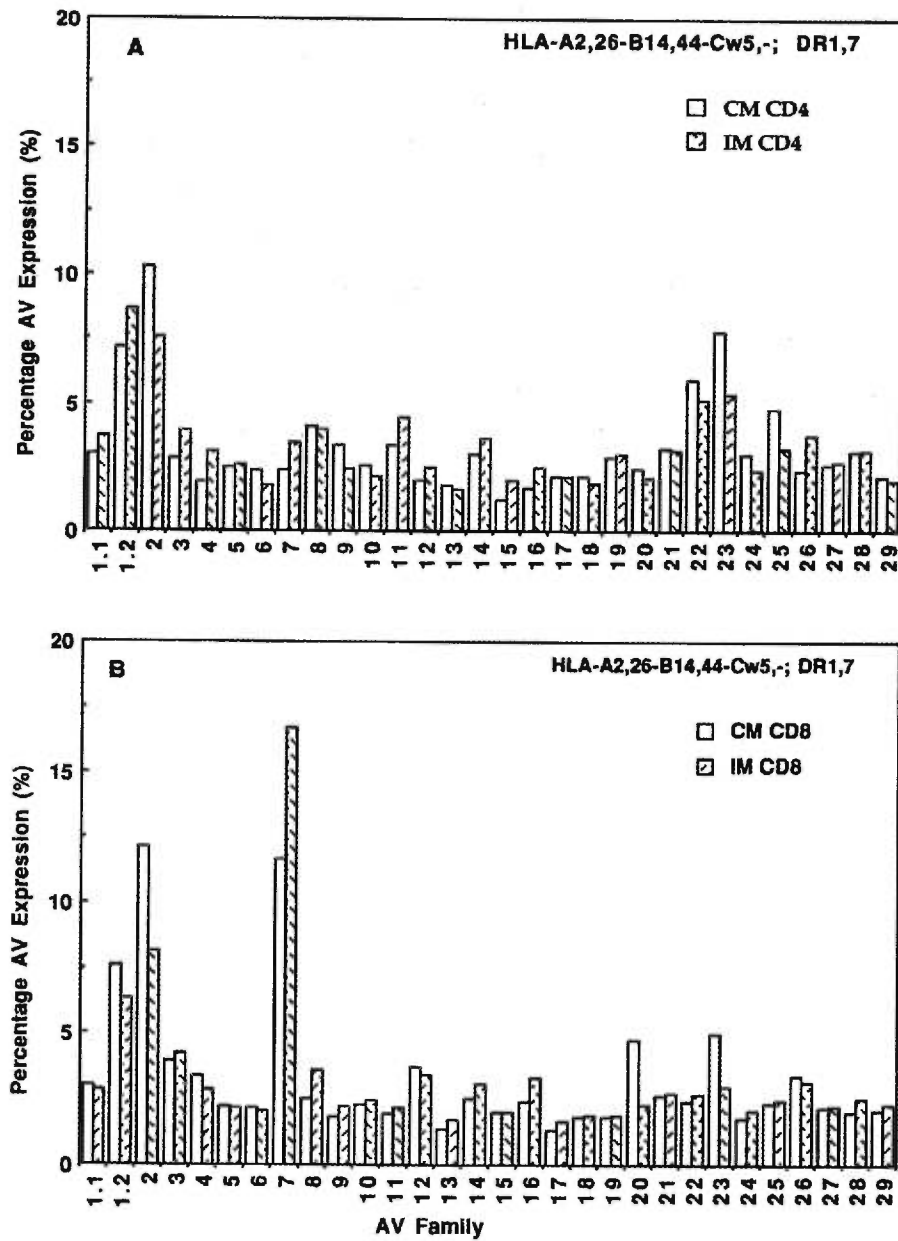


Figure 5. The complete TCRAV region usage patterns in sorted CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T lymphocyte subsets of monozygotic twins CM-IM detected by quantitative PCR.

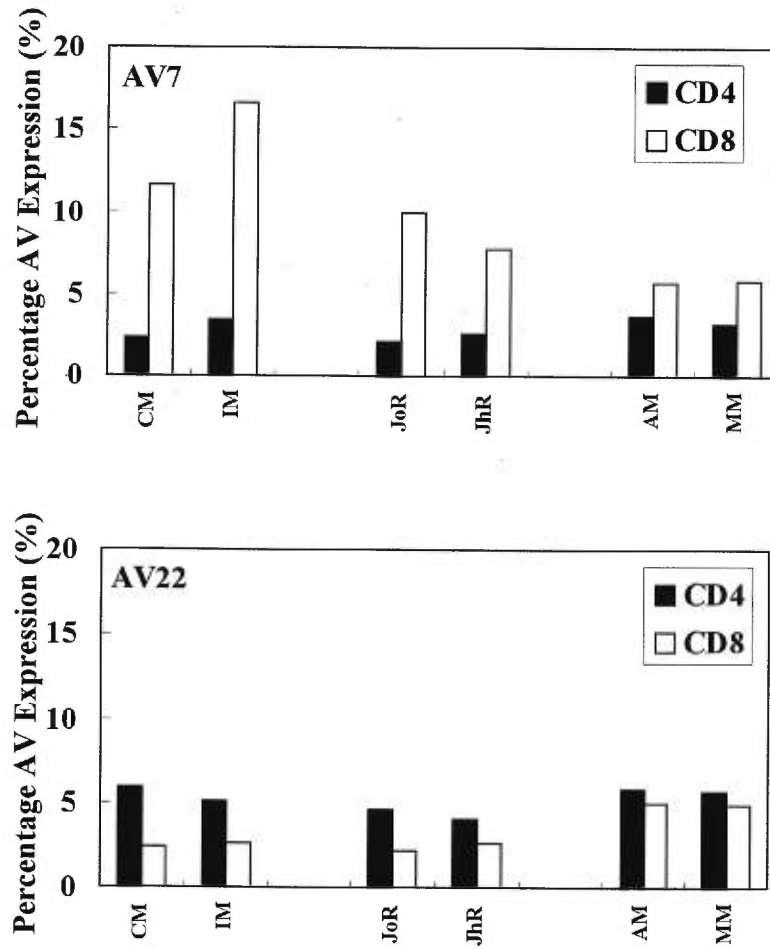


Figure 6. Skewing patterns of the TCRAV7, 22 region genes of the CD4 and CD8 subsets within three pairs of monozygotic twins.

Table I. HLA types of the monozygotic twins studied.

Twin Pairs	Sex	HLA			
AT/JT	Male	-A2,3	-B8,51	-Cw7,-	-DR1,w11
AM/MM	Female	-A24,25	-B18,38	-Cw17,-	-DR4,w11
CM/IM	Female	-A2,26	-B14,44	-Cw5,-	-DR1,7
JhR/JoR	Female	-A1,3	-B8,35	-Cw4,-	-DR1,7
JsN/JoN	Female	-A2,29	-B7,60	-Cw3,-	-DR1,7
VI/DL	Female	-A1, (30/31)	-B8,57	-Cw6,-	-DR7,w11

Table II. Cytofluorometric analysis of four pairs of monozygotic twins

Twin Pairs	BV5 (3D11)		BV5 (MH3-2)		BV6.7 (OT-145)		BV8 (MX6)		BV8 (JR2)		BV9 (MKB1)		BV12 (S511)		BV17 (CI)		BV23 (HUT-78)	
	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
CM	5.05	5.5	6.19	5.7	8.06	5.2	6.89	6.68	3.35	1.9	5.55	4.3	3.88	7	8.99	10	2.5	6.98
IM	7.7	8.3	5.6	2.96	10.7	4.6	9.4	10.4	3.32	3.3	5.1	6.0	3.9	11.3	9.18	20.2	1.71	7.8
AT	ND	ND	7.94	1.67	13.3	3.9	5.71	5.66	3.89	3.32	3.34	0.54	7.46	2.07	3.35	7.09	1.68	3.88
JT	ND	ND	8.78	1.2	11.9	3.59	5.35	5.81	4.12	4.69	3.11	0.68	6.57	1.33	3.65	7.37	0.84	4.96
AM	6.18	10.6	3.28	3.79	10.4	6.8	9.48	8.08	6.34	5.65	ND	ND	10.5	6.9	4.79	13.2	1.45	4.52
MM	6.5	2.3	3.5	2.3	8.6	4.59	8.7	8.15	7.3	6.2	ND	ND	8.7	8.7	5.1	12.6	1.03	4.18
DL	1.19	1.23	0.88	0.55	10.7	3.4	4.46	4.66	1.95	2.24	5.62	6.88	1.81	2.58	5.93	8.28	1.44	5
VL	0.95	3.0	0.5	2.0	12.3	3.0	4.7	4.2	1.2	1.6	9.2	5.1	2.3	2.7	4.8	6.5	1.38	2.14

ND: Not done

CHAPITRE 3

ARTICLE 2 : Analysis of the T-cell receptor β -chain variable-region (V β) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus : Evidence for perturbations of specific V β segments in CD4⁺ T cells of the virus-positive twins.

Analysis of the T-cell receptor β -chain variable-region (V_{β}) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus: Evidence for perturbations of specific V_{β} segments in $CD4^{+}$ T cells of the virus-positive twins

NAGET REBAL*, GIUSEPPE PANTALEO†, JAMES F. DEMAREST†, CRISTINA CIURLI*‡, HUGO SOUDEYNS*§, JOSEPH W. ADELSBERGER¶, MAURO VACCAREZZA†, ROBERT E. WALKER†, RAFICK P. SEKALY*†§, AND ANTHONY S. FAUCI†

*Laboratory of Immunoregulation, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; †Program Resources, Inc./Dyncorp, Frederick, MD 21702; ‡Laboratory of Immunology, Institut de Recherches Cliniques de Montreal, Montreal, PQ Canada; §Department de Microbiologie et d'Immunologie, Université de Montreal, Montreal, PQ Canada; and ¶Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, PQ Canada

Contributed by Anthony S. Fauci, October 20, 1993

ABSTRACT We analyzed the T-cell receptor (TCR) V_{β} repertoire in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals at different stages of disease. To circumvent the effect of HLA and other loci on the expressed TCR repertoire, we compared the TCR repertoire in nine pairs of monozygotic twins who were discordant for HIV infection. A semiquantitative polymerase chain reaction (PCR) assay and flow cytometry enabled us to show distinct differences in the V_{β} repertoire in the HIV-positive twin compared with the HIV-negative twin. By combining PCR and cytofluorometry, these differences were restricted to a specific set of TCR V_{β} segments, with members of the $V_{\beta}13$ family perturbed in six out of seven cases and those of the $V_{\beta}21$ family perturbed in four out of seven cases studied. Most of the other V_{β} families remained unchanged. Our results provide direct evidence for a skewed TCR repertoire in HIV infection.

Human immunodeficiency virus (HIV) results in a state of severe immune dysfunction particularly involving $CD4^{+}$ T cells (1). Several mechanisms, such as direct cytopathic effect of the virus on $CD4^{+}$ T cells, syncytium formation (2, 3), bystander killing (4), autoimmune reactions (5), and apoptosis (6), have been proposed without formal proof to explain the progressive dysfunction of $CD4^{+}$ T cells *in vivo*. Recently, a group of microbial antigens termed superantigens that are capable of binding to essentially all T cells that bear a specific V_{β} region of the T-cell receptor (TCR) have been described (7–10). Furthermore, retrovirally encoded superantigens (11–13) have been shown in an *in vivo* mouse model to induce stimulation (14, 15), anergy (16, 17), and deletion (18–23) of $CD4^{+}$ T cells bearing specific V_{β} regions. All these observations have led to the speculation that HIV could encode a superantigen responsible for the deletion of $CD4^{+}$ T cells expressing certain V_{β} gene segments (24).

It was first suggested by polymerase chain reaction (PCR) that a large number of TCR V_{β} segments were deleted in patients with very low $CD4^{+}$ T-cell counts (25). Another report indicated that a different set of V_{β} segments—namely, $V_{\beta}3$ and $V_{\beta}20$ —were affected in $CD4^{+}$ T cells from HIV-infected patients (26). However, flow cytometric analysis of the TCR repertoire in large numbers of HIV-infected patients failed to reveal any preferential deletion of V_{β} subsets (27). More recently, PCR analysis of the TCR repertoire in rhesus macaques infected with simian immunodeficiency virus (SIV) also did not show any V_{β} -specific alteration during the

course of infection (28). Furthermore, the presence of an increased viral load in cells expressing specific TCR V_{β} segments (29) was put forward as an argument to favor the presence of a superantigen in HIV infection.

In the present study, we have analyzed the TCR repertoire in several pairs of monozygotic twins who are discordant for HIV infection. Two independent assays were used in these studies, a semiquantitative PCR assay and a flow cytometric assay with a panel of monoclonal antibodies (mAbs) specific for different TCR V_{β} segments. We show that while the expression of the majority of the V_{β} segments was identical within each pair of twins, the expression of certain V_{β} segments was perturbed, thus indicating that TCR repertoires in the HIV-infected twins are skewed. Our results favor the possibility that superantigens encoded by HIV or other pathogens occurring during HIV infection can modulate the TCR repertoire in a V_{β} -specific fashion.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Nine pairs of monozygotic twins in which one member of each pair was HIV-infected were studied. The HIV-1-seropositive individuals had $CD4^{+}$ T-cell counts ranging between 54 and 644 per microliter. Both HIV-1⁺ and HIV-1⁻ twins were subjected to leukapheresis.

Antibodies. mAbs against the human TCR β chain used in this study were kindly provided by AMAC (Westbrook, ME; $V_{\beta}2$, $V_{\beta}3$, $V_{\beta}13.3$, $V_{\beta}17$, $V_{\beta}19$, and $V_{\beta}21$) and T-Cell Sciences [Cambridge, MA; $V_{\beta}5a$ ($V_{\beta}5.1$), $V_{\beta}6.7a$, $V_{\beta}8$ ($V_{\beta}8.1$ and -8.2), and $V_{\beta}12.2$], HUT78 ($V_{\beta}1$), MX6 ($V_{\beta}8.1$, -8.2 , and -8.3), MKB-1 ($V_{\beta}9$), BAM13 ($V_{\beta}13$), $V_{\beta}13.1$, and $V_{\beta}13.2$ were derived as described (30–32). $V_{\beta}22$ mAb was a generous gift of O. Kanagawa (Department of Pathology and Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis).

Flow Cytofluorometry. Cytofluorometric analysis was performed as described (33). Briefly, total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were analyzed using two-color cytofluorometry on an EPICS Profile (Coulter) or on a FACScan (Becton Dickinson). Cells were stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated and phycoerythrin-conjugated mAbs. Control aliquots were stained with fluorescein isothiocyanate- or phycoerythrin-conjugated mouse IgG1 or IgG2. Five thousand to 10,000 events were accumulated and analyzed for fluorescence in each experiment.

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

Abbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; TCR, T-cell receptor; mAb, monoclonal antibody; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

Separation of CD4⁺ Cells. Separation of peripheral blood CD4⁺ cells was performed by using MicroCELLector T-25 cell culture flasks (Applied Immune Sciences, Santa Clara, CA). Positive selection of CD4⁺ T cells was performed by following the instructions provided by the manufacturer. After the positive selection, the cell population isolated contained 70–80% CD4⁺ T cells but <5% CD8⁺ T cells.

PCR Analysis of the Expressed V_β Repertoire. This procedure has been described in detail (30). Briefly, total RNA extracted from unfractionated and CD4⁺ T cells was used to synthesize first-strand cDNA by adding random hexamer oligonucleotides and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Sciences, St. Petersburg, FL). The cDNA preparation was precipitated and used for PCR V_β analysis. The various V_β segments were amplified by using a 5'-specific V_β primer and a common 3' constant-region (C_β) primer. Both 5' and 3' C_β primers were included in each PCR as internal controls. The 3' C_β and 3' C_α primer were radiolabeled with [³²P]ATP. Primer sequences of the TCR V_β-specific oligonucleotides and of the control C_β and C_α oligonucleotides have been reported (30). Amplification was performed for 25 cycles in a GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer). Half the volume of each PCR mixture was loaded for electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel containing 7 M urea. Gels were exposed overnight on Kodak storable phosphor screens. Quantitation of the radioactive signal for each V_β was carried out with a PhosphorImager driven by the IMAGE-QUANT software package (Molecular Dynamics).

RESULTS AND DISCUSSION

Genetic Factors Influence the TCR Repertoire. Several reports have suggested the presence of elements in pathogens, such as HIV, which can shape the TCR repertoire and have an impact on disease progression (25, 29, 34–36). Most of these studies have relied on analysis of the TCR repertoire in unrelated individuals, using a variety of experimental approaches such as PCR analysis and cytofluorometry. Previous observations showing that the HLA complex may significantly alter the expression of the αβ TCR repertoire make it difficult to assess the role of a putative pathogen in modulating the TCR repertoire

(37). For these reasons, we have further investigated the influence of the HLA complex on the TCR repertoire by combining a semiquantitative PCR assay using a panel of V_β oligonucleotide primers which encompass all 24 known V_β families and cytofluorometry using 16 V_β-specific mAbs which recognize about 50% of the V_β repertoire. The distribution of TCR V_β expression in HLA-mismatched individuals and in healthy monozygotic twins was determined. Preliminary experiments showed that the variability in each independent PCR did not exceed 10–15% (30). Therefore, differences which exceeded 3 standard deviations (40–45%) in the relative proportion of each V_β between each pair of individuals analyzed were considered significant. Fig. 1A compares the TCR V_β distribution in the unfractionated PBMCs of two HLA-unrelated individuals. Several V_β segments were seen to be expressed at different levels (10 out of 25) when these two individuals were compared, confirming previous reports (37, 38). In contrast, when the TCR repertoire was analyzed in a pair of healthy HIV-seronegative monozygotic twins, no significant differences were observed in the V_β repertoire (Fig. 1B). A different distribution of V_β expression in the two major functional subsets of T cells has been previously reported (39). In our analysis we confirmed a different V_β expression in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from the same individuals (7 of 25 V_β segments were expressed differentially) (Fig. 1C). In contrast, no significant differences were observed in the V_β repertoire in CD4⁺ T cells derived from two healthy monozygotic twins (Fig. 1D).

Flow cytometric analysis of the TCR repertoire in CD4⁺ T cells from HLA-matched and -mismatched individuals confirmed the results obtained by PCR. Indeed, several differences were found in a comparative analysis of a large number of V_β segments in CD4⁺ T cells from HLA-mismatched healthy individuals (Fig. 2A) and in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets from the same individuals (Fig. 2C and D). In contrast, the V_β repertoire was almost identical in CD4⁺ cells from a pair of monozygotic twins (Fig. 2B). Taken together, these results confirm and further establish the importance of HLA matching in the analysis of the TCR repertoire in normal and pathological conditions, particularly when specific lymphoid compartments such as peripheral blood are compared among different individuals.

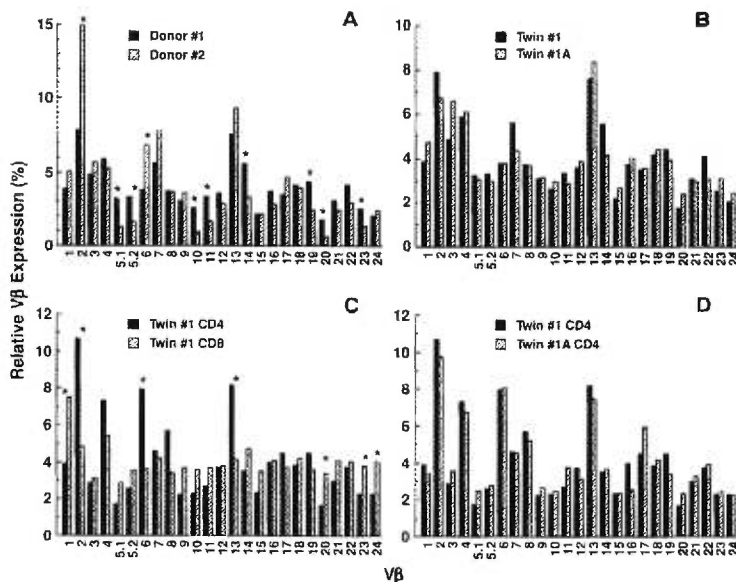


FIG. 1. Comparative PCR analysis of the relative expression of V_β families in healthy HIV⁻ HLA-mismatched donors and monozygotic twins. The relative percentage of each V_β was calculated by dividing the sum of raw PCR values (the raw PCR value is represented by the numerical value of the V_β/C_β ratio × 100) for each V_β/C_β combination. (A) Relative V_β expression in unfractionated PBMCs from two HLA mismatched donors. (B) Relative V_β expression in unfractionated PBMCs from two monozygotic twins. (C) Relative V_β expression in sorted CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets isolated from the same individual. (D) Relative V_β expression in sorted CD4⁺ T-cell subsets isolated from two monozygotic twins. Asterisks indicate differences in V_β expression exceeding 40%.

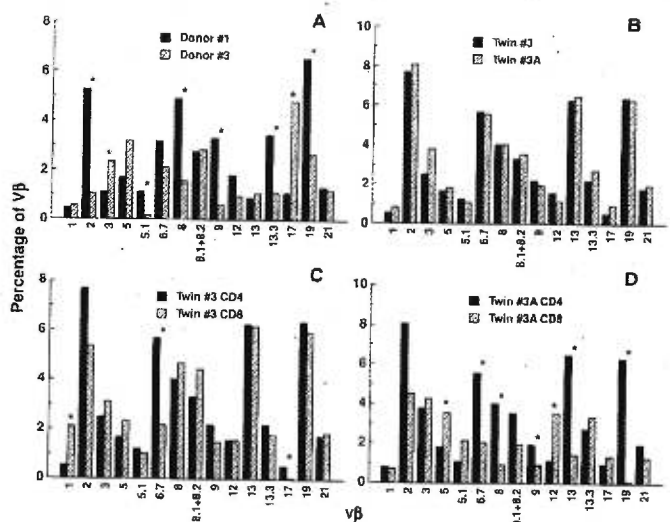


FIG. 2. Cytofluorometric analysis of V_{β} expression in $CD4^{+}$ cells in HIV $^{-}$, HLA-mismatched donors and monozygotic twins. (A) Comparative analysis of V_{β} expression in $CD4^{+}$ cells in HLA mismatched donors. (B) V_{β} expression in $CD4^{+}$ cells from two monozygotic twins. (C and D) V_{β} expression in $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ cells from the same individuals.

Analysis of the TCR Repertoire in the HIV-Infected Monozygotic Twins. Data on the influence of HIV infection in modulating the TCR repertoire have been conflicting (25–28, 40). However, the studies performed in humans have been carried out on HLA-mismatched HIV-infected individuals (25–27). As discussed above, HLA exerts a major role in shaping the TCR repertoire (37) (Figs. 1 and 2), thus rendering the interpretation of these results difficult.

To circumvent this problem we analyzed the expressed V_{β} repertoire in $CD4^{+}$ T cells from nine pairs of monozygotic twins who were discordant for HIV infection. The PCR assay was first used to determine whether there were significant differences in the TCR repertoire of HIV-discordant monozy-

gotic twins. Comparative analysis of the V_{β} repertoire of $CD4^{+}$ T cells within each pair of twins showed that the relative proportion of the majority of V_{β} segments remained unchanged (Table 1). Comparisons of the V_{β} segments that were perturbed in the different pairs of twins indicated that a limited subset of distinct V_{β} segments were involved in these perturbations, such as $V_{\beta}2$, -3, -4, -6, and -13 in the six pairs of twins studied by PCR. Thus, the results obtained by PCR show very little differences between the TCR repertoire of infected and uninfected twins.

The PCR primers used in this study were designed to detect all the members of a V_{β} family; therefore, it is possible that differences in expression of members within a V_{β} family could

Table 1. TCR V_{β} usage in $CD4^{+}$ T cells of discordant HIV-1-infected monozygotic twins

V_{β}	Pair 1		Pair 2		Pair 3		Pair 4		Pair 5		Pair 6	
	HIV $^{-}$	HIV $^{+}$	HIV $^{-}$	HIV $^{+}$	HIV $^{-}$	HIV $^{+}$	HIV $^{-}$	HIV $^{+}$	HIV $^{-}$	HIV $^{+}$	HIV $^{-}$	HIV $^{+}$
1	3.40	2.92	3.51	3.02	3.85	5.20	2.96	3.39	3.21	4.89	2.54	2.60
2	5.79	9.57	7.45	10.70	11.30	15.93	6.20	4.71	7.99	4.81	4.11	4.59
3	6.12	5.63	10.50	3.87	5.13	6.42	2.47	2.95	2.94	3.20	2.57	2.56
4	4.81	3.90	6.18	9.23	13.80	7.93	5.17	6.86	6.92	4.47	5.00	4.18
5.1	0.58	0.42	3.30	1.16	0.98	0.79	3.48	3.72	1.98	3.22	3.29	2.70
5.2	2.56	1.99	3.30	1.26	1.11	0.85	3.64	4.05	3.79	4.40	3.81	3.57
6	5.60	4.90	4.25	4.73	4.35	4.30	4.09	3.73	6.85	3.01	6.94	5.87
7	2.03	2.48	4.61	5.15	4.74	4.61	3.64	4.37	4.76	3.89	4.05	4.18
8	5.52	6.93	3.61	3.89	3.83	—	4.00	3.93	3.45	4.24	2.99	3.56
9	2.29	2.31	5.28	3.65	2.25	2.11	4.18	5.02	2.56	4.08	3.33	3.24
10	1.05	0.90	2.45	1.15	0.91	0.67	3.75	4.74	3.81	4.67	2.69	2.88
11	2.52	2.15	2.73	1.39	1.26	1.34	3.14	4.16	3.80	4.91	2.38	2.72
12	6.55	7.11	5.16	6.76	6.39	5.56	5.11	5.23	6.75	6.80	4.12	4.37
13	9.53	10.30	4.69	11.07	6.44	7.93	4.09	3.67	4.60	5.01	—	—
14	4.29	4.41	3.46	2.71	3.54	3.02	4.49	3.69	4.49	5.07	2.93	3.34
15	2.69	2.11	2.47	2.45	2.41	2.70	3.57	2.61	2.86	3.14	1.86	1.97
16	2.43	1.39	3.52	4.14	3.67	3.44	4.77	3.79	3.58	3.48	2.94	3.21
17	4.71	4.75	3.06	3.24	5.06	6.88	3.56	3.48	2.85	2.86	2.07	2.45
18	8.79	10.00	4.66	6.11	4.67	4.00	5.06	5.29	3.89	4.52	2.98	4.26
19	4.46	4.79	4.26	5.14	2.97	3.28	3.29	3.02	2.27	2.60	2.08	2.23
20	0.43	0.26	1.50	0.54	0.62	0.51	3.49	2.91	2.75	3.33	2.06	2.06
21	4.08	3.61	2.78	3.67	2.97	3.10	3.61	2.78	4.31	3.39	2.51	2.89
22	5.32	3.37	3.44	4.20	5.12	5.64	4.86	4.09	3.38	4.45	3.08	3.22
23	2.97	2.38	2.17	1.10	1.60	2.19	3.65	3.86	2.41	2.78	1.97	2.56
24	1.47	0.97	2.51	1.54	0.93	1.61	3.61	3.83	2.87	3.65	2.04	2.70

Relative V_{β} expression (%) was determined by PCR. Values in italic show significant differences between HIV $^{-}$ and HIV $^{+}$.

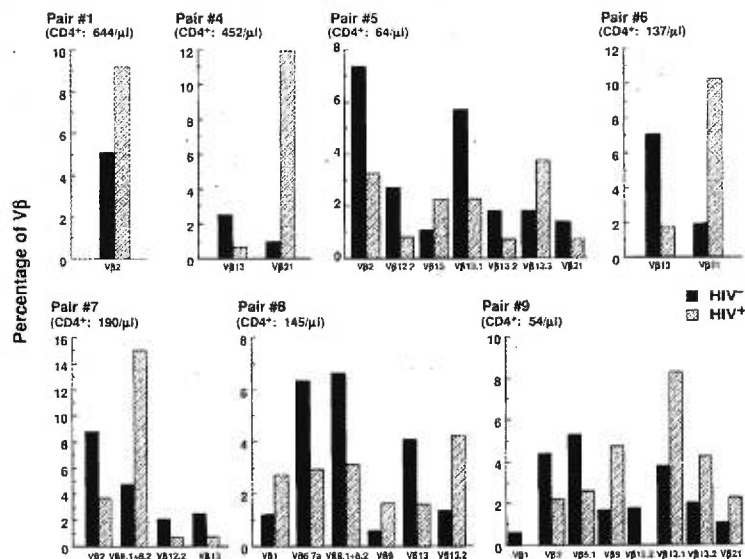


FIG. 3. Comparative analysis of V β expression in monozygotic twins discordant for HIV. The CD4⁺ cell counts refer to the HIV-1⁺ twin. Only those V β subsets that were perturbed are shown for each twin pair. Filled bars, HIV⁺; hatched bars, HIV⁻.

be masked by the expansion of other members of the same family and vice versa. Similar observations have been reported in SIV infection of rhesus monkeys (28). The use of mAbs that are specific for individual V β determinants enabled us to circumvent this problem. Fig. 3 shows that a limited set of distinct and overlapping V β determinants were involved in these perturbations in the CD4⁺ subset from the HIV-infected twin. Comparative analyses between HIV⁻ and HIV⁺ twins showed that the expression of members of the V β 13 family was found consistently to be perturbed in CD4⁺ cells from six of seven pairs tested. The V β 13 subset recognized by the BAM13 mAb (31) was reduced in three HIV-infected patients (nos. 4, 6, and 7), whereas it was increased 2-fold in patient 5. Other members of this family (V β 13.1, -13.2, and -13.3) were also significantly affected in patients 5, 8, and 9. Expression of V β 21 was perturbed in four of six pairs studied. Increases ranging between 2- to 8-fold of V β 21⁺ CD4⁺ T cells were noted in the HIV-infected twin as compared with the uninfected twin in three out of seven pairs tested (nos. 4, 6, and 9). Cells reacting with mAb to V β 12 (specific for V β 12.2) and mAb to V β 2 (which recognizes all the members of this family) were affected in three out of seven pairs included in this study. It is important to note that V β 13, V β 12, and V β 21 share strong homologies in the amino acid sequence of the TCR V β complementarity-determining region 4. This sequence has been shown to confer reactivity to superantigens (41, 42). It is also interesting that V β 12.2, which was suggested to confer preferential infection by HIV (29), was virtually deleted in one case (no. 9). Other V β segments such as V β 1, -3, -5.1, -6.7a, -8.1, -8.2, and -9 were perturbed in only one or two patients.

Overall, the number of V β segments perturbed was inversely correlated with the absolute count of CD4⁺ cells. The V β repertoire was greatly perturbed in four of five patients with CD4⁺ cell counts <200 per microliter (four to eight V β segments), whereas patients 1 and 4, who had higher CD4⁺ cell counts (>400 per microliter), had only one or two V β segments perturbed (Fig. 3). These results demonstrate increased perturbation of the TCR repertoire during the progression of the disease.

These results contrast somewhat with those previously reported concerning analysis of the TCR repertoire in HIV or SIV infection (25, 27, 28). We show that perturbations of the V β repertoire are present not only at late stages of disease, when the number of CD4⁺ T cells is markedly decreased, but also at intermediate stages of disease, when CD4⁺ T cells are only moderately decreased. In addition, deletion of a large number of V β segments was not observed in patients with late-stage disease as previously reported (25). This discrepancy could be attributed to the precise quantitation of the perturbations made possible by the design of the assay used in our experiments. A similar study using PCR in an animal model of SIV infection failed to show any significant differences in V β repertoire in infected rhesus monkeys during the progression of disease (28). As indicated in the present study, it is likely that perturbations in the TCR repertoire may not be identified by PCR assays, because oligonucleotide primers are generally designed to amplify all members of a TCR V β family. We have shown that perturbations in members of a V β family may be detected by cytofluorometry despite the failure of the PCR assay to demonstrate similar variations. In support of our results, the use of a mAb which recognizes all the members of the murine V β 8 family failed to detect significant perturbations of this family in mouse Mls-1-positive strains, whereas a mAb which recognizes specifically the Mls-reactive V β 8.1 showed significant reductions in the expression of this V β subset (43). Thus, it is possible that in the study by Hodara *et al.* (26) greater numbers of V β segments would have been shown to be perturbed by using reagents with more restricted V β specificity. Further, the difficulty in interpreting the conflicting results in the literature can also be attributed to the widespread use of patients which were not genetically matched (HLA or other polymorphic loci) with appropriate controls.

The present study clearly demonstrates the presence of a skewed TCR repertoire in HIV-infected individuals. Although we do not provide direct evidence for the presence of a superantigen, perturbations of cells expressing a restricted set of V β segments are reminiscent of alterations in the TCR repertoire associated with the effects of bacterial and retro-

viral superantigens. It is unlikely, however, that pathogens other than HIV could be the causative agent of the above-mentioned V_{β} perturbations, since only two of nine infected twins (HIV infected twins 5 and 9) had a history of opportunistic infections. The fact that distinct V_{β} segments are affected in the different HIV-infected patients analyzed in this study could be attributed to the high variability of a superantigen associated with HIV. Indeed, the primary structure of several HIV-encoded proteins has been shown to mutate over time and during the course of infection (44, 45). Most of the retroviral superantigens delete one to three V_{β} segments. Here we show that up to eight different V_{β} segments can be perturbed in these patients. While the large number of V_{β} segments could be due to modifications of an HIV-associated superantigenic structure, this effect could be caused by the presence of several isolates (hence distinct superantigens) in the same patient. The presence of multiple viral isolates, each encoding a superantigen with a distinct V_{β} specificity, could explain the profound effects observed on T-cell function. Some of these perturbations, however, may not necessarily reflect direct interaction of some of these V_{β} families with a superantigen. Rather, compensatory mechanisms may potentially cause the expansion of some V_{β} segments or reduction of others.

Studies performed in the murine system have shown that the presence of T cells expressing a TCR V_{β} which specifically recognizes a retroviral superantigen is critical for the propagation of disease (46, 47). The viral superantigen is critical, since it triggers T cells which become activated and produce factors (i.e., cytokines) that may enhance viral replication. A similar model could be applied to HIV, in which T-cell activation by an HIV-encoded superantigen favors the replication of HIV in other T cells or in macrophages.

In conclusion, this study demonstrates a skewed TCR repertoire in HIV-infected individuals. The perturbations of the V_{β} repertoire of CD4⁺ cells observed in HIV-infected individuals may be compatible with a superantigen effect. Studies aimed at determining the nature of the superantigen(s) should bring insights into its mechanisms of action and its contribution to the immunopathogenesis of HIV infection.

The first two authors contributed equally to this project. We thank M. Rust for preparation of the manuscript. We are grateful to A. Dju, F. Romagne, and A. Necker from Immunothèque (Marseille, France) and to Drs. J. Kappler, P. Marrack, O. Kanagawa, D. Posnett, and A. Krensky for their generosity in supplying us with the various V_{β} -specific mAbs. R.P.S. is a Scientist of the Medical Research Council of Canada. This work was funded by grants from the NHRDP AIDS program and the Medical Research Council of Canada. The flow cytometry facility of the Institut de Recherches Cliniques de Montreal receives a donation from the Glaxo Foundation. J.F.D.'s portion of this work was done in partial fulfillment of the Ph.D. requirements in the Graduate Genetics Program at the George Washington University (Washington, DC).

- Pantaleo, G., Graziosi, C. & Fauci, A. S. (1993) *N. Engl. J. Med.* **328**, 327-335.
- Litson, J. D., Feinberg, M. B., Reyes, G. R., Rabin, L., Banapour, B., Chakrabarti, S., Moss, B., Wong-Staal, F., Steimer, K. S. & Engleman, E. G. (1986) *Nature (London)* **323**, 725-728.
- Sodroski, J., Goh, W. C., Rosen, C., Campbell, K. & Haseltine, W. A. (1986) *Nature (London)* **322**, 470-474.
- Lanzavecchia, A., Roosnek, E., Gregory, T., Berman, P. & Abrignani, S. (1988) *Nature (London)* **334**, 530-532.
- Golding, H., Scheerer, G. M., Hillman, K., Lucas, P., Manischewitz, J., Zajac, R. A., Clerici, M., Gress, R. E., Boswell, R. N. & Golding, B. (1989) *J. Clin. Invest.* **83**, 1430-1435.
- Groux, H., Torpjer, G., Monte, D., Mouton, Y., Capron, A. & Ameisen, J. C. (1992) *J. Exp. Med.* **175**, 331-340.
- White, J., Herman, A., Pullen, A. M., Kubo, R., Kappler, J. W. & Marrack, P. (1989) *Cell* **56**, 27-35.
- Bekoff, M. C., Cole, B. C. & Grey, H. M. (1988) *J. Immunol.* **139**, 3189-3194.
- Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, F. W., Bigler, R. D., Boylston, A., Currel, S., Posnett, D. N., Choi, Y. & Marrack, P. (1989) *Science* **244**, 811-813.
- Fleischer, B. & Schreze, H. (1988) *J. Exp. Med.* **167**, 1697-1707.
- Kappler, J. W., Stuerz, U., White, J. & Marrack, P. C. (1988) *Nature (London)* **332**, 35-60.
- MacDonald, H. R., Schneider, R. & Lees, R. K. (1988) *Nature (London)* **332**, 40-45.
- Woodland, D., Happ, M. P., Bill, J. & Palmer, E. (1990) *Science* **247**, 964-967.
- Abe, R., Foo-Phillips, M. & Hodes, R. J. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 1059-1073.
- Bill, J., Kanagawa, O., Woodland, D. L. & Palmer, E. (1989) *J. Exp. Med.* **169**, 1405-1419.
- Rammensee, H.-G., Kroschewsky, R. & Frangoulis, B. (1989) *Nature (London)* **339**, 541-544.
- Webb, S., Morris, C. & Sprent, J. (1989) *Cell* **63**, 1249-1256.
- Marrack, P. C., Kushnir, E. & Kappler, J. W. (1991) *Nature (London)* **349**, 524-526.
- Frankel, W. N., Rudy, C., Coffin, J. M. & Huber, B. T. (1991) *Nature (London)* **349**, 524-526.
- Woodland, D. L., Happ, M. P., Gollob, K. A. & Palmer, E. (1991) *Nature (London)* **349**, 529-530.
- Dyson, P. J., Knight, A. M., Fairchild, S., Simpson, E. & Tomonari, K. (1991) *Nature (London)* **349**, 531-532.
- Choi, Y., Kappler, J. W. & Marrack, P. C. (1991) *Nature (London)* **350**, 203-207.
- Acha-Orbea, H., Shakhov, A. N., Scarpellino, L., Kolb, E., Müller, V., Vessaz-Shaw, A., Fuchs, R., Blöchlinger, K., Rollini, P., Billotte, J., Sarafidou, M., MacDonald, H. R. & Diggelmann, H. (1991) *Nature (London)* **350**, 207-211.
- Janeway, C. (1991) *News Views* **349**, 459-461.
- Imberti, L., Sotini, A., Bettinardi, A., Piroli, M. & Primi, D. (1991) *Science* **254**, 860-862.
- Hodara, V. L., Jeddli-Tehrani, M., Grunewald, J., Andersson, R., Scarlatti, G., Esin, S., Holmberg, V., Libonatti, O. & Wigzell, H. (1993) *AIDS* **7**, 633-638.
- Posnett, D. N., Kabak, S. K., Hodtsev, A. S., Goldberg, E. A. & Asch, A. (1992) *AIDS* **7**, 625-631.
- Wei Chen, Z., Kou, Z.-C., Shen, L., Reimann, K. A. & Letvin, N. L. (1993) *J. Immunol.* **151**, 2177-2187.
- Laurence, J., Hodtsev, A. S. & Posnett, D. N. (1992) *Nature (London)* **358**, 255-259.
- Labrecque, N., McGrath, M., Subramanyam, M., Huber, B. T. & Sekaly, R.-P. (1993) *J. Exp. Med.* **177**, 1735-1743.
- Devaux, B., Bjorkman, P. J., Stevenson, C., Greif, W., Ellint, J., Sagestrom, C., Clayberger, C., Krensky, A. M. & Davis, M. M. (1991) *Eur. J. Immunol.* **21**, 2111-2119.
- Choi, Y., Kotzin, B., Lafferty, K., White, J., Pigeon, M., Kubo, R., Kappler, J. W. & Marrack, P. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8357-8361.
- Pantaleo, G., Koenig, S., Baseler, M., Lane, H. C. & Fauci, A. S. (1990) *J. Immunol.* **144**, 1696-1704.
- Choi, Y., Lafferty, J., Clements, J., Todd, J., Gelfand, E., Kappler, J. W., Marrack, P. & Kotzin, B. (1990) *J. Exp. Med.* **172**, 981-984.
- Kotzin, B. L., Leung, D. Y. M., Kappler, J. & Marrack, P. (1993) *Adv. Immunol.* **54**, 99-166.
- Pallard, X., West, S. G., Lafferty, J. A., Clements, J. R., Kappler, J. W., Marrack, P. & Kotzin, B. L. (1991) *Science* **253**, 325-329.
- Gilwani-Akolkar, B., Posnett, D. N., Janson, C. H., Grunewald, J., Wigzell, H., Akolkar, P., Gregersen, P. K. & Silver, J. (1991) *J. Exp. Med.* **174**, 1139-1146.
- Choi, Y., Kotzin, B., Herron, L., Callahan, J., Marrack, P. & Kappler, J. W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8941-8945.
- Hawes, G. E., Struyk, L. & van den Elsen, P. J. (1993) *J. Immunol.* **150**, 2033-2045.
- Soudeyans, H., Rebai, N., Pantaleo, G. P., Ciarli, C., Boghossian, T., Sekaly, R.-P. & Fauci, A. S. (1993) *Semin. Immunol.* **5**, 175-185.
- Pullen, A. M., Wade, T., Marrack, P. & Kappler, J. W. (1990) *Cell* **61**, 1365-1374.
- Cazenave, P. A., Marche, P. N., Jonvin Marche, E., Vogtle, D., Bunhomme, F., Bundeira, D. & Coutinho, A. (1990) *Cell* **63**, 717-728.
- Pullen, A. M., Marrack, P. & Kappler, J. W. (1988) *Nature (London)* **335**, 796.
- Hahn, B. H., Shaw, G. M., Taylor, M. E., Redfield, R. R., Markham, P. D., Salahuddin, S. Z., Wong-Staal, F., Gallo, R. C., Parks, E. S. & Parks, W. P. (1986) *Science* **20**, 1548-1553.
- Meyerhans, A., Cheynier, R., Albert, J., Seth, M., Kwok, S., Sninsky, J., Morfeldt-Manson, L., Asjö, B. & Wain-Hobson, S. (1989) *Cell* **58**, 901-910.
- Golovkina, T. V., Chervonski, A., Dudely, J. P. & Ross, S. R. (1992) *Cell* **69**, 637-645.
- Held, W., Waanders, G. A., Shakhov, A. N., Scarpellino, L., Acha-Orbea, H. & MacDonald, R. (1993) *Cell* **74**, 529-540.

CHAPITRE 4

ARTICLE 3 : Highly biased CDR3 usage in restricted sets of BVs during vSAG-9 response.

HIGHLY BIASED CDR3 USAGE IN RESTRICTED SETS OF BVS DURING VSAG9 RESPONSE

Cristina Ciurli,^{*‡} David N. Posnett,^{§||} Rafick-Pierre Sékaly,^{*‡¶} and François Denis^{*}

From the ^{*}Laboratoire d'Immunologie, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal (Québec) Canada, H2W 1R7; [‡]Département de Microbiologie-Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal (QC), Canada, H3C 3J7; [§]Department of Medicine, and the ^{||}Immunology Program, Graduate School of Medical Sciences, Cornell University Medical College, New York 10021; [¶]Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine, McGill University, Montréal (QC), Canada, H3A 2B4.

Correspondence to Dr. François Denis
 Laboratoire d'Immunologie
 Institut de Recherches Cliniques de Montréal
 110, av. des Pins Ouest, Montréal (Québec) Canada
 H2W 1R7
 Tel.: (514) 987-5549
 Fax: (514) 987-5711

Running title: TCR CDR3 bias during vSAG9 response

Keywords: TCR, Superantigens, vSAG9, MMTV, CDR3

Soumis pour publication au Journal of Experimental Medicine

ABBREVIATIONS

BV:	Beta Chain Variable Region
HV4:	Hypervariable Region 4
qPCR:	Quantitative Polymerase Chain Reaction
MMTV:	Mouse Mammary Tumor Virus
vSAG:	Viral Superantigen

SUMMARY

Superantigens encoded by the Mouse Mammary Tumor Virus can stimulate a large proportion of T cells through interaction with germline encoded regions of the T-cell receptor β chain like the HV4 loop. However, several lines of evidence suggest that somatically generated determinants in the CDR3 region might influence superantigen responses. We stimulated human T cells *in vitro* with MMTV9-derived vSAG9 to assess the nature and structure of the T cell receptor in amplified T cells and to evaluate the contribution of non-HV4 elements in vSAG recognition. This report demonstrates that vSAG9 stimulation caused the expansion of TCR BV6-expressing T cells, although to varying degrees depending on the BV6 sub-family. The BV6S7 sub-family was preferentially expanded in comparison to BV6S5, but the amplified T cells expressing BV6S5 showed a highly biased BJ and CDR3 usage. As CDR3 regions are involved in MHC-peptide interaction, such a selection is highly suggestive of an intimate MHC-TCR interaction and might imply that MHC-vSAG-TCR interactions are similar to those that occur during conventional antigen recognition.

INTRODUCTION

Mouse mammary tumor virus (MMTV) is a retrovirus that takes advantage of the immune system for its transmission by encoding a viral superantigen (vSAG) (1,2). Viral superantigens derived from MMTV can stimulate a large pool of T cells by interacting with the HV4 regions of the TCR β chain, which are encoded within the germline of individual β chains (3,4) and are distinct from the CDR3 hypervariable region involved in recognition of antigens presented by MHC molecules (5). Since SAG-responsive cells can express different TCR α and β combinations, it is believed that a TCR-MHC interaction is not required for recognition, as most T cells bearing appropriate BVs can respond to vSAGs (2). However, potential contributions of non-HV4 elements have been proposed since the response to vSAGs can be influenced by α chain usage (6-8) and non-random joining region usage has been described in SAG-responsive BVs (9). Therefore, a TCR and MHC contact might be required for productive interaction. T cell-repertoire analysis in mice differing by the presence of vSAG7 has shown that particular BJs and CDR3 lengths were under-represented in BVs having survived deletion (10), but this only indirectly infers CDR3 selection by analyzing the structure of TCRs in non-responding cells rather than in responding cells. To assess what TCRs would be selectively amplified by vSAG stimulation, we subjected T cells from individuals, differing at the BV6S7 allele, to *in vitro* stimulation with vSAG9. The structure of TCRs amplified by vSAG9 provides evidence that the CDR3 is implicated in vSAG response, suggesting that recognition of vSAGs is analogous to that of conventional antigens.

MATERIALS AND METHODS

Genotyping for BV6S7 alleles.

The nomenclature used herein for BV genes is according to Wei *et al.* (11). The BV6S7*1 and BV6S7*2 alleles differ by a non-conservative amino acid substitution in HV4 which creates a *Bam*HI site in BV6S7*1 (12). PBMCs were separated by Ficoll (Pharmacia, LKB Biotechnology AB) centrifugation and stimulated for 24 hr with 1 µg/ml of PHA (Murex Diagnostics, Guelph, Ontario, Canada). Total RNA was extracted from 40×10^6 cells using RNAzol B (CINNA/BIOTECX Laboratories, Houston, TX) and 10 µg was reverse transcribed using 5 µg of oligodT and 60 U of AMV reverse transcriptase (Life Sciences, St-Petersburg, FL). The BV6S7 cDNAs were amplified by PCR using primers and conditions described elsewhere (13), products were digested 2 hours with 10 U of *Bam*HI and fractionated on 2% agarose gels. The presence of 167 bp and 65 bp fragments corresponds to BV6S7*1, while a 232 bp fragment corresponds to the BV6S7*2.

T cell Stimulation with vSAG9.

Human T cells were purified from peripheral blood of 4 donors homozygous for the BV6S7 alleles (two BV6S7*1 and two BV6S7*2) using rosetting with sheep red blood cells (Quélab, Montréal, Canada) and PBMCs were separated by Ficoll centrifugation (Pharmacia). Purity was assessed by staining with anti-CD3 (OKT3-FITC) and anti-HLA-DR (L-243) mAbs (Becton Dickinson CO., Mountain View, CA) and T cell purity was greater than 99%, while the non-T cell fraction contained less than 15% of T cells. T cells were stimulated in the presence of irradiated autologous feeder cells with either DAP DR1 expressing vSAG9 (14) or control DAP DR1 cells. DAP DR1 is a murine fibroblastic cell line transfected with human DR1 MHC class II α and β chain cDNAs (13). Co-cultures were performed in 96 well plates in DMEM supplemented with 5% FCS, 2 mM L-glutamine and 20 µg/ml gentamycin. DAP DR1

and DR1 vSAG9 cells were treated for 1 hr at 37°C with 100 µg/ml of mitomycin C (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) prior to the co-culture. 6×10^5 human T cells were cultured with 2×10^5 DAP DR1 or DR1 vSAG9 in the presence of 5×10^5 autologous irradiated feeder cells. Proliferation was measured by [^3H] thymidine incorporation (Dupont Co.-New England Nuclear, Boston, MA) after 72 hours of co-culture and determined using a β plate counter (Pharmacia). After 2 days of stimulation, 10 U/ml of recombinant human IL-2 (NIH) was added and the culture proceeded for 7 days. For PHA stimulation, 10^6 T cells were co-cultured in 24-well plates with 2×10^5 irradiated feeder cells and 1 µg/ml PHA in 1.5 ml.

FACS and qPCR Analysis of BV Repertoire.

FACS analysis was performed after T cell stimulation with DR1-vSAG9 or PHA, using CD4, CD8 and BV-specific mAbs. The of monoclonal antibodies against human BVs used in this study were anti-BV2, 3, 8, BV13S3 (JU74) 17, 19, 21 (Immunotech Coulter, St-Laurent, Canada); BV5 (MH3-2), BV5 (3D11), BV6S7*1 (OT145), BV9 (MKB1), BV12 (S511), BV13 (BAMB), BV13S1 (H131), BV13S2 (H132), BV23 (HUT-78); mAb specificity has been described previously (15). For conjugated antibodies, 4×10^5 cells were incubated with FITC-labeled mAbs. For unconjugated mAbs, cells were incubated with saturating concentrations of mAbs and a 1:400 dilution of FITC-conjugated GAM (Caltag Laboratories So, San Francisco CA), followed by blocking with a 1:10 dilution of normal mouse serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Cells were stained with OKT4-PE (anti-CD4) and OKT8-PerCP (anti-CD8) (Becton Dickinson) and 30×10^4 live cells were gated according to forward and side light scatter and analyzed on a FACScan running the Lysis II software (Becton Dickinson). For qPCR, cDNAs were synthesized as described above and PCR was performed using conditions and primers described

elsewhere (16). PCR products were fractionated on 12% polyacrylamide gels and exposed overnight onto PhosphorImager screens (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Quantification of the radioactive signal was carried out on a PhosphorImager running the IMAGEQUANT software (Molecular Dynamics) and normalized against an alpha chain constant region internal control (16).

Cloning and Analysis of BV6 sub-family members.

Members of the BV6 sub-family were amplified by PCR using DeepVent DNA polymerase (New England Biolabs, Mississauga, Canada) using a constant region 3' primer: GGTGTGGGAGATGTCGACTTTTGATGGCTCAAAC and a pan-BV6 5' primer : CCTTTACTGGTACCGACAGAGCCTGG. PCR products were digested with *KpnI* and *SalI* and cloned into pBSKS+ (Stratagene, LaJolla, CA). Colonies were screened by PCR (17) using reverse and universal primers and the presence of inserts was verified by subjecting 10 µl of the PCR reactions to 1.5% agarose gel electrophoresis. A RFLP screening test was used to subdivide BV6 sub-families based on the differential presence of *BamHI* and *ApaLI* sites (*BamHI*⁺*ApaLI*⁺: BV6S7*1; *BamHI*⁻*ApaLI*⁺: BV6S7*2; *BamHI*⁻*ApaLI*⁻: BV6S5; *BamHI*⁺*ApaLI*⁻: BV6S1, BV6S3, BV6S4, BV6S11, BV6S14). 10 µl of the mini prep PCR reactions were digested for 1 hr with *BamHI* and *ApaLI* and fractionated on 2% agarose gels. The sequences of TCR β chains were determined on randomly picked clones using the T7 Sequencing Kit (Pharmacia).

RESULTS AND DISCUSSION

Since vSAG9 can stimulate BV6S7⁺ human T cells (18) and allelic polymorphism located within the HV4 of BV6S7 has been identified (12), we assumed that responsiveness to vSAG9 might differ between individuals homozygous for either allele. We reasoned that analysis of BVs expanded in the weaker responder BV6S7 allele could reveal the contribution of non-HV4 elements in vSAG9 response.

vSAG9 preferentially expands the TCR BV6 family.

Since the murine cell line DAP expressing human HLA-DR1 (DAP-DR1) and vSAG7 can stimulate human T cells in a BV-restricted manner (16), we used DAP-DR1 transfected with vSAG9 (DAP-vSAG9) (14) to stimulate T cells from an individual homozygous for BV6S7*1 (Donor J). Proliferation as measured by thymidine incorporation, reached a maximum 4 days post-stimulation and was reproducibly (3 independent experiments) 4 fold higher compared to control DR1 cells (data not shown). FACS analysis of BV usage in human CD4⁺ T cells in response to vSAG9 or PHA, a mitogen that stimulates T cells independently of BV usage (19 and data not shown), shows that vSAG9 stimulated BV6S7*1⁺ and BV21⁺ T cells (Figure 1A). Since the BV-specific mAbs currently available cover approximately 65% of the repertoire, qPCR analysis was performed. This analysis confirmed that only BV6 and BV21 responded to vSAG9 and were amplified 4-fold and 3-fold, respectively (Figure 1B). Together, BV6 and BV21 represented 50% of the T cells present post-stimulation. This selective expansion was reproduced on a second individual homozygous for BV6S7*1 (data not shown).

T cells derived from two individuals homozygous for the BV6S7*2 allele (Donors S and M) were stimulated with vSAG9. Proliferation to DAP-vSAG9, as measured by thymidine incorporation, was reproducibly (two independent

experiments) 6-fold and 4-fold higher than control to DR1 cells, respectively (data not shown). This difference between the response to DAP-vSAG9 and DR1 cells was observed at several responder:stimulator ratios (data not shown). Quantitative PCR analysis was performed and, as with the BV6S7*1 donor, only BV6⁺ and BV21⁺ T cells were amplified and represented approximately 55 % of the cells present after stimulation (Figure 2A, 2B). This responsiveness of both BV6 and BV21 is not surprising given that they share significant homology, notably in the CDR1 and HV4 regions (11). HLA-typing for MHC haplotypes was performed and showed that donor J was DR1/DR1, donor S was DR7/DR7 and donor M was DR2/DR7. While donors S and M express MHC molecules different from DR1, the expansion of BV6 and BV21 was clearly not due to an allogeneic response since no such expansions were observed in T cells stimulated with DAP-DR1 alone as seen by flow cytometry (data not shown). Furthermore, the donor homozygous for HLA-DR1 showed the same specific expansion of BV6 and BV21. From qPCR analysis it is clear that the overwhelming majority of T cells that responded to vSAG9 belonged to the BV6 family.

Analysis of BV6 sub-family members amplified by vSAG9.

The human BV6 locus contains 7 expressed genes (20) and qPCR does not allow to discriminate between these sub-family members. To circumvent this, BV6s were amplified using a pan-BV6 primer and cloned for analysis. Approximately 200 clones from PHA- and vSAG9-stimulated cells were analyzed by RFLP and this revealed that for donor J (homozygous for the BV6S7*1 allele), 98% of cells responding to vSAG9 belonged to the BV6S7 family. For donors S and M (homozygous for BV6S7*2), 64% and 87% of T cells belonged to the BV6S7 family, although a significant number of other BV6s were also present post-stimulation (Table 1). For donor S, 27% of the BV6s present after vSAG9 stimulation were BV6S5⁺, while in donor M, 5% of BV6s were BV6S5⁺ after stimulation. In all donors, BV6S7 clearly responded better to vSAG9, as evidenced by the low numbers of BV6⁺, non-

BV6S7 T cells found after stimulation. Since for donor M, the proportion of BV6S7 positive cells present in the PHA-stimulated population was significantly higher than for the two other donors, they should have dominated the vSAG9 response, thus explaining the low number of BV6S5 found after stimulation. While some BV6s belonging to the BV6S1, S3, S4, S11 and S14 RFLP class were present in both BV6S7*2 homozygous donors, we believe that were not expanded by vSAG9 stimulation.

Sequence of the CDR3 in BV6 sub-families members amplified by vSAG9.

To determine if the TCR- β chain CDR3 contributes to recognition of the vSAG9-MHC complex, the TCR junctional regions from T cells stimulated by vSAG9 and PHA for the three donors were sequenced. Sequence analysis of BV6S7 in donor J showed no particular selection of BJs from either vSAG9-stimulated or PHA-stimulated cells (data not shown). A random BJ usage and CDR3 length distribution was observed in BV6S7s from the three donors (data not shown, Table 2 and 3). In contrast, vSAG9-responding BV6S5s from donor S, revealed a striking bias as 89% of BV6S5 amplified used the BJ1S5 element (Table 2), while BJ1S5 usage in the BV6S5 from PHA-stimulated T cells was not elevated (10%) (data not shown). Two clonotypes were found to be over represented, with CDR3 regions bearing a PXNSG motif (where X is Q or K) (Table 2). Both CDR3 sequences were created entirely by N-additions at the V-J rearrangement boundary. These two clonotypes were also found at very low frequency in the PHA control (data not shown), arguing against their presence in vSAG9 stimulated cells being due to an allogeneic response. In addition, a dominant clonotype representing 27 % of BV6S5s in PHA-treated cells (data not shown) was absent from the vSAG9 stimulated population, showing that relative abundance of potentially reactive T cells was not responsible for the oligoclonal amplification observed. In donor M, one dominant clonotype, having the totally N-encoded rearrangement LEHSTRP, represented 89% of the BV6S5⁺ clones

present after vSAG9 stimulation (Table 2), while this clonotype could not be detected in the BV6S5s from PHA-treated cells (data not shown). The number of BV6S1, S3, S4 present after vSAG9 stimulation was low in all donors and the total lack of CDR3 bias seen in these BVs suggests that they have not been amplified. The bias observed in the CDR3 region of BV6S5s raises the possibility that vSAG-MHC-TCR interactions could be similar to MHC-TCR interactions occurring during conventional antigen recognition.

Other studies have yielded similar results, for instance, sequence analysis of TCR β junctional segments in BV6⁺CD4⁺ T cells that had survived deletion mediated by vSAG7 showed a BJ usage and CDR3 length distribution that varied significantly from H2-matched mice differing only by the absence of Mls-1^a (10). In addition, introduction of an E α transgene in SJL mice, which do not express I-E and therefore can not present the endogenous vSAG9, restores deletion of BV17⁺ T cells (9). When compared to non-transgenic mice, T cells that survived negative selection showed an increase in BJ2S5 usage and a decrease in BJ1S1 usage, indicating that BJ usage impacts on T cell deletion (9). Our results are in agreement with these and extend them by providing evidence that the structure of the CDR3 appears to play a positive role in vSAG responsiveness. Our results differ from those of Liao *et al.* (18) where no particular CDR3 usage was observed in human T cells stimulated *in vitro* with vSAG9. In the latter report, cells were harvested 9 days after stimulation (7 days in our experiments). It is likely that T cells bearing low affinity TCR (BV6S5) were outgrown by BV6S7 (18).

Model of MHC-vSAG-TCR interaction.

Comparison of the HV4 sequences amongst BV6s and BV21s reveals that they are highly homologous except for a glutamic acid which is present at the tip of the HV4 loop in all non-responding BV6s (BV6S1,S3,S4,S11,S14) whereas BV6S5 and

BV21s have a lysine at that position and BV6S7s have a glycine. In addition, the allelic polymorphism between BV6S7s is located next to that residue and the conserved glycine present in all BV6s in BV21s is replaced by a glutamic acid in BV6S7*2. These differences might explain in part the differential reactivity observed between BV6 sub-family members. While HV4 is clearly the overriding determinant in vSAG recognition, it is possible that BVs having a sub-optimal HV4 would become more dependent on stabilization provided by TCR-MHC contacts. Previous studies have shown that mutagenesis of the CDR1 in murine BV6 can abrogate Mls-1^a and conventional antigen recognition (21). Given that the CDR1 and CDR2 of both chains of the TCR interact with the helices of MHC during antigen recognition (5), if TCR-MHC interactions are similar during vSAG recognition, it is not surprising that CDR1 mutagenesis impacts on both types of responses. In contrast to bSAGs, the role of the CDR2 region has not been established in vSAG response and because of the strong sequence similarities among the CDR2 sequences of BV6s, this question can not be addressed and would require extensive mutagenesis.

Our results and those from others (10,11) indicate that BJ usage impacts on vSAG recognition. While this might be interpreted as this region being a contact site for vSAGs, we feel this is unlikely given that it is located on the opposite face of HV4 (5,22). An alternate explanation is that the BJ bias observed in the vSAG9 response is due to TCR-interaction with a peptide located in the MHC groove, since the BJ gene segment contributes for a significant portion of the CDR3 (5,22). As the two BV6S7*2 homozygous individuals had different CDR3s, this argues against this region being a binding site for vSAG9. The different CDR3s found in the two donors could be explained by recognition of different peptides presented by the APCs used in these experiments. Alternatively, a dominant peptide might be recognized by both types of TCRs, as it has been shown that TCRs having identical BVs, but different CDR3s, can recognize the same peptide-MHC complex (23). The data in the literature about non-HV4 contributions in vSAG response could be readily reconciled using a model in

which MHC-vSAG-TCR interactions are similar to that of conventional antigens, since the α chain and the β chain CDR1 play a crucial role in MHC interaction, while the CDR3 is involved in peptide interaction.

An important question is what is(are) the peptide(s) recognized by the selected BV6S5 TCRs. While it is possible that dominant peptides are present in the MHC of the DAP-DR1 antigen presenting cells used in these experiments, it is tempting to speculate that what is being recognized by the responding T cells is the vSAG itself. vSAGs are type II transmembrane proteins (2) having structural similarity to the invariant chain and as such, vSAGS might insert themselves into the MHC groove in a manner analogous to the invariant chain, such that the selected TCRs would recognize part of the vSAG as if it were an antigenic peptide. The definitive answer about the structure of MHC-vSAG-TCR complex will most likely come from crystallography.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grant #6605-4847-AIDS from the National Health Research Development Program to FD and grant #RG-544/95M from the Human Frontier Foundation to RPS. RPS holds a MRC Scientists Award and CC has received a PhD fellowship from the National Health Research Development Program of Canada. We would like to thank Walid Mourad for performing HLA typing of individuals and are grateful to Pascal Lavoie, Hugo Soudeyns and Ursula Utz for critical reading of the manuscript.

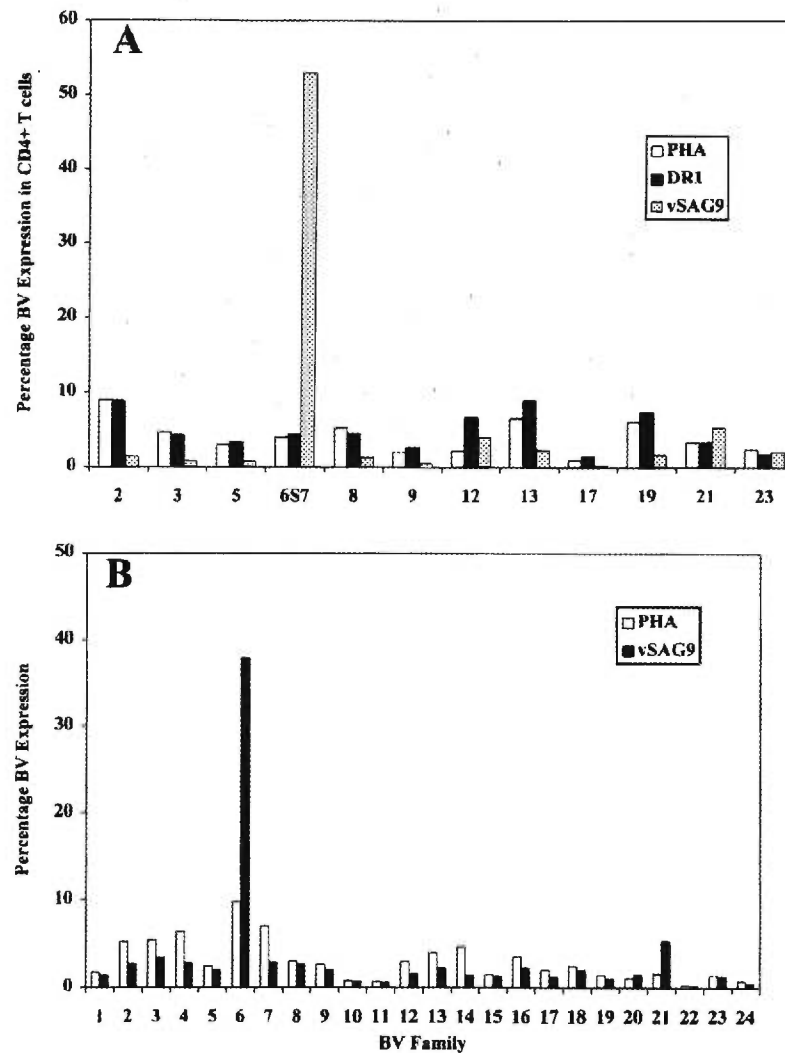


Figure 1. (A) Cytofluorometric analysis of TCR BV usage in T cells stimulated by vSAG9. T cells from donor J (homozygous for BV6S7*1) were stained with a panel of human BV-specific antibodies. Shown is the percentage of BV expression in CD4⁺ T cells after PHA, DR1 or vSAG9 stimulation. (B) Percentage of TCR BV usage determined by qPCR analysis. The signal intensity for each BVs obtained by volume integration using the IMAGEQUANT software was normalized against the α -chain internal control and the relative percentage of BV expression was calculated by dividing the individual normalized values by the sum of all BV normalized values.

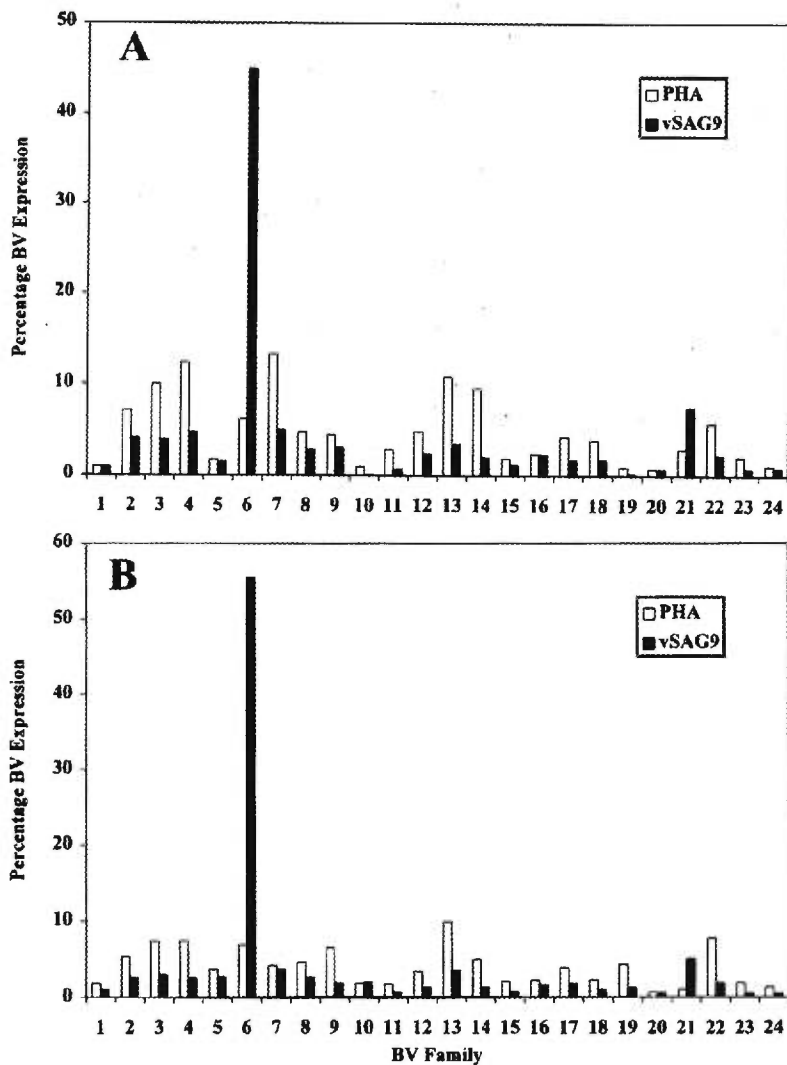


Figure 2. qPCR analysis of TCR BV usage in vSAG9-treated T cells. (A) Donor S, homozygous for the BV6S7*2 allele; (B) Donor M, homozygous for the BV6S7*2 allele. The values were calculated as described in the legend of Figure 1B.

REFERENCES

1. Acha-Orbea, H., W. Held, G.A. Waanders, A.N. Shakhov, L. Scarpellino, R.K. Lees, and H.R. MacDonald. 1993. Exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus superantigens. *Immunol. Rev.* 131:5-25.
2. Marrack, P., G.M. Winslow, Y. Choi, M. Scherer, A. Pullen, J. White, and J.W. Kappler. 1993. The bacterial and mouse mammary tumor virus superantigens; two different families of proteins with the same functions. *Immunol. Rev.* 131:79-92.
3. Pullen, A.M., T. Wade, P. Marrack, and J.W. Kappler. 1990. Identification of the region of the T cell receptor β chain that interacts with the self-superantigen Mls-1^a. *Cell* 61:1365-1374.
4. Cazenave, P.-A., P.N. Marche, E. Jouvin-Marche, D. Voegtlé, F. Bonhomme, D., Bandeira, and A. Couthino. 1990. V β 17 gene polymorphism in wild-derived mouse strains: two amino acid substitutions in the V β 17 region greatly alter T cell receptor specificity. *Cell* 63:717-728.
5. Garboczi, D.N., P. Ghosh, U. Utz, Q.R. Fan, W.E. Biddison, and D.C. Wiley. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature (Lond.)*. 384:134-141.
6. Smith, H.P., P. Le, D.L. Woodland, and M.A. Blackman. 1992. T cell receptor α -chain influences reactivity to Mls-1 in V β 8.1 transgenic mice. *J. Immunol.* 149:887-896.
7. Waanders, G.A., A.R. Lussow, and H.R. MacDonald. 1993. Skewed T cell receptor V alpha repertoire among superantigen reactive murine T cells. *Int. Immunol.* 5:55-61.
8. Vacchio, M.S., O. Kanagawa, K. Tomonari, and R.J. Hodes. 1992. Influence of T cell receptor V α expression on Mls^a superantigen-specific T cell responses. *J. Exp. Med.* 175:1405-1408.
9. Candéias, S., C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1991. The V β 17⁺ T cell repertoire: skewed J β usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4⁺ versus CD8⁺ cells. *J. Exp. Med.* 174:989-1000.
10. Chies, J.A.B., G. Marodon, A.-M. Joret, A. Regnault, M.-P. Lembezat, B. Rocha, and A.A. Freitas. 1995. Persistence of V β 6⁺ T cells in Mls-1^a mice. A role for the third complementarity-determining region (CDR3) of the T cell receptor β chain in superantigen recognition. *J. Immunol.* 155:4171-4178.

11. Wei, S., P. Charmley, M.A. Robinson, and P. Concannon. 1994. The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics* 40:27-36.
12. Li, Y., P. Szabo, M.A. Robinson, B. Dong, and D.N. Posnett. 1990. Allelic variations in the human T cell receptor V β 6.7 gene products. *J. Exp. Med.* 171:221-230.
13. Vissinga, C.S., P. Charmley, and P. Concannon. 1994. Influence of coding region polymorphism on the peripheral expression of a human TCR V β gene. *J. Immunol.* 152:1222-1227.
14. Thibodeau, J., N. Labrecque, F. Denis, B.T. Huber, and R.-P. Sékaly. 1994. Binding sites for bacterial and endogenous retroviral superantigens can be dissociated on major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* 179:1029-1034.
15. Posnett, D.N., F. Romagné, A. Necker, B.L. Kotzin, and R.-P. Sékaly. 1996. Summary: First human TCR monoclonal antibody workshop. *The Immunologist* 4:5-8.
16. Labrecque, N., H. McGrath, M. Subramanyam, B.T. Huber, and R.-P. Sékaly. 1993. Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigen: V β restriction and conserved evolutionary features. *J. Exp. Med.* 177:1735-1743.
17. White, B.A., and S. Rosenzweig. 1989. The polymerase chain reaction colony miniprep. *Biotechniques* 7:696-698.
18. Liao, L., A. Marinescu, A. Molano, C. Ciurli, R.-P. Sékaly, J.D. Fraser, A. Popowicz, and D.N. Posnett. 1996. TCR binding differs for a bacterial superantigen (SEE) and a viral superantigen (Mtv-9). *J. Exp. Med.* 184:1471-1482.
19. Wong, F.S., M.L. Hibberd, L. Wen, B.A. Millward, and A.G. Demaine. 1993. The human T cell receptor V β repertoire of normal peripheral blood lymphocytes before and after mitogen stimulation. *Clin. Exp. Immunol.* 92:361-366.
20. Rowen, L., B.F. Koop, and L. Hood. 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science (Wash. DC)*. 272:1755-1762.
21. Kang, J., C.A. Chambers, J. Pawling, C. Scott, and N. Hozumi. 1994. Conserved amino acid residues in the complementarity-determining region 1 of the TCR β -chain are involved in the recognition of conventional Ag and Mls-1 superantigen. *J. Immunol.* 152:5305-5317.

22. Garcia, K.C., M. Degano, R.L. Stanfield, A. Brunmark, M.R. Jackson, P.A. Peterson, L. Teyton, and I.A. Wilson. 1996. An $\alpha\beta$ T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science (Wash. DC)*. 274:209-219.
23. Boitel, B., M. Ermonval, P. Panina-Bordignon, R.A. Mariuzza, A. Lanzavecchia, and O. Acuto. 1992. Preferential V β usage and lack of junctional sequence conservation among T cell receptors specific for a tetanus toxin-derived peptide: Evidence for a dominant role of a germline-encoded V region in antigen/major histocompatibility complex recognition. *J. Exp. Med.* 175:765-777.

DATA NOT SHOWN

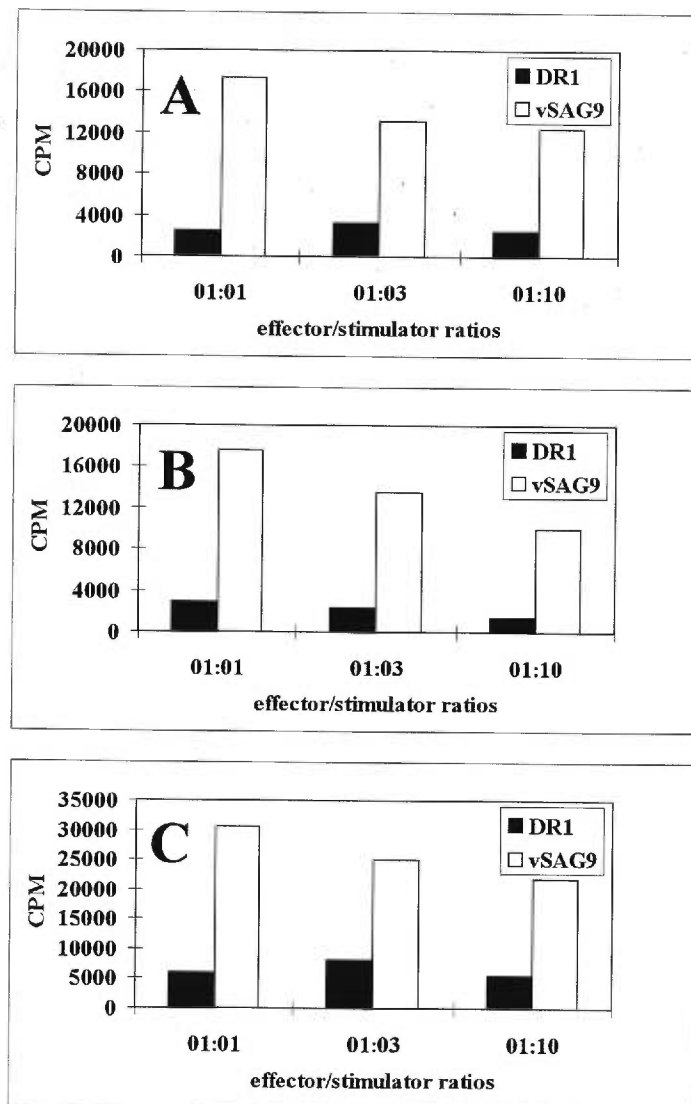


Figure 1. (A) Stimulation of purified human T cells by vSAG9 in donor J. Proliferative response of human T cells stimulated with DR1 and vSAG9 in the presence of 10^5 irradiated autologous feeder cells measured after 72 hours. Bars represent the mean of triplicate values of $[H^3]$ thymidine incorporation. (B) Stimulation of purified human T cells by vSAG9 in donor S. (C) Stimulation of purified human T cells by vSAG9 in donor M.

DATA NOT SHOWN

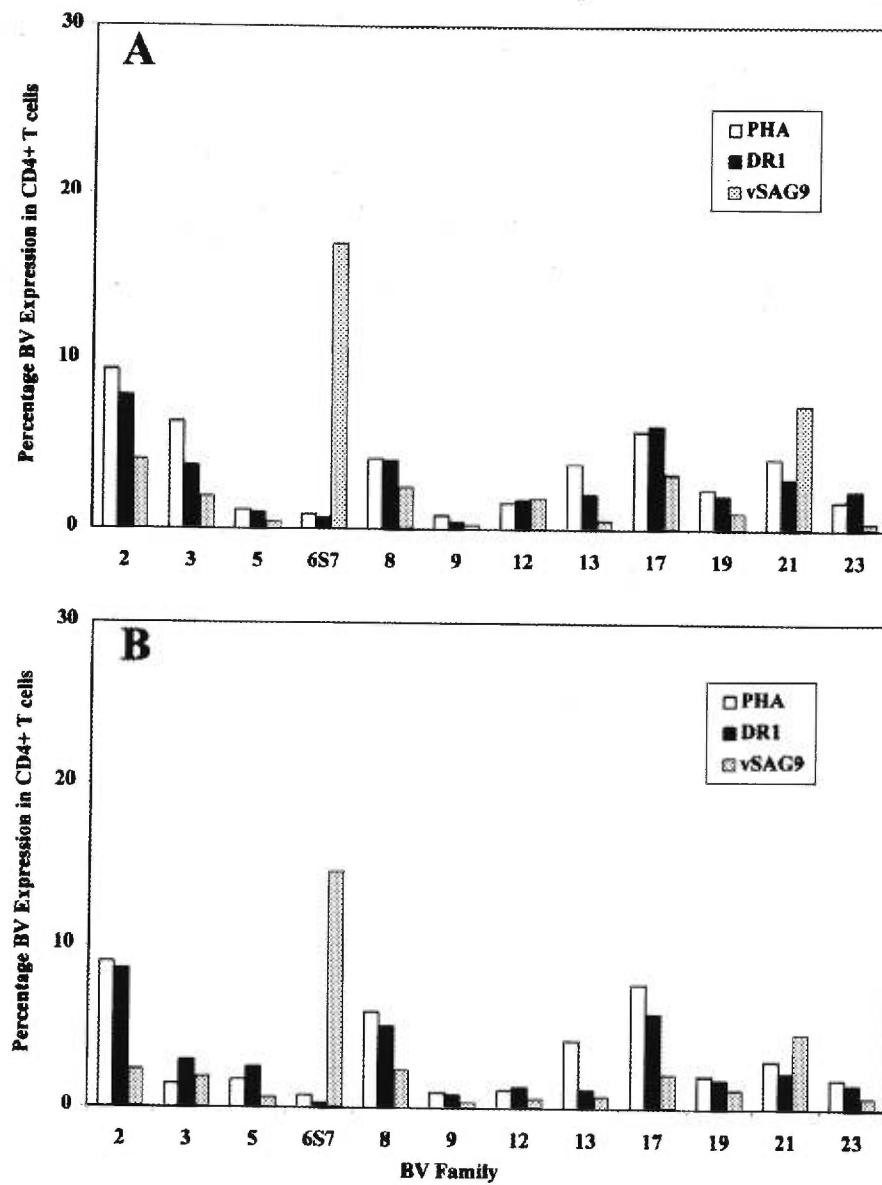


Figure 2. Cytofluorometric analysis of TCR BV usage after PHA, DR1 and vSAG9 stimulation. (A) BV6S7*2 homozygous donor S; (B) BV6S7*2 homozygous donor M.

DATA NOT SHOWN

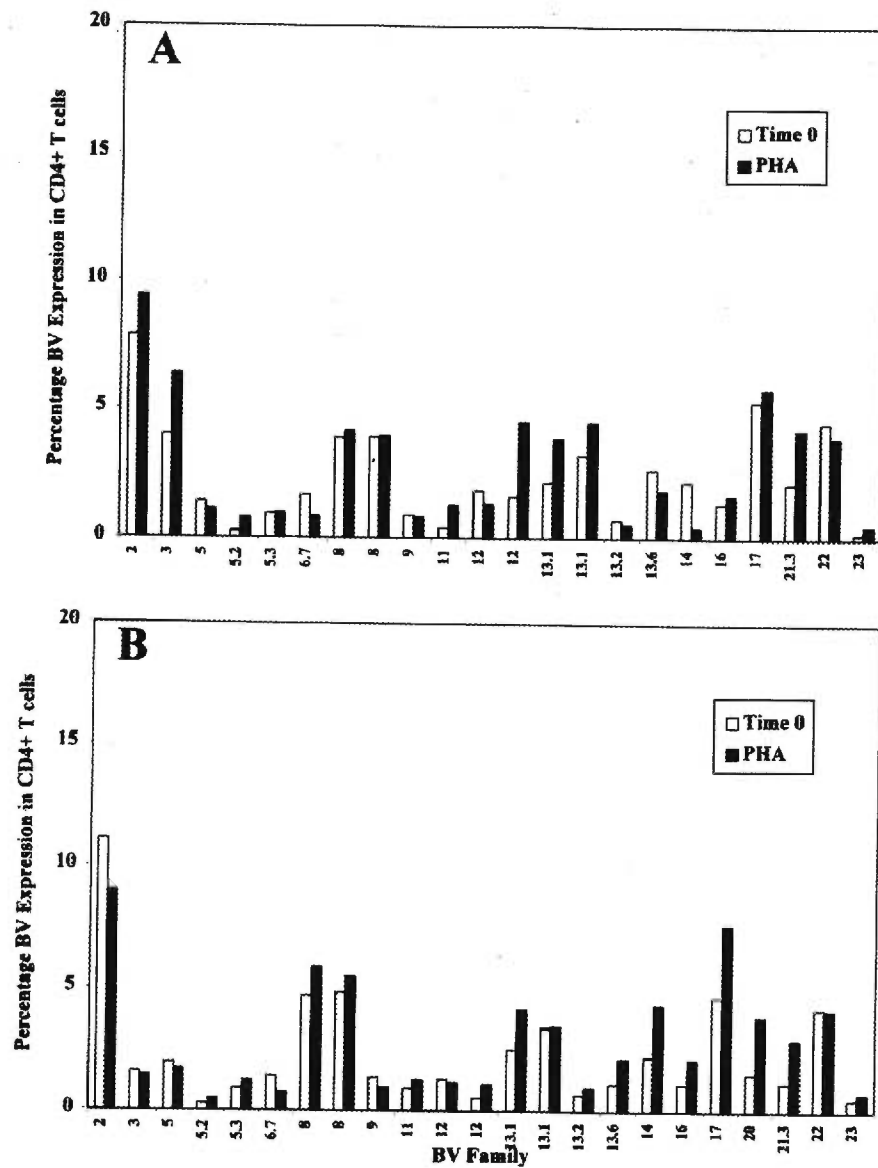


Figure 3. Cytofluorometric analysis of TCR BV usage in PHA-stimulated and unstimulated T cells. (A) Donor S, homozygous for the BV6S7*2 allele; (B) Donor M, homozygous for the BV6S7*2 allele.

DATA NOT SHOWN

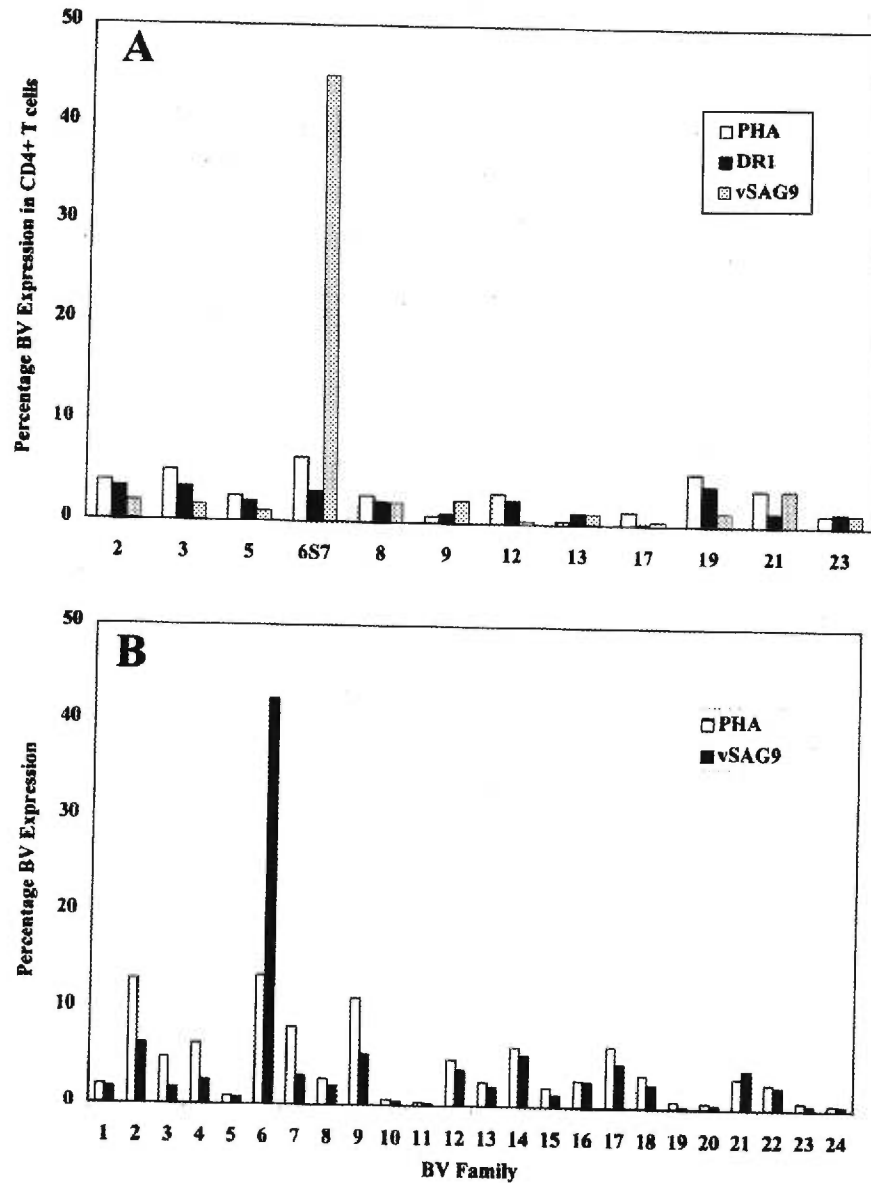


Figure 4. (A) Cytofluorometric analysis of TCR BV usage in response to vSAG9. T cells from donor A (homozygous for BV6S7*1) were stained with the protocol used for Donor J. (B) Relative percentage of TCR BV usage determined by qPCR analysis.

Table 1. Percentage of BV6 sub-family members assessed by RFLP analysis.

	PHA			vSAG9		
	BV6S7	BV6S5	BV6S1,S3, S4,S11,S14	BV6S7	BV6S5	BV6S1,S3, S4,S11,S14
Donor J (BV6S7*1)	21	69	10	98	0	2
Donor S (BV6S7*2)	17	68	15	64	27	9
Donor M (BV6S7*2)	42	43	15	87	5	8

Donor J PHA n=200 clones, vSAG9 n=200 clones; Donor S PHA n=194 clones, vSAG9 n=198 clones;

Donor M PHA n=143 clones, vSAG9 n=143 clones.

Table 2. Junctional regions of BV6s from vSAG9-stimulated cells of donors S and M.

Donor S					Donor M				
BV	N-D-N	BJ		n*	BV	N-D-N	BJ		n*
6S5	CASS LPTGGVED	TIYFG	1S3	1/18	6S5	CASS FPSGGL	YEQYFG	2S7	1/9
6S5	CASS SLNSG	NQPQHFG	1S5	1/18	6S5	CASS LEHSTRP	YEQYFG	2S7	8/9
6S5	CASS PQNSG	NQPQHFG	1S5	9/18					
6S5	CASS PENS	NQPQHFG	1S5	4/18	6S7*2	CASS YRVG	EKLFFG	1S4	1/25
6S5	CASS PNSG	NQPQHFG	1S5	1/18	6S7*2	CASS LVGTTDQG	KLFFG	1S4	1/25
6S5	CASS WGLAW	NEQFFG	2S1	1/18	6S7*2	CASS LDGRN	NSPLHFG	1S6	1/25
6S5	CASS LDRGS	EQFGG	2S1	1/18	6S7*2	CASS QDTS	SYNEQFFG	2S1	1/25
					6S7*2	CASS PGAGGPP	YNEQFFG	2S1	1/25
6S7*2	CASS LNQLKH	TEAFFG	1S1	1/22	6S7*2	CASS KGGAGP	YNEQFFG	2S1	1/25
6S7*2	CASS LSAGTI	EAFFG	1S1	1/22	6S7*2	CASS WRGSSTN	NEQFFG	2S1	1/25
6S7*2	CASS LTRD	YGYTFG	1S2	1/22	6S7*2	CASS LVAGGQ	NEQFFG	2S1	1/25
6S7*2	CASS LTRGA	GNTIYFG	1S3	1/22	6S7*2	CASS AGTSGGG	EQFFG	2S1	1/25
6S7*2	CASS RPEGQYR	NTIYFG	1S3	1/22	6S7*2	CASS LLPFQ	QFFG	2S1	1/25
6S7*2	CASS TQTG	QPQHFG	1S5	1/22	6S7*2	CASS YKGGGPT	TDTQYFG	2S3	1/25
6S7*2	CASS LQWGG	NSPLHFG	1S6	1/22	6S7*2	CASS SRFVAGG	TDTQYFG	2S3	1/25
6S7*2	CASS LANGGIG	SPLHFG	1S6	1/22	6S7*2	CASS FRSVG	TDTQYFG	2S3	1/25
6S7*2	CASS RALLREQD	SYNEQFFG	2S1	1/22	6S7*2	CASS PFSSR	TDTQYFG	2S3	1/25
6S7*2	CASS YQS	YNEQFFG	2S1	1/22	6S7*2	CASS SRGFR	TDTQYFG	2S3	1/25
6S7*2	CASS LTGRVN	NEQFFG	2S1	1/22	6S7*2	CASS PRGSGR	DTQYFG	2S3	1/25
6S7*2	CASS SEYVTI	EQFFG	2S1	1/22	6S7*2	CASS STV	DTQYFG	2S3	1/25
6S7*2	CASS SGTSS	EQFFG	2S1	1/22	6S7*2	CASS SMGR	QETQYFG	2S5	1/25
6S7*2	CASS QGGGQA	GELFFG	2S2	1/22	6S7*2	CASS LTLGGY	ETQYFG	2S5	1/25
6S7*2	CASS PRFI	TDTQYFG	2S3	1/22	6S7*2	CASS ARR	ETQYFG	2S5	1/25
6S7*2	CASS SRLVTLGS	FG	2S3	1/22	6S7*2	CASS SDH	YEQYFG	2S7	1/25
6S7*2	CASS SGLAGV	AKNIQYFG	2S4	1/22	6S7*2	CASS GT	YEQYFG	2S7	1/25
6S7*2	CASS LAPRD	YEQYFG	2S7	1/22	6S7*2	CASS LSLGSS	EQYFG	2S7	1/25
6S7*2	CASS FMDT	YEQYFG	2S7	1/22	6S7*2	CASS QTV	EQYFG	2S7	1/25
6S7*2	CASS AGLALR	EQYFG	2S7	1/22	6S7*2	CASS QP	YFG	2S7	1/25
6S7*2	CASS FGGSG	QYFG	2S7	1/22					
6S1	CASS LFKG	SYNEQFFG	2S1	1/7	6S1	CASS GG	TDTQYFG	2S3	2/9
6S1	CASS YRDTF	SGANVLTFC	2S6	1/7	6S3	CASS EGQGASD	EQFFG	2S1	1/9
6S3	CASS LIGG	SYEQYFG	2S7	1/7	6S4	CASS PERL	SGNTIYFG	1S3	1/9
6S3	CASS TSRST	EQYFG	2S7	1/7	6S4	CASS LRTGN	NEQFFG	2S1	1/9
6S4	CASS LESTGAR	NTIYFG	1S3	1/7	6S4	CASS LTSGRAR	DTQYFG	2S3	1/9
6S4	CASS HKGG	TGELFFG	2S2	1/7	6S4	CASS GARGSGE	QETQYFG	2S5	1/9
6S4	CASS LAAGA	DTQYFG	2S3	1/7	6S4	CASS LGR	ETQYFG	2S5	1/9
					6S4	CASS PQEGG	YEQYFG	2S7	1/9

* n indicates the number of times a given sequence was found. The nucleotide sequences have been deposited to GenBank under accession numbers AF011574 through AF011643.

DATA NOT SHOWN

Table 1. Junctional regions of BV6s from PHA and vSAG9-stimulated cells from donor J.

PHA					vSAG9				
BV		N-D-N	BJ	n*	BV		N-D-N	BJ	n*
6S5	CAS	FL	NTEAFFG 1S1	1/20	6S7*1	CASS	LRDRV	TEAFFG 1S1	1/30
6S5	CASS	PSRDRGF	TEAFFG 1S1	1/20	6S7*1	CASS	ARIA	NYGYTFG 1S2	1/30
6S5	CASS	LVTGGL	TEAFFG 1S1	1/20	6S7*1	CASS	LGTGGRL	YGYTFG 1S2	1/30
6S5	CASS	LGGLD	TEAFFG 1S1	1/20	6S7*1	CASS	LSGVRD	YGYTFG 1S2	1/30
6S5	CASS	RGLG	TEAFFG 1S1	1/20	6S7*1	CASS	LSRDRM	YGYTFG 1S2	1/30
6S5	CASS	TTYYS	GYTFG 1S2	1/20	6S7*1	CASS	SQKGP	TNEKLFFG 1S4	1/30
6S5	CASS	RDMAMA	TFG 1S2	1/20	6S7*1	CASS	LGGKS	QPQHF 1S5	1/30
6S5	CASS	QAGP	NEKLFFG 1S4	1/20	6S7*1	CASS	LS	SYNSPLHFG 1S6	1/30
6S5	CASS	SSRDV	EKLFFG 1S4	1/20	6S7*1	CASS	SQGT	NSPLHFG 1S6	1/30
6S5	CASS	EDGG	NQPQHF 1S5	1/20	6S7*1	CASS	QTG	NSPLHFG 1S6	1/30
6S5	CASS	LDGR	NQPQHF 1S5	1/20	6S7*1	CASS	LVG	PLHFG 1S6	1/30
6S5	CAS	ADSIIFP	NEQFFG 2S1	1/20	6S7*1	CASS	LAGG	YNEQFFG 2S1	1/30
6S5	CASS	PWGLD	EQFFG 2S1	1/20	6S7*1	CASS	FQRGAV	NEQFFG 2S1	1/30
6S5	CASS	RTSGQ	EQFFG 2S1	1/20	6S7*1	CASS	SSGGP	NEQFFG 2S1	1/30
6S5	CASS	PGLGQVRE	ELFFG 2S2	1/20	6S7*1	CASS	KDSGV	NEQFFG 2S1	1/30
6S5	CAST	ERGCK	DTQYFG 2S3	1/20	6S7*1	CASS	SQGG	NEQFFG 2S1	1/30
6S5	CASS	LVKK	QETQYFG 2S5	1/20	6S7*1	CASS	FYTD	NEQFFG 2S1	1/30
6S5	CASS	IQLISNP	ETQYFG 2S5	1/20	6S7*1	CASS	TGRG	TGELFFG 2S2	1/30
6S5	CASS	PRQGP	ETQYFG 2S5	1/20	6S7*1	CASS	VGGGVGL	TDTQYFG 2S3	1/30
6S5	CASS	VNCKM	TQYFG 2S5	1/20	6S7*1	CASS	PGTAI	TDTQYFG 2S3	1/30
6S7*1	CASS	LAGT	NTEAFFG 1S1	1/11	6S7*1	CASS	LRVVG	TDTQYFG 2S3	1/30
6S7*1	CASS	YDGA	SGNTIYFG 1S3	1/11	6S7*1	CASS	FGIA	DTQYFG 2S3	1/30
6S7*1	CASS	LGHY	SNQPQHF 1S5	1/11	6S7*1	CASS	LQRGSS	TQYFG 2S3	1/30
6S7*1	CASS	GEGQGYS	SYNSPLHFG 1S6	1/11	6S7*1	CASS	LMKTR	KNIQYFG 2S4	1/30
6S7*1	CASS	LSRTS	NSPLHFG 1S6	1/11	6S7*1	CASS	PQKASVD	IQYFG 2S4	1/30
6S7*1	CASS	LVSESS	SPLHFG 1S6	1/11	6S7*1	CASS	LVP	ETQYFG 2S5	1/30
6S7*1	CASS	KDTGR	YNEQFFG 2S1	1/11	6S7*1	CASS	LEATR	YEQYFG 2S7	1/30
6S7*1	CASS	RGG	NEQFFG 2S1	1/11	6S7*1	CASS	TSGTGYP	YEQYFG 2S7	1/30
6S7*1	CASS	LDSV	DTQYFG 2S3	1/11	6S7*1	CASS	YGQSEN	YEQYFG 2S7	1/30
6S7*1	CASS	TYR	QETQYFG 2S5	1/11	6S7*1	CASS	QRGGRV	EQYFG 2S7	1/30
6S7*1	CASS	LYRE	ETQYFG 2S5	1/11	6S1	CASS	LNP	NSPLHFG 1S6	1/5
6S1	CASS	LTPVQG	TEAFFG 1S1	1/3	6S1	CASS	LTGSF	YNEQFFG 2S1	1/5
6S3	CASS	PW	QETQYFG 2S5	1/3	6S1	CASS	LPRG	DTQYFG 2S3	1/5
6S4	C	QQAGL	SYEQYFG 2S7	1/3	6S3	CASS	SKNRG	SNQPQHF 1S5	1/5
					6S3	CASS	SFHGPGP	TDTQYFG 2S3	1/5

* n indicates the number of times a given sequences was found.

DATA NOT SHOWN

Table 2. Junctional regions of BV6s from PHA-stimulated cells of donors S and M.

Donor S						Donor M					
BV		N-D-N	BJ		n*	BV		N-D-N	BJ		n*
6S5	CASS	SARDL	NTEAFFG	1S1	1/29	6S5	CASS	LQGQA	NTEAFFG	1S1	1/17
6S5	CASS	LGGWD	TEAFFG	1S1	2/29	6S5	CASS	LDPST	EAFFG	1S1	1/17
6S5	CASS	PTY	TEAFFG	1S1	1/29	6S5	CASS	AARGQE	YGYTFG	1S2	1/17
6S5	CASS	SFDSL	EAFFG	1S1	1/29	6S5	CASS	LGG	SGNTIYFG	1S3	1/17
6S5	CASS	PENSG	NQPQHF	1S5	2/29	6S5	CASS	LTVGAD	SPLHFG	1S6	1/17
6S5	CASS	PQNSG	NQPQHF	1S5	1/29	6S5	CASS	LVGGGD	NEQFFG	2S1	1/17
6S5	CASS	FMGGSSG	SYNEQFFG	2S1	1/29	6S5	CASS	LGEGR	NEQFFG	2S1	1/17
6S5	CAST	MGCG	SYNEQFFG	2S1	1/29	6S5	CASS	LEVGF	TGELFFG	2S2	1/17
6S5	CASS	LTSGSF	NEQFFG	2S1	1/29	6S5	CASS	KGVHP	TGELFFG	2S2	1/17
6S5	CAS	NLGGN	NEQFFG	2S1	1/29	6S5	CASS	WDF	TDTQYFG	2S3	2/17
6S5	CASS	YGLALTD	EQFFG	2S1	1/29	6S5	CASS	LRGKGE	DTQYFG	2S3	1/17
6S5	CASS	SYGD	EQFFG	2S1	1/29	6S5	CASS	FTGVR	AKNIQYFG	2S4	1/17
6S5	CASS	LGAGRQ	QFFG	2S1	1/29	6S5	CASS	LGS	TQYFG	2S5	1/17
6S5	CASS	YGLAMK	TGELFFG	2S2	1/29	6S5	CASS	LVVQGN	SYEQYFG	2S7	1/17
6S5	CASS	ELAGG	TDTQYFG	2S3	8/29	6S5	CASS	LYRQN	SYEQYFG	2S7	1/17
6S5	CASS	LEALK	QYFG	2S3	3/29	6S5	CASS	QDRD	SYEQYFG	2S7	1/17
6S5	CASS	LAGKKQ	NIQYFG	2S4	1/29						
6S5	CASS	LPSH	YEQYFG	2S7	1/29	6S7*2	CASS	LGQ	NTEAFFG	1S1	1/19
						6S7*2	CASS	TSL	EAFFG	1S1	1/19
6S7*2	CASS	LGWER	TEAFFG	1S1	1/13	6S7*2	CASS	SRSGG	NQPQHF	1S5	1/19
6S7*2	CASS	TSGRVI	NYGYTFG	1S2	1/13	6S7*2	CASS	SGGGP	YNEQFFG	2S1	2/19
6S7*2	CASS	LNPLEI	QHFG	1S5	1/13	6S7*2	CASS	PGTVG	EQFFG	2S1	1/19
6S7*2	CASS	WRAS	SYNEQFFG	2S1	1/13	6S7*2	CASS	LGGRAA	GELFFG	2S2	1/19
6S7*2	CASS	LGSGRA	YNEQFFG	2S1	1/13	6S7*2	CASS	LSPAGG	TDTQYFG	2S3	1/19
6S7*2	CASS	LRLAGGRK	NEQFFG	2S1	1/13	6S7*2	CASS	LGTYGP	QETQYFG	2S5	1/19
6S7*2	CASS	LSAEG	EQFFG	2S1	1/13	6S7*2	CASS	LSVN	QETQYFG	2S5	1/19
6S7*2	CASS	LKRER	TDTQYFG	2S3	1/13	6S7*2	CASS	LGTK	ETQYFG	2S5	1/19
6S7*2	CASS	STGGS	DTQYFG	2S3	1/13	6S7*2	CASS	RLGGDT	SYEQYFG	2S7	1/19
6S7*2	CASS	LTVPG	YFG	2S5	1/13	6S7*2	CASS	LLGQDF	YEQYFG	2S7	1/19
6S7*2	CASS	PLASS	SYEQYFG	2S7	1/13	6S7*2	CASS	FGQGY	YEQYFG	2S7	1/19
6S7*2	CASS	FRRTS	SYEQYFG	2S7	1/13	6S7*2	CASS	LRGRR	EQYFG	2S7	1/19
6S7*2	CASS	PDS	SYEQYFG	2S7	1/13	6S7*2	CASS	KQV	EQYFG	2S7	1/19
						6S7*2	CASS	QTGVS	EQYFG	2S7	3/19
6S1	CASS	PQRADYK	YGYTFG	1S2	1/8	6S1	CASS	WGGAG	NEQFFG	2S1	1/7
6S1	CASS	TGQFTV	PQHFG	1S5	1/8	6S1	CASS	LN	NEQFFG	2S1	1/7
6S1	CASS	PDGRGN	TDTQYFG	2S3	1/8	6S1	CASS	LNRLC	DTQYFG	2S3	1/7
6S1	CASS	NDGG	SYEQYFG	2S7	1/8	6S1	CASS	LGTSY	QETQYFG	2S5	1/7
6S3	CASS	LEGRY	SNQPQHF	1S5	1/8	6S1	CASS	EQG	SYEQYFG	2S7	1/7
6S3	CAT	WRGD	QETQYFG	2S5	3/8	6S4	CASS	VGWG	TNEKLFFG	1S4	1/7
						6S4	CASS	DGLAPN	NEQFFG	2S1	1/7

* n indicates the number of times a given sequence was found.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

Les résultats présentés dans cette thèse nous ont permis de mieux définir les facteurs régissant le maintien et les variations du répertoire des cellules T ainsi que le répertoire observé à la suite de perturbations causées par une infection virale. De plus, nos résultats nous ont aidé à mieux comprendre les interactions moléculaires lors d'une réponse superantigénique : nous proposons ici, un modèle d'interaction CMH-SAg viral-RcT.

Chez l'homme, le répertoire du RcT doit être suffisant pour reconnaître l'ensemble des antigènes. Les mécanismes qui engendrent la diversité permettent de produire environ 10^{15} combinaisons possibles de RcT $\alpha\beta$ (Davis et Bjorkman, 1988). Même si le répertoire des cellules T est extrêmement diversifié, des études sur des modèles animaux montrent qu'il peut subir des modifications importantes et que celles-ci peuvent aboutir à une sensibilité ou une résistance à des agents infectieux ou d'autres pathologies.

1.0 LE RÔLE DES FACTEURS ENDOGÈNES SUR L'EXPRESSION DU RÉPERTOIRE DES CELLULES T

Les mécanismes qui contrôlent le répertoire des cellules T humaines sont peu connus. Le répertoire des cellules T humaines est-il contrôlé de façon aléatoire ou des déterminants génétiques influencent-ils sa formation ? La plupart de nos connaissances concernant les facteurs qui peuvent avoir une influence sur le répertoire des RcT exprimés par les cellules T périphériques découlent d'études du répertoire des cellules T chez la souris. Les influences génétiques semblent jouer un rôle important dans le répertoire des cellules T chez différentes lignées de souris congéniques (Vacchio et Hodes, 1989). Certaines souches de souris exprimant un haplotype particulier du CMH et un SAg endogène de MMTV (MIs) montrent des lacunes ou des "trous" dans leur répertoire V β . Les cellules T de ces souris ne répondent pas, ou que faiblement, à des complexes CMH-Ag nécessitant une ou plusieurs des V β supprimées (Nanda *et al.*, 1991; Acha-Orbea *et al.*, 1991). Jusqu'à présent, l'analyse du répertoire des

lymphocytes T chez l'humain n'a pas permis de détecter l'absence d'expression de certaines régions V β dans les lymphocytes T des organes lymphoïdes périphériques (Baccala *et al.*, 1991; Rosenberg *et al.*, 1992). Par contre, la présence de deux polymorphismes insertion/délétion aboutissant à des allèles nuls pour des segments de V β a été décelée chez l'humain (Seboun *et al.*, 1989; Zhao *et al.*, 1994; Rowen *et al.*, 1996). Au cours de cette discussion, nous allons explorer les facteurs génétiques et environnementaux qui chez l'homme, peuvent moduler le répertoire des RcT exprimés par les cellules T matures.

1.1 Le polymorphisme allélique du RcT peut moduler la taille du répertoire ainsi que la fonction des cellules T

Le polymorphisme allélique du RcT peut influencer les répertoires V α et V β . La grande majorité des polymorphismes est due à des variations alléliques dans les segments de la région variable (Robinson, 1989; Li *et al.*, 1990; Cornélis *et al.*, 1993; Reyburn *et al.*, 1993). Les souris sauvages exprimant la molécule I-E, n'éliminent pas les lymphocytes T V β 17a⁺. Seules les souris de laboratoires I-E éliminent les V β 17a⁺. Ce phénomène est dû à la présence d'un polymorphisme aux positions 48 et 74 de la chaîne β du RcT (Cazenave *et al.*, 1990). La différence en position 74 contenue dans la région HV4 de la chaîne β empêche probablement l'interaction entre le SAg endogène et la chaîne V β 17 chez les souris sauvages. De plus, chez la souris il existe trois allèles de la V β 8.2. Les souris de laboratoire Mls-1^{a+} éliminent les V β 6, 7, 8.1 et 9 mais la V β 8.2a n'est pas supprimée. Par contre, les souris sauvages Mls-1^{a+} en plus des autres V β , éliminent la V β 8.2. Chez ces souris, les allèles b et c de la V β 8.2 sont présents (Pullen *et al.*, 1990). Des résidus de la chaîne V β 8.2, isolée des souris sauvages, capable de reconnaître Mls-1^a sont échangés par ceux d'une chaîne V β 8.2 de souris de laboratoire qui n'interagit pas avec le SAg. Ces substitutions ont permis de déterminer que la région HV4 (résidus 70 et 71) de la chaîne β et que le brin β B (résidu 22 précédant le CDR1) situé à proximité de la région HV4 sont impliqués dans la reconnaissance de Mls-1^a (Pullen *et al.*, 1990, 1991). Chez l'homme, les variations

alléliques existent chez les cellules T exprimant les V β 1, 2.1, 6.3, 6.7, 6.9, 21.4 et 25.1 (Robinson, 1989; Posnett, 1990; Li *et al.*, 1990; Charmley *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1994; Arden *et al.*, 1996). Un des exemple le mieux étudié est celui de la V β 6.7. La V β 6.7 possède les allèles a et b qui diffèrent par 2 substitutions d'acides aminés aux positions 38 et 72 de la région variable (Li *et al.*, 1990). D'autres polymorphismes se traduisent par des mutations ponctuelles introduisant un codon de terminaison, comme pour la V β 18 (Charmley *et al.*, 1993) tandis que pour la V β 3, un polymorphisme est présent dans la séquence signal de recombinaison (Posnett *et al.*, 1994). Ce polymorphisme se traduit par l'expression de faibles niveaux de V β 3 dans les cellules CD4 et CD8 chez 20 % des adultes (Donahue *et al.*, 1994). D'une part, les variations alléliques des régions variables du RcT peuvent avoir un effet positif en augmentant la diversité du répertoire de différentes espèces mais surtout chez des individus hétérozygotes pour les différents allèles de V β . D'autre part, le polymorphisme semble jouer un rôle dans la sensibilité des individus à développer certaines maladies auto-immunes. Par exemple, un allèle de la V β 6.1 est associé à l'arthrite rhumatoïde juvénile. Une seule substitution d'un a.a. empêche l'expression de l'allèle qui ne peut former un RcT fonctionnel aboutissant en un "trou" potentiel dans le répertoire des cellules T (Luyrink *et al.*, 1993). Ainsi non seulement, la taille des segments V β exprimés peut varier, mais aussi les polymorphismes peuvent avoir un effet important sur la fonction des cellules T.

1.2 De quelle façon le complexe CMH-peptide influence-t-il le répertoire des cellules T ?

Dans la première partie de notre étude, nous avons tenté de définir les facteurs régissant le maintien et les variations du répertoire des récepteurs T chez l'homme et sa possible modulation par des facteurs génétiques (**article 1**). Existe-t-il des superantigènes viraux endogènes chez l'homme pouvant provoquer des "trous" dans le répertoire ? Nous avons utilisé deux méthodes différentes et complémentaires afin d'analyser la structure et la dynamique du répertoire des cellules T : la

cytofluorométrie en flux et la technique de PCR quantitatif. Le répertoire $\alpha\beta$ des cellules T périphériques ou matures, résultant des processus de sélection thymique est influencé par les molécules du CMH. En effet, des frères et soeurs ayant les mêmes haplotypes au niveau de leur HLA possèdent un répertoire de récepteurs T beaucoup plus similaire au niveau de leurs lymphocytes T périphériques que des frères et soeurs n'ayant aucun haplotype en commun ou des individus n'ayant aucun lien de parenté (Gulwani-Akolkar *et al.*, 1991). De plus, le degré de similitude entre des jumeaux monozygotes et entre des frères et soeurs ayant le même HLA est comparable. Le complexe HLA semble être le composant génétique majeur influençant le répertoire des cellules T (Akolkar *et al.*, 1993, revue par Silver *et al.*, 1995). Pour ces raisons, nous avons examiné l'influence du complexe HLA sur le répertoire des cellules T chez deux individus n'ayant aucun lien de parenté entre eux et chez six paires de jumeaux monozygotes normaux en combinant deux techniques : la cytométrie en flux et le test de PCR quantitatif. Notre étude, plus complète, utilise 18 Ac monoclonaux V β spécifiques recouvrant 65 % du répertoire et démontre tout comme Gulwani-Akolkar et collaborateurs, des différences très marquées des répertoires CD4 et CD8 des cellules T entre les individus sans lien de parenté (Gulwani-Akolkar *et al.*, 1991; Akolkar *et al.*, 1993). Le rôle du CMH dans la sélection et le maintien d'un répertoire T fonctionnel est indiscutable. L'absence des molécules de classe I ($\beta 2m^{-/-}$) (Robey et Fowlkes, 1994) ou encore des molécules de classe II (CMH-II $^{-/-}$, Ii $^{-/-}$) (Cosgrove *et al.*, 1991; Viville *et al.*, 1993) aboutit respectivement à l'absence des cellules T CD8 $^{+}$ et CD4 $^{+}$. Comment le HLA peut-il affecter le répertoire des cellules T ? Les molécules du CMH-I et CMH-II sont par essence des transporteurs de peptides, et par voie de conséquence, ne sont jamais "vides". Il y a donc de fortes chances que la présence du peptide ancré dans le sillon des molécules CMH-I ou CMH-II ne soit pas anodine. Le rôle du peptide dans la sélection positive a été mis en évidence pour la première fois grâce à des souris possédant des mutations naturelles dans la molécule CMH-I ou CMH-II empêchant la liaison du peptide dans le sillon peptidique mais n'affectant pas la liaison avec le RcT (revue par Robey et Fowlkes, 1994). Les différents allèles du

CMH disposent de différents peptides dans leur sillon peptidique et ont ainsi une influence sur le répertoire des cellules T. De plus, différents peptides peuvent induire des changements de conformation dans le sillon peptidique des molécules du CMH-I. Ces changements de conformation peuvent affecter la reconnaissance du complexe CMH-peptide par le RcT (Fremont *et al.*, 1992). Si certaines régions variables interagissent mieux avec certains allèles du CMH, alors les différents haplotypes du HLA peuvent conduire à des altérations de l'expression des segments variables dans les cellules T périphériques. La mutation de certains résidus dans les boucles CDR1-2 du RcT affecte la reconnaissance du complexe peptide-molécules du CMH suggérant qu'il existe une interaction de ces régions avec les molécules du CMH (Hong *et al.*, 1992). Récemment, la structure cristallographique du complexe molécule HLA-A2 de classe I du CMH-peptide viral-RcT indique que les régions CDR1-2 (codées dans le génome) des deux chaînes du RcT interagissent avec les hélices α des domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ du CMH tandis que la région CDR3 (non codée dans le génome) des chaînes α et β du RcT interagit avec le peptide (Garboczi *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 1996). Des individus ayant des haplotypes différents au niveau de leur HLA auront un répertoire $V\alpha$ et $V\beta$ différent puisque les hélices α du CMH contacteront des résidus différents dans les régions CDR1-2 du RcT. Toutefois, il est difficile de discriminer à la lumière de ces études si le rôle des molécules du CMH et son influence sur le répertoire est dû aux peptides ou encore aux interactions RcT-CMH.

Le répertoire $V\beta$ dans les sous-populations CD4 et CD8 chez six paires de jumeaux monozygotes a été analysé par la technique de PCR quantitatif. Nos résultats montrent que les répertoires $V\beta$ dans les cellules CD4⁺ et dans les cellules CD8⁺ sont similaires chez les paires de jumeaux. La technique de cytofluorométrie montre également que le répertoire CD4 est tout à fait comparable au sein d'une paire de jumeaux par contre des différences sont notées dans la sous-population des cellules CD8⁺. Par exemple, chez une paire de jumeaux, une différence de 4,5 fois pour la $V\beta 5$ est présente dans la sous-population CD8. Ces différences pourraient être expliquées par

des stimulations antigéniques (virus, agents environnementaux) qui façonnent le répertoire T de façon continue. La diversité du répertoire CD8 est plus restreinte et a besoin d'amplifications mono-oligoclonales pour les réponses antivirales. Par contre, le répertoire CD4 semble beaucoup plus diversifié et plus régulé. Il est possible que le compartiment CD4 ait une dynamique très rapide de renouvellement des lymphocytes et que des expansions ne puissent pas être notées.

Par la suite, nous avons analysé par PCR le répertoire $V\alpha$ de jumeaux monozygotes. Les répertoires $V\alpha$ chez des frères et soeurs ayant le même HLA sont aussi différents que les répertoires $V\alpha$ chez des frères et soeurs ayant un génotype différent. Par contre, les jumeaux ont un répertoire $V\alpha$ plus similaire entre eux que des frères et soeurs possédant un génotype identique. Une explication possible pour des différences dans le répertoire $V\alpha$ serait qu'une grande proportion (>30 %) des cellules T périphériques possèdent deux chaînes α fonctionnelles et réarrangées (Malissen *et al.*, 1988; Casanova *et al.*, 1991; Padovan *et al.*, 1993). Si ces cellules sont sélectionnées dans le thymus sur la reconnaissance d'une des deux combinaisons $V\alpha V\beta$, alors la présence de la deuxième chaîne $V\alpha$ pourrait influencer le répertoire. Une autre explication serait que la chaîne $V\alpha$ vient en contact avec les régions moins polymorphes du CMH. La chaîne α du RcT permettrait de reconnaître le peptide présenté par les molécules de classe I et II du CMH tandis que la chaîne β du RcT serait capable de différencier les différents allèles des molécules du CMH. La structure cristallographique du RcT montre toutefois clairement que les deux chaînes α et β du RcT interagissent avec le CMH et le peptide (Garcia *et al.*, 1995; Garboczi *et al.*, 1996).

L'expression préférentielle de certaines régions V β soit dans les cellules CD4 ou soit dans les cellules CD8 a été démontrée chez la souris et plus récemment chez l'homme (Davey *et al.*, 1991; Grunewald *et al.*, 1991; Hawes *et al.*, 1993). Nos résultats montrent que les répertoires V α et V β dans les cellules CD4 et dans les cellules CD8 sont différents. Les cellules T exprimant la V β 6 chez les six paires de jumeaux étudiés et la V α 22 chez les trois paires de jumeaux étudiés sont utilisées de préférence par les cellules CD4⁺ tandis que les cellules T arborant la V β 7 sont utilisées de préférence par les cellules CD8⁺ seulement pour cinq paires de jumeaux, la paire AM-MM ne présente aucune expression préférentielle des cellules T V β 7 soit pour la population CD4 ou CD8. Par contre, les cellules T V α 7 chez les trois paires de jumeaux étudiés, sont utilisées de préférence par les cellules CD8⁺. Il existe peut-être une meilleure association entre certaines V α ou V β soit pour les molécules CMH-I ou soit pour les molécules CMH-II.

1.3 Existe-t-il des SAg endogènes dans le génome humain ?

Dans un premier temps, les résultats que nous avons obtenu, ne suggèrent pas la présence de SAg endogènes chez l'homme puisque des "trous" dans le répertoire n'ont pas pu être identifiés. La majorité des familles de régions V β du RcT chez l'humain sont constituées de plusieurs membres, il est peut-être difficile de détecter l'élimination des cellules T exprimant certaines régions V β du RcT. La limite de détection réside dans le choix des techniques utilisées dans l'analyse du répertoire V β . Ces études sont effectuées à l'aide d'Ac monoclonaux dirigés contre la région V β ou à l'aide d'oligonucléotides spécifiques pour les familles de régions V β du RcT. Les Ac monoclonaux ne couvrent que 65 % du répertoire de régions V β du RcT ce qui empêche de détecter l'effet possible d'un SAg endogène. L'utilisation d'oligonucléotides spécifiques pour les familles de régions V β ne permet pas de détecter une élimination des lymphocytes T exprimant un membre de cette famille V β . Même si ces techniques sont limitées, elles n'éliminent pas complètement la présence

possible d'un SAg endogène chez l'humain. De plus, les cellules T de rat ne semblent pas non plus être assujetties à une élimination par des SAg endogènes, ceci peut être expliqué également par le manque de réactifs plus spécifiques (Smith *et al.*, 1992). Chez la souris, il a fallu attendre la découverte des Ac anti-V β 8.2 et V β 8.3 afin de pouvoir distinguer l'effet du SAg *Mtv-7* sur la V β 8.1 (Pullen *et al.*, 1990). Des observations de Labrecque et collaborateurs proposent que la reconnaissance des SAg endogènes murins par les lymphocytes T humains et murins font intervenir les mêmes régions du RcT. Leurs résultats prouvent que les molécules de classe II humaines et les RcT humains possèdent toutes les caractéristiques permettant la reconnaissance des SAg endogènes de MMTV, ce qui évoque l'existence possible de SAg endogènes dans le génome humain (Labrecque *et al.*, 1993; Subramanyam *et al.*, 1993). Par ailleurs, cela suggère que des virus pathogènes chez l'humain pourraient utiliser ces mécanismes de stimulation lors de leur cycle viral, tout comme le rétrovirus MMTV. Dans un deuxième temps, nos résultats fournissent une ligne de base afin de pouvoir étudier les perturbations du répertoire des cellules T dans une pathologie.

Les MMTV intégrés dans le génome murin peuvent provoquer l'élimination des cellules T de la population thymique en agissant comme des SAg endogènes (Kappler *et al.*, 1988). Tous les humains ont intégré dans leur génome des séquences de rétrovirus endogènes humains (HERV). Même si ces éléments HERV représentent 1 % du génome humain et qu'ils sont apparentés au virus de MMTV, la présence de SAg endogènes dans le génome humain n'a pas encore été prouvée (Löwer *et al.*, 1996). L'identification de SAg endogènes chez l'humain permettra de déterminer l'influence de ces molécules sur le répertoire des lymphocytes T. Ces molécules pourraient jouer un rôle dans la sensibilité de certains individus à développer des maladies auto-immunes. L'influence de l'expression d'un SAg endogène sur le développement d'une maladie auto-immune a été décrite chez la souris (Anderson *et al.*, 1991). Des souris qui expriment *Mtv-7* sont moins susceptibles à développer une forme d'arthrite induite par le collagène que les souris *Mtv-7* négatives. L'élimination

des lymphocytes T exprimant une région V β capable de reconnaître un SAg endogène peut d'induire une protection contre la maladie. Chez l'homme, il n'existe pas de preuve directe qu'un SAg soit à l'origine d'une pathologie auto-immune. Toutefois, plusieurs observations permettent de soupçonner leur intervention. Un exemple en a été décrit en 1994 par Conrad *et al.* à partir de deux patients diabétiques insulino-dépendants (IDDM). Les biopsies révèlent l'infiltration préférentielle de lymphocytes T V β 7⁺ ayant une diversité jonctionnelle. De plus, ces V β 7 ne sont pas associées à des V α particulières. Les auteurs notent l'expansion de cette sous-population dans des cultures lymphocytaires d'individus non diabétiques incubées avec une préparation membranaire des cellules des îlots β des malades. Cette expérience tend à montrer que les cellules des îlots pancréatiques de ces malades expriment à leur surface un SAg. Récemment, la même équipe montre qu'un rétrovirus endogène humain est libéré des leucocytes des patients diabétiques. Ce nouveau rétrovirus est analogue à MMTV et code pour un SAg ayant des caractéristiques fonctionnelles semblables à celle de MMTV. Contrairement à MMTV, le SAg associé à l'IDDM est codé dans le gène *env* plutôt que dans le 3'LTR. Ce SAg semble être un candidat potentiel pour la progression d'une maladie auto-immune, le diabète (Conrad *et al.*, 1997). Il est encore tôt pour pouvoir évaluer l'importance des HERV sur le répertoire, il faut d'autres études génétiques et plus de réactifs pour confirmer leur rôle.

2.0 LA DYNAMIQUE ET LA STABILITÉ DU RÉPERTOIRE DES CELLULES T

L'analyse par PCR du répertoire V β des jumeaux monozygotes montre que le répertoire demeure stable pendant une année malgré les stimulations possibles par différents mitogènes. Les techniques de cytométrie et de PCR ne donnent toutefois qu'un aperçu macroscopique du répertoire. Des variations plus fines au niveau clonal ne sont pas mesurées par ces analyses. Les cellules T CD4 et CD8 circulent continuellement du sang à la lymphe et migrent vers la rate, les ganglions lymphatiques et les

plaques de Peyer. On distingue deux sous-populations majeures de lymphocytes T périphériques à des étapes différentes de leur maturation soit les lymphocytes naïfs et les lymphocytes mémoires. On différencie ces lymphocytes par l'expression des isoformes de CD45 et la présence ou l'absence du LNH (lymph node-homing receptor) ou L-sélectine (CD62L). Les cellules mémoires (CD45RO⁺, L-sélectine^{lo}) représentent une partie du répertoire des cellules T activées par des antigènes et montreront une fréquence plus élevée dans le sang (Tough et Sprent, 1994). Les cellules naïves (CD45RA⁺, L-sélectine^{hi}) ont une demi-vie plus courte et meurent si elles ne rencontrent pas l'antigène (Tough et Sprent, 1995). Au contraire, certains groupes montrent que les cellules naïves dominent le système immunitaire pendant plusieurs années et que ces cellules ont potentiellement une grande longévité (Sprent *et al.*, 1991). Alors que les cellules mémoires semblent augmenter lors du vieillissement d'un individu, les cellules naïves ne semblent pas disparaître et se renouvellent constamment ce qui soulève l'existence d'un thymus fonctionnel tout au long d'une vie. Il semble que les lymphocytes T naïfs et mémoires aient la même capacité et la même cinétique de réponse à l'antigène lorsque, par le biais de souris transgéniques contre le cytochrome C du pigeon, le nombre de cellules T (la fréquence) est maintenu identique (Constant *et al.*, 1994). Par contre, selon les travaux de Bruno *et al.*, (1995) à partir de souris transgéniques contre l'antigène H-Y, il semble que les cellules T mémoires prolifèrent plus vigoureusement à l'antigène H-Y que les cellules T naïves. Le débat portant sur la capacité de prolifération de chacune des populations, mémoires ou naïves, n'est donc pas encore clos. Une fois l'antigène rencontré, les cellules naïves se transforment en cellules mémoires (Sprent et Tough, 1994). Puisqu'un grand nombre de micro-organismes libèrent de puissants mitogènes comme les SA_g, la situation où les cellules naïves disparaissent rapidement et sont remplacées en des cellules mémoires peut être attribuée à une exposition continue à des agents infectieux et donc à une différenciation des cellules T naïves. Une stimulation immunitaire peut modifier le répertoire pendant plusieurs mois ou années. Ce maintien de la modification du répertoire est médiée par les cellules mémoires CD45RO⁺. Le

renouvellement et la demi-vie des populations lymphocytaires peuvent affecter le répertoire des cellules T. Le répertoire des cellules T est donc dynamique et subit constamment des changements. Dans certaines conditions, comme une infection au VIH, l'élimination des cellules CD4 peut entraîner une diminution des cellules CD4 naïves aboutissant à des perturbations sévères du répertoire CD4 pouvant ainsi créer des "trous" dans ce répertoire.

3.0 LE RÉPERTOIRE DES CELLULES T ET LE VIH

L'infection au VIH se traduit par une déplétion continue des cellules T appartenant au sous-type CD4⁺ auxiliaire (Dalglish *et al.*, 1984). Cette déplétion des cellules CD4 dans le sang périphérique et dans les organes lymphoïdes finit par engendrer chez le patient un état d'immunodéficience appelé SIDA aboutissant à une susceptibilité accrue aux pathologies opportunistes dont les conséquences sont mortelles. L'étude du répertoire T suite à une infection par le VIH et sa relation avec la pathogenèse et la rapidité à laquelle les cellules CD4 sont éliminées a été concentrée sur deux approches : soit de déterminer l'oligoclonalité de la réponse antivirale de l'hôte ou soit de chercher des preuves de la présence d'un SAg viral codé par le VIH. Bien que le thème de la présence d'un SAg dans le VIH ait été étudié de façon exhaustive, il n'existe que très peu de consensus pour qu'un seul gène de VIH puisse agir comme un SAg (Westby *et al.*, 1996). La première observation d'une élimination des V β 14 à V β 20 chez des patients symptomatiques, basée sur une méthode de PCR, n'a pu être confirmée (Imberti *et al.*, 1991). Lorsque le niveau de cellules T est faible, comme chez des patients présentant une lymphopénie, les familles V β ayant peu de membres ne produisent peut-être pas assez d'ARN pour une amplification par PCR, ce qui expliquerait les résultats du groupe d'Imberti *et al.*, (1991). Plusieurs autres travaux ont montré des changements dans le répertoire V β mais sans jamais atteindre de consensus (Dalglish *et al.*, 1992; Hodara *et al.*, 1993; Soudeyans *et al.*, 1993, 1994; McCoy *et al.*, 1995; revue par Ciurli *et al.*, 1996; revue par Cossarizza *et al.*, 1997).

De plus, d'autres groupes n'ont montré aucune expansion de V β , ni d'élimination V β chez des patients infectés (Posnett *et al.*, 1993b; Boyer *et al.*, 1993).

Ces résultats sont plus que contradictoires car la population humaine est hétérogène et le complexe HLA influence le répertoire des cellules T. Nous avons contourné cet obstacle en comparant les répertoires V β de neuf paires de jumeaux monozygotes de génotypes identiques mais discordants pour l'infection par le VIH par PCR quantitative et par cytométrie en flux (**article 2**). Une analyse comparative du répertoire V β des cellules CD4⁺ entre les jumeaux VIH⁺ et les jumeaux VIH⁻ montre des perturbations asynchrones et non pas des suppressions des cellules T V β 2, 12, 13 et 21 chez les jumeaux VIH⁺. De plus, le nombre de segments V β est inversement proportionnel au nombre de cellules T CD4⁺. Plus le nombre de cellules CD4⁺ présent est faible, plus le nombre des segments V β est perturbé. Ainsi, nos résultats révèlent de grandes perturbations du répertoire durant la progression de la maladie pouvant peut-être éventuellement créer des "trous" dans le répertoire.

3.1 Peut-on survivre avec des "trous" dans le répertoire des cellules T ?

Chez la souris normale, le répertoire est de l'ordre d'environ 10¹⁸ combinaisons possibles de RcT $\alpha\beta$ (Davis et Bjorkman, 1988). Cette grande diversité permet une reconnaissance par les cellules T d'un nombre considérable d'antigènes bactériens, viraux et d'épitopes allogéniques. Il est possible de suggérer que l'évolution sélectionnerait des souris ayant des répertoires de cellules T très vastes. Ces animaux sont probablement capables de reconnaître et d'interagir avec divers pathogènes environnementaux. Par conséquent, il fut étonnant de découvrir que toutes les souris n'utilisaient pas la totalité de leurs RcT exprimés. La majorité des souris congéniques de laboratoire sont d'haplotype RcT V β^b et possèdent environ 20 segments de gènes V β dans leur répertoire (Pullen *et al.*, 1990). Un certain nombre de souris de laboratoire, telles les souris SJL montrent des lacunes de 50 % des segments V β de

leur répertoire. Il a été montré que des souris sauvages homozygotes pour une grande délétion au niveau de leur locus V β possèdent également des “trous” dans leur répertoire. La souris DDO en est un exemple, cette dernière élimine 20 segments de gènes V β sur 29 lorsqu’on la compare à la souris BALB/c (Jouvin-Marche *et al.*, 1989). Ces deux souches de souris soit les souris de laboratoire et les souris sauvages ne présentent aucune immunodéficiência, ni de maladies auto-immunes et survivent très bien avec un répertoire V β réduit. Ceci évoque une flexibilité du RcT permettant de compenser pour une perte de plus de 50 % des segments V β du répertoire (Behlke *et al.*, 1986). Une vie normale est possible même en absence de certaines familles V β . L’établissement et le maintien du répertoire T chez la souris sont des phénomènes dynamiques et flexibles puisqu’ils réussissent à surmonter l’absence d’expression de plusieurs molécules.

Comme nous venons de le mentionner, il est possible pour une souris de survivre avec des “trous” dans son répertoire. Par contre, il est nécessaire d’avoir un répertoire intègre et complet pour répondre efficacement aux infections. Des souris transgéniques exprimant un seul RcT spécifique peuvent répondre à des stimuli antigéniques, mais leur réponse est quantitativement plus faible que celle retrouvée chez les souris contrôles. Ces résultats montrent la grande flexibilité du RcT permettant aux cellules T des souris transgéniques de répondre aux différents antigènes testés. Par contre, la faible réponse de ces souris peut les empêcher de se défendre contre des pathogènes (Listman *et al.*, 1996). Des souris congéniques de laboratoire exprimant le SAg de MMTV (Mls-1^a) sont sensibles aux tumeurs induites par le virus du polyome. Chez ces souris, la présence de Mls-1^a abolit l’immunosurveillance des tumeurs en éliminant les cellules T cytotoxiques V β spécifiques qui contrôlent l’infection par le virus du polyome (Lukacher *et al.*, 1995). D’une part, la présence de provirus intégrés dans le génome permet aux souris de se protéger contre l’infection exogène par les MMTV, d’autre part ces souris risquent d’être infectées par d’autres agents infectieux. Il s’avère important de maintenir un équilibre entre un

répertoire étendu et un répertoire présentant des “trous” suite à des infections. Récemment, l'étude du répertoire des RcT ainsi que les caractéristiques des régions CDR3 du RcT ont permis de détailler la cinétique d'expansion de clonotypes des lymphocytes T spécifiques au VIH. Certains individus développent une réponse lymphocytaire cytotoxique polyclonale contre le virus alors que d'autres génèrent une réponse plus restreinte à un ou plusieurs clonotypes (Pantaleo *et al.*, 1994). Les individus qui développent une réponse immunitaire plus diversifiée progressent plus lentement vers la phase SIDA (Pantaleo *et al.*, 1997).

Récemment, Connors *et al.*, (1997) ont examiné les changements dans le phénotype des cellules CD4 et l'élimination de celles-ci dans le répertoire par la technique d'immunoscope qui mesure les longueurs des régions CDR3 durant une infection au VIH suivie d'une thérapie. Il remarquent que les cellules CD4 naïves diminuent lorsque la maladie progresse. Suite à une thérapie aux inhibiteurs de protéase et à l'Il-12, les cellules CD4 augmentent seulement si elles sont présentes avant la thérapie. Leurs résultats montrent que l'élimination des cellules CD4 induite par le VIH résulte en une chute des cellules naïves causant des perturbations sévères du répertoire CD4. De plus, les modifications à la distribution normale des longueurs de CDR3 n'est pas rectifiée après l'initiation de la thérapie, même lorsque le nombre de cellules CD4⁺ augmente de façon significative chez les patients. La diversité de chaque population V β est perdue chez les patients et cette perte est presque permanente, même en présence de thérapie permettant d'augmenter les comptes de cellules T CD4⁺. Le thymus est sans doute la seule source de diversité pour les cellules CD4⁺, donc la seule façon de retrouver la diversité du compartiment CD4⁺ et l'immunocompétence. Ceci peut poser un problème chez des patients VIH plus âgés n'ayant plus de rendement thymique ou chez qui la régénération via le thymus a été interrompue par les effets cytopathiques du virus.

3.2 Les perturbations dans le répertoire durant une infection à VIH sont-elles le résultat d'une réponse immunitaire cytotoxique ?

Des travaux ont permis de démontrer l'existence d'une dynamique rapide d'expansion et d'élimination de clonotypes parmi les lymphocytes T chez les individus infectés par le VIH. Lors de la réponse primaire contre le VIH, des expansions sont observées dans les compartiments lymphocytaires T CD4 et CD8. Les expansions transitoires au niveau des lymphocytes T CD8 (portant l'activité cytotoxique dirigée contre un épitope précis du VIH) sont caractérisées par une surreprésentation et une persistance de quelques clonotypes spécifiques. Une telle tendance n'est pas observée pour le compartiment CD4, suggérant probablement une dynamique très rapide de remplacement des lymphocytes dans ce compartiment (Ho *et al.*, 1995; Perelson *et al.*, 1996). Une analyse longitudinale de la prévalence relative des clonotypes CD8 au sein d'un même patient, a permis de démontrer que le répertoire clonotypique variait considérablement au cours de la primo-infection. Ainsi la disparition rapide de clones cytotoxiques au VIH pourrait être mise en évidence et ce, en l'absence de variations dans la séquence des épitopes reconnus par ces clones. Il est très probable que la plupart de ces clones cytotoxiques sont éliminés par un processus nommé épuisement clonal (von Boehmer, 1993; Moskophidis *et al.*, 1993). Ce mécanisme pourrait être médié par un processus apoptotique, résultant d'une stimulation continue avec de hauts niveaux d'Ag. L'épuisement clonal induit par un virus pourrait faire la différence entre la résolution immédiate et la persistance de l'infection virale (Moskophidis *et al.*, 1993). Il est possible que l'épuisement clonal contribue à la réduction du répertoire immunologique capable de répondre au VIH.

Même si l'établissement de la mémoire cytotoxique est parfois indépendante de l'activité du compartiment CD4, il est possible que le mauvais fonctionnement des cellules auxiliaires puisse empêcher l'établissement efficace du compartiment mémoire (Di Rosa et Matzinger, 1996). De plus, la diversité du répertoire immunitaire des lymphocytes CD4⁺ est endommagée par cette élimination rapide. Cette diversité est perdue, peu importe les thérapies utilisées par la suite (Connors *et al.*, 1997; Autran *et*

al., 1997). Il est essentiel alors de s'attaquer au virus le plus tôt possible par des traitements visant à contrôler la réplication virale et à reconstituer le système immunitaire.

4.0 MODÈLE DU COMPLEXE TRIMOLÉCULAIRE CMH-SAG VIRAL-RcT

Comme nous n'avons pas pu identifier la présence de SAg viral endogène chez l'homme, nous avons étudié l'interaction entre un SAg viral murin et des cellules T humaines (**article 3**). Les SAg codés par les MMTV stimulent une grande proportion de cellules T en interagissant avec la région HV4 de la chaîne β du RcT (Pullen *et al.*, 1990, 1991). La région HV4 est l'élément déterminant dans la reconnaissance des SAg viraux, il est alors possible que les V β ayant une affinité moindre pour le SAg deviennent dépendantes d'un rapprochement entre le RcT et le CMH. Plusieurs gènes fonctionnels V β montrent un polymorphisme allélique au niveau du RcT. Les V β 6.7a (BV6S7*1) et les V β 6.7b (BV6S7*2) diffèrent d'un acide aminé dans la région HV4 impliquée dans la réponse aux SAg de MMTV (Li *et al.*, 1990). De manière à savoir si le polymorphisme allélique du RcT influence la réponse à *Mtv-9*, nous avons utilisé un système expérimental dans lequel des cellules T des individus homozygotes pour l'allèle a et b de la V β 6.7 sont stimulées par un SAg murin. Nous avons découvert que le SAg *Mtv-9* stimule préférentiellement les cellules T humaines V β 6.7 positives. Les lymphocytes T V β 6.5 positifs sont également stimulés mais plus faiblement et révèlent un biais dans leur région J β et CDR3. Ce biais présent dans la région CDR3 des lymphocytes T exprimant la V β 6.5 évoque la possibilité qu'une interaction *Mtv-9*-MHC-RcT pourrait être analogue à une interaction antigène classique-MHC-RcT.

4.1 La région J β du RcT est-elle un site de liaison pour le SAg viral ?

Chez des souris ayant le même CMH mais qui diffèrent par l'absence de Mls-1^{a+}, l'analyse des séquences de segments J β dans de cellules V β 6⁺CD4⁺ qui survivent l'élimination par Mls-1^a montre un biais dans leur J β et dans la longueur des CDR3 (Chies *et al.*, 1995). Lorsque le transgène E α est introduit dans la souris SJL (qui n'exprime pas de molécules I-E et ne peut alors présenter le SAg *Mtv-9*) cette souris présente *Mtv-9* et élimine les V β 17 réagissant au SAg (Candéias *et al.*, 1991). Les cellules T qui ont survécu à l'élimination par le SAg *Mtv-9* présentaient un biais dans leur région J β ce qui suggère que certaines régions J β influencent la réactivité des cellules T au SAg *Mtv-9* (Candéias *et al.*, 1991). Nos résultats appuient les données précédentes mais en plus, fournissent des évidences que la structure du CDR3 joue un rôle positif dans la stimulation des SAg viraux. Nos résultats montrent que la région J β joue un rôle important dans la reconnaissance des SAg viraux. Cette région ne semble pas un site de liaison pour les SAg viraux puisque la structure cristallographique du RcT complexé à un peptide viral et son CMH montre clairement que la région J β est située sur la face opposée de la région HV4 (Garboczi *et al.*, 1996). Le biais observé suite à la stimulation par *Mtv-9* est peut-être dû à l'interaction entre le RcT et le peptide localisé dans le sillon peptidique car au moins 4 résidus de l'ADN génomique du segment J β contribuent à la portion C-terminale du CDR3. Comme les deux individus homozygotes pour l'allèle V β 6.7b, possèdent des CDR3 totalement différents, le segment J β ne semble pas être un site de liaison pour le SAg *Mtv-9*.

4.2 Le biais observé dans la région CDR3 : un peptide dominant ou un peptide interne de MMTV ?

Les différents CDR3 retrouvés chez les deux donneurs homozygotes pour les cellules T V β 6.7b peut s'expliquer par le fait que dans nos expériences, les cellules présentatrices de l'antigène utilisées présentent différents peptides. Il serait alors possible qu'un peptide dominant pourrait être reconnu par les deux RcT car il a été

démonstré que des RcT possédant une région variable identique mais une région CDR3 différente peuvent interagir avec le même peptide complexé à son CMH (Boitel *et al.*, 1992). Le biais retrouvé dans la région CDR3 peut s'expliquer soit par une réponse allogénique surimposée par un SAg viral (*Mtv-9*), soit par une réponse superantigénique spécifique seulement. Puisque la réponse allogénique est médiée par le peptide alors la topologie de l'interaction CMH-RcT-peptide est analogue à la topologie du complexe CMH-RcT-peptide durant une réponse antigène spécifique (revue par Matis, 1990; revue par Bjorkman, 1997). Les individus homozygotes pour la V β 6.7b expriment des molécules du CMH différentes (donneur S est homozygote pour l'allèle DR7 tandis que le donneur M est DR2/DR7) que la molécule du CMH HLA-DR1 présente à la surface des cellules présentatrices de l'antigène. Les SAg viraux sont des protéines transmembranaires de type II comme la chaîne invariante et celle-ci est étroitement associée aux molécules de classe II du CMH et se retrouve intacte dans leur sillon peptidique. Il est possible que les SAg viraux se fixent dans le sillon peptidique du CMH, et de cette façon les RcT reconnaîtraient les SAg viraux comme un peptide interne. Pour distinguer entre ces deux possibilités, les cellules T d'un donneur seront stimulées avec le SAg viral *Mtv-9* présenté par des CPAg exprimant différents allèles du CMH. Les différents allèles du CMH disposent de différents peptides dans leur sillon peptidique. Si l'analyse des séquences protéiques de chaînes β du RcT montre un même biais dans la région CDR3 pour le donneur, ceci suggère que le RcT reconnaît un peptide interne de MMTV. Si le biais est différent, ceci suggère que le RcT reconnaît un peptide endogène présenté par les différents allèles du CMH. Une région sur le MMTV possède des motifs analogues à un fragment de la chaîne invariante nommé CLIP et présent dans le sillon des dimères $\alpha\beta$. La mutagenèse des résidus du peptide interne de MMTV pourrait révéler l'identité du peptide présent dans le sillon peptidique. Les cellules T d'un donneur sont stimulées soit avec une CPAg exprimant le *Mtv-9* de type sauvage, soit le *Mtv-9* muté. L'analyse des séquences de la chaîne β du RcT montre des biais lorsqu'on compare le type sauvage

au muté, ces résultats prouveraient que le RcT reconnaît un peptide interne du MMTV.

Les clonotypes dominants retrouvés dans les cellules T stimulées par le SAg *Mtv-9* chez les donneurs S et M ne représentent pas une conséquence d'une réponse allogénique puisque le nombre de ces clonotypes se trouve à une fréquence très faible dans la population contrôle (PHA). Le fait qu'un clonotype (ELAGG) représentant 27% des cellules V β 6.5 dans la population PHA, totalement absent de la population stimulée, montre clairement que des cellules T potentiellement réactives ne sont pas responsables pour l'amplification oligoclonale. Nous favorisons plutôt l'hypothèse que le RcT reconnaît un peptide dominant ou bien que le *Mtv-9* lui-même se retrouve dans le sillon peptidique pouvant ainsi expliquer la diversité jonctionnelle des clonotypes amplifiés. Le phénomène de cellules T potentiellement réactives pourrait avoir des implications importantes dans des pathologies humaines telles que l'auto-immunité. La stimulation d'une forte proportion de lymphocytes T par les SAg pourrait par exemple activer certaines cellules T auto-réactives qui ont échappé aux mécanismes de tolérance. L'activation de ces lymphocytes T auto-réactifs pourrait initier le processus d'auto-immunité. L'amplification préférentielle de lymphocytes T exprimant certaines régions V β du RcT a été observée chez des patients atteints de maladies auto-immunes comme l'arthrite et la sclérose en plaques (Paliard *et al.*, 1991; Sottini *et al.*, 1991). Récemment, un SAg codé par un rétrovirus endogène humain semble jouer un rôle critique dans la progression d'une maladie auto-immune, le diabète insulino-dépendant (Conrad *et al.*, 1997).

4.3 L'interaction CMH-SAg viral-RcT est-elle analogue à une interaction CMH-peptide-RcT ?

Des études de mutagenèse dans la région CDR1 de la V β 6 chez la souris montrent l'abolition d'une reconnaissance à Mls-1^a, et d'un antigène conventionnel (Kang *et al.*, 1994). Notre modèle propose que l'interaction entre le RcT et le CMH

durant une réponse superantigénique est similaire à celle d'une réponse antigénique normale où les régions CDR1 et CDR2 des chaînes α et β du RcT interagissent avec le CMH et les régions CDR3 avec le peptide. Les familles de V β ayant une affinité moindre pour un SAg viral nécessitent une compensation fournie par des interactions entre le RcT, le CMH et le peptide. La superposition de la structure de la toxine bactérienne SEC₂ complexée au RcT sur la structure de SEB complexée à HLA-DR1 suggère que ces SAg agissent comme un levier entre le RcT et le CMH où seulement une région de la chaîne α du RcT contacte la molécule du CMH (Fields *et al.*, 1996). Ces données structurales et fonctionnelles suggèrent que l'orientation RcT-CMH durant la reconnaissance des SAg viraux est différente d'une interaction avec des SAg bactériens mais similaire à une interaction antigène classique. La structure cristallographique d'un complexe CMH-SAg viral-RcT permettra de mieux comprendre ces interactions moléculaires.

CHAPITRE 6

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les travaux effectués au cours de cette thèse, nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui influencent le répertoire des cellules T chez l'homme. Des facteurs endogènes tels le polymorphisme allélique du RcT, le complexe CMH-peptide, et récemment, la découverte d'un SAg codé par un rétrovirus endogène humain peuvent affecter le répertoire de cellules T chez l'homme.

L'analyse du répertoire des cellules T par les techniques de cytofluorométrie et de PCR, nous a permis d'identifier l'expression des régions V α et V β dans les populations de cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Nos résultats révèlent la présence de différences très marquées dans les répertoires des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ entre des individus n'ayant aucun lien de parenté. Puisque la population humaine est hétérogène et que le complexe HLA influence le répertoire des cellules T, nous avons contourné cet obstacle en étudiant le RcT chez des jumeaux monozygotes qui possèdent les mêmes allèles au niveau du CMH. Le répertoire V β dans les cellules CD4⁺ est comparable au sein d'une paire de jumeaux mais des différences sont notées dans les cellules CD8⁺. De plus, des familles distinctes des régions variables α et β sont représentées de façon différentielle chez les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Au niveau macroscopique le répertoire demeure stable de manière continue. L'analyse de la diversité du répertoire aurait permis de mieux visualiser les variations fines au niveau clonal. Au niveau microscopique, le répertoire des cellules T est dynamique et subit constamment des modifications pouvant jouer un rôle critique sur la sensibilité ou la résistance à des pathologies ou des agents infectieux.

Les virus sont des éléments qui peuvent perturber le répertoire. Les virus codent non seulement pour des antigènes qui stimulent des réponses spécifiques à des peptides viraux mais ils codent pour des SAg qui stimulent une forte proportion de lymphocytes T exprimant les régions V β du RcT appropriées. L'influence des SAg sur le répertoire, leur rôle possible dans la pathogenèse de quelques maladies nécessitent une compréhension plus approfondie de leur mode d'interaction avec les

cellules T. Puisque les mécanismes moléculaires de reconnaissance des SAg endogènes de MMTV, intégrés dans le génome de la souris sont conservés chez l'homme et la souris, ces résultats soulèvent la possibilité que le génome humain code pour des SAg endogènes. La stimulation de lymphocytes T provenant de différents individus avec les SAg de MMTV permettra éventuellement d'identifier des individus qui ne répondent pas à ce stimulus ou bien qui n'utiliseront pas certaines régions V β durant cette réponse. L'absence de réponse chez un individu pourrait expliquer la présence d'un SAg endogène qui provoque l'élimination des lymphocytes T V β spécifiques répondant au SAg de MMTV. Les techniques utilisées dans notre étude sont limitées et n'ont pas permis d'identifier des "trous" dans le répertoire et donc la présence de SAg endogènes. Récemment, un SAg codé dans l'enveloppe d'un rétrovirus endogène humain a été découvert (Conrad *et al.*, 1997). Ce SAg stimule les cellules T V β 7⁺ et semble jouer un rôle dans la progression du diabète. L'équipe de Conrad *et al.*, (1997) ne montre pas de "trous" dans le répertoire des cellules T, puisque les cellules T V β 7⁺ sont stimulées et non pas supprimées. L'élimination des lymphocytes T exprimant une régions V β capable de reconnaître un SAg endogène pourrait conférer une résistance au développement d'une maladie auto-immune. La suppression d'un ensemble de lymphocytes T exprimant certaines régions V β du RcT chez un individu peut éliminer les lymphocytes T potentiellement auto-réactifs. Par exemple, si un SAg pourrait éliminer les cellules T V β 7⁺ amplifiées chez les jeunes enfants prédisposés au diabète insulino-dépendant, il serait possible d'induire une protection à la maladie.

Au niveau clinique, les superantigènes peuvent jouer un rôle important comme outil thérapeutique. Il est connu que *Staphylococcus aureus* libère des toxines avec des propriétés superantigéniques. Ces toxines bactériennes associées à des pathologies chez l'homme perturbent le système immunitaire. Il a été montré que l'effet émétique des toxines peut être dissocié de l'effet mitogénique (Harris *et al.*, 1993). Une protéine hybride composée d'un anticorps spécifique pour un antigène tumoral et de la

toxine SEA est une stratégie permettant de cibler des cellules cancéreuses (Kalland *et al.*, 1993; Dohlsten *et al.*, 1994). Les cellules cancéreuses sont reconnues et détruites par les cellules T réactives à SEA. Au niveau fondamental, notre travail ouvre plusieurs pistes dans la compréhension des interactions moléculaires lors d'une réponse superantigénique. Nous proposons que des familles de V β ayant une affinité moindre pour un SAg viral nécessitent une compensation fournie par des interactions entre le RcT, le CMH et le peptide. De plus l'interaction CMH-SAg viral-RcT serait analogue à celle d'une interaction CMH-peptide-RcT. La production de co-cristal formé du complexe CMH-SAg viral-RcT permettra de déterminer les interactions moléculaires entre ces protéines.

CHAPITRE 7

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1994a). General properties of immune responses. In Cellular and Molecular Immunology 2nd edition. W.B. Saunders Company, ed (USA), pp.4-13.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1994b). Antigen processing and presentation to T lymphocytes. In Cellular and Molecular Immunology 2nd edition. W.B. Saunders Company, ed (USA), pp.128-132.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1994c). T cell maturation in the thymus. In Cellular and Molecular Immunology 2nd edition. W.B. Saunders Company, ed (USA), p.176.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1994d). Effector mechanisms of T cell-mediated immune reactions. In Cellular and Molecular Immunology 2nd edition. W.B. Saunders Company, ed (USA), pp.262-277.
- Abe, R., Ryan, J.J., et Hodes, J.J. (1987). Clonal analysis of the Mls system. *J.Exp.Med.* 165, 1113-1129.
- Abe, R., et Hodes, R.J. (1988). The Mls system: non-MHC genes that encode strong T-cell stimulatory determinants. *Immunol. Today* 9, 230-253.
- Abrahmsen, L., Dohlstein, M., Segren, S., Bjork, P., Jonsson, E., et Kalland, T. (1995). Characterization of two distinct MHC class II binding sites in the superantigen staphylococcal enterotoxin A. *EMBO J.* 14, 2978-2986.
- Acha-Orbea, H., Shakhov, A.N., Scarpellino, L., Kolb, E., Muller, V., Vessaz-Shaw, A., Fuchs, R., Blochlinger, K., Rollini, P., Billotte, J., Sarafidou, M., MacDonald, H.R., et Digglemann, H. (1991). Clonal deletion of V β 14-bearing T cells in mice transgenic for mammary tumor virus. *Nature* 350, 207-211.
- Acha-Orbea, H., Scarpellino, L., Shakhov, A.N., Held, W., et MacDonald, H.R. (1992). Inhibition of mouse mammary tumor virus-induced T cell responses *in vivo* by antibodies to an open reading frame protein. *J.Exp.Med.* 176, 1769-1772.
- Acha-Orbea, H., Held, W., Waanders, G.A., Shakhov, A.N., Scarpellino, L., Lees, R.K., et MacDonald, H.R. (1993). Exogenous and endogenous mouse mammary tumor virus superantigens. *Immunol.Rev.* 131, 5-25.
- Acha-Orbea, H. (1995). Superantigens and tolerance. In T cell receptors. J.I. Bell, M.J. Owen, E. Simpson, Oxford University Press, ed (USA), pp.224-265.
- Acha-Orbea, H., et MacDonald, H.R. (1995). Superantigens of mouse mammary tumor virus. *Annu.Rev.Immunol.* 13, 459-486.

- Acharya, K.R., Passalacqua, E.F., Jones, E.Y., Harlos, K., Stuart, D.I., Brehm, R.D., et Tranter, H.S. (1994). Structural basis of superantigen action inferred from crystal structure of toxic-shock syndrome toxin-1. *Nature* *367*, 94-97.
- Akolkar, P.N., Gulwani-Akolkar, B., Pergolizzi, R., Bigler, R.D., et Silver, J. (1993). Influence of HLA genes on T cell receptor V segment frequencies and expression levels in peripheral blood lymphocytes. *J.Immunol.* *150*, 2761-2773.
- Akolkar, P.N., Chirmule, B., Gulwani-Akolkar, B., Pahwa, S., Kalyanaraman, V.S., Pergolizzi, R., MacPhail, S., et Silver, J. (1995). V β -specific activation of T cells by the HIV glycoprotein gp160. *Scand.J.Immunol.* *41*, 487-498.
- Altman A., Mustelin, T., et Coggeshall, K.M. (1990). T lymphocyte activation: A biological model of signal transduction. *Crit.Rev.Immunol.* *10*, 247-391.
- Anderson, G.D., et David, C.S. (1989). *In vivo* expression and function of hybrid Ia dimers (E α A β) in recombinant and transgenic mice. *J.Exp.Med.* *170*, 1003-1008.
- Anderson, G.D., Banerjee, S., Luthra, H.S., et David, C.S. (1991). Role of Mls-1 locus and clonal deletion of T cells in susceptibility to collagen-induced arthritis in mice. *J.Immunol.* *147*, 1189-1193.
- Anderson, M.S., et Miller, J. (1992). Invariant chain can function as a chaperon protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* *89*, 2282-2286.
- Appleby, M.W., Gross, J.A., Cooke, M.P., Levin, S.D., Qian, X., et Perlmutter, R.M. (1992). Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59^{lck}. *Cell* *70*, 751-763.
- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., et Mak, T.W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* *42*, 455-500.
- Atkin, C.L., Cole, B.C., Sullivan, G.J., Washburn, L.R., et Wiley, B.B. (1986). Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*. *J.Immunol.* *137*, 1581-1589.
- Autran, B., Carcelain, G., Li, T.S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debré, P., et Leibowitch, J. (1997). Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4⁺ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* *277*, 112-116.
- Baccala, R., Kono, D.H., Walker, S., Balderas, R.S., et Theofilopoulos, A.N. (1991). Genomically and somatically modified human thymocyte V β gene repertoires. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* *88*, 2908-2912.

- Bakke, O., et Dobberstein, B. (1990). MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartment. *Cell* 63, 707-716.
- Banda, N.K., Bernier, J., Kurahara, D.K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sékaly, R.-P., et Finkel, T.H. (1992). Crosslinking of CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J.Exp.Med.* 176, 1099-1106.
- Baniyash, M., Garcia-Morales, P., Bonifacio, J.S., Samelson, L.E., et Klausner, R.D. (1988). Disulfide linkage of the ζ and η chains of the T cell receptor: possible identification of two structural classes of receptors. *J.Biol.Chem.* 263, 9874-9878.
- Behlke, M.A., Chou, H.S., Huppi, K., et Loh, D.Y. (1986). Murine T-cell receptor mutants with deletions of β -chain variable region genes. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 83, 767-771.
- Bellio, M., Lone, Y.C., de la Calle-Martin, O., Malissen, B., Abastado, J.P., et Kourilsky, P. (1994). The V beta complementary determining region 1 of a major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted T cell receptor is involved in the recognition of peptide/MHC I and superantigen/MHC II complex. *J.Exp.Med.* 179, 1087-1097.
- Bentley, G.A., Boulot, G., Karjalainen, K., et Mariuzza, R.A. (1995). Crystal structure of the β chain of a T cell antigen receptor. *Science* 267, 1984-1987.
- Bergdoll, M.S. (1985). The staphylococcal enterotoxins-an update. In G. Fisher, ed (New York: Verlag), pp.247-254.
- Beutner, U., Frankel, W.N., Cote, M.S., Coffin, J.M., et Huber, B.T. (1992). MIs-1 is encoded by the long terminal repeat open reading frame of the mouse mammary tumor provirus *Mtv-7*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 89, 5432-5436.
- Beutner, U., Kraus, E., Kitamura, D., Rajewsky, K., et Huber, B.T. (1994). B cells are essential for murine mammary tumor virus transmission, but not for presentation of endogenous superantigens. *J.Exp.Med.* 179, 157-1466.
- Bhardwaj, V., Kumar, V., Geysen, H.M., et Sercarz, E.E. (1993). Degenerate recognition of a dissimilar antigenic peptide by myelin basic protein-reactive T cells. *J.Immunol.* 151, 5000-5010.
- Bhardwaj, N., Hodtsev, A.S., Nisanian, A., Kabak, S., Friedman, S.M., Cole, B.C., et Posnett, D.N. (1994). Human T-cell responses to *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen. *Infect.Immun.* 62, 135-144.

- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., et Wiley, D.C. (1987). The foreign antigen site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329, 512-518.
- Bjorkman, P.J., et Parham, P. (1990). Structure, function, and diversity of major histocompatibility complex molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 59, 253-288.
- Bjorkman, P.J. (1997). MHC restriction in three dimensions: A view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 89, 167-170.
- Blackman, M.A., Gerhard-Burgert, H., Woodland, D.L., Palmer, E., Kappler, J.W., et Marrack, P. (1990). A role for clonal inactivation in T cell tolerance to Mls-1^a. *Nature* 345, 540-542.
- Blackman, M.A., Lund, F.E., Surman, S., Corley, R.B., et Woodland, D.L. (1992). Major histocompatibility complex-restricted recognition of retroviral superantigens by V β 17⁺ T cells. *J.Exp.Med.* 176, 275-280.
- Blackman, M.A., et Woodland, D.L. (1996). Role of the T cell receptor α -chain in superantigen recognition. *Immunol.Res.* 15, 98-113.
- Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R. Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A., et Jackson, S.P. (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with murine *scid* mutation. *Cell* 80, 813-823.
- Boitel, B., Ermonval, M., Panina-Bordignon, P., Mariuzza, R.A., Lanzavecchia, A., et Acuto, O. (1992). Preferential V β gene usage and lack of junctional sequence conservation among human T cell receptors specific for a tetanus toxin-derived peptide: Evidence for a dominant role of a germline-encoded V region in antigen/major histocompatibility complex recognition. *J.Exp.Med.* 175, 765-777.
- Borrero, H., Donson, D., Cervera, C., Rexer, C., et Macphail, S. (1995). T cell receptor V alpha 4 is expressed by a subpopulation of V beta 6 T cells that respond to the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B. *J.Immunol.* 154, 4247-4260.
- Bowness, P., Moss, P.A.H., Tranter, H., Bell, J.A., et McMichael, A.J. (1992). Clostridium perfringens enterotoxin is a superantigen reactive with V β 6.9 and V β 22. *J.Exp.Med.* 176, 893-896.
- Boyer, V., Smith, L.R., Ferre, F., Pezzoli, P., Trauger, R.J., Jense, F.C., et Carlo, D.J. (1993). T cell receptor V β repertoire in HIV-infected individuals: lack of evidence for selective V β deletion. *Clin.Exp.Immunol.* 92, 437-441.

- Braciale, T.J. (1992). Antigen processing for presentation by MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 59-62.
- Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., et Wiley, D.C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364, 33-39.
- Bruno, L., Kirkberg, J., et von Boehmer, H. (1995). On the cellular basis of immunological memory. *Immunity* 2, 37-43.
- Busch, R., Cloutier, I., Sékaly, R.-P., et Hämmerling, G.J. (1996). Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 15, 418-428.
- Candéias, S., Waltzinger, C., Benoist, C., et Mathis, D. (1991). The V β 17⁺ T cell repertoire: skewed J β usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4⁺ versus CD8⁺ cells. *J.Exp.Med.* 174, 989-1000.
- Cantrell, D. (1996). T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Ann.Rev.Immunol.* 14, 259-274.
- Casanova, J.-L., Romero, P., Widmann, C., Kourilsky, P., et Maryanski, J.L. (1991). T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptides: Implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J.Exp.Med.* 174, 1371-1383.
- Cazenave, P.-A., Marche, P.N., Jouvin-Marche, E., Voegtlé, D., Bonhomme, F., Bandeira, D., et Coutinho, A. (1990). V β 17 gene polymorphism in wild-derived mouse strains: two amino acid substitution in the V β 17 region greatly alter T cell receptor specificity. *Cell* 63, 717-728.
- Cerundolo, V., Alexander, J., Anderson, K., Lamb, C., Cresswell, P., McMichael, A., Gotch, F., et Townsend, A. (1990). Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex. *Nature* 345, 449-452.
- Chan, S.H., Benoist, C., et Mathis, D. (1993). A challenge to the instructive model of positive selection. *Immunol.Rev.* 135, 119-131.
- Chan, A.C., Desai, D.M., et Weiss, A. (1994). The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu.Rev.Immunol.* 12, 55-592.

- Charmley, P., Wang, K., Hood, L., et Nickerson, D.A. (1993). Identification and physical mapping of a polymorphic human T cell receptor V β gene with a frequent null allele. *J.Exp.Med.* *177*,135-143.
- Chervonsky, A.V., Xu, J., Barlow, A.K., Khery, M., Flavell, R.A., et Janeway Jr., C.A. (1994). Direct physical interaction involving CD40 ligand on T cells and CD40 on B cells is required to propagate MMTV. *Immunity* *3*, 139-146.
- Chesney, P.J., Bergdoll, M.S., Davis, J.P., et Vergeront, J.M. (1984). The disease spectrum, epidemiology, and etiology of toxic shock syndrome. *Annu.Rev.Microbiol.* *38*, 315-338.
- Chies, J.A.B., Marodon, G., Joret, A.-M., Regnault, A., Lembezat, M.-P., Rocha, B., et Freitas, A.A. (1995). Persistence of V beta 6+ T cells in Mls-1a mice. *J.Immunol.* *155*, 4171-4178.
- Choi, Y., Kotzin, B., Herron, L., Callahan, J., Marrack, P., et Kappler, J. (1989). Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* *86*, 8941-8945.
- Choi, Y., Herman, A., DiGiusto, D., Wade, T., Marrack, P., et Kappler, J.W. (1990). Residues of the variable region of the T cell receptor β -chain that interact with *S. aureus* toxin superantigens. *Nature* *246*, 471-473.
- Choi, Y., Kappler, J.W., et Marrack, P. (1991). A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Nature* *350*, 203-207.
- Choi, Y., Marrack, P., et Kappler, J.W. (1992). Structural analysis of a mouse mammary tumor virus superantigen. *J.Exp.Med.* *175*, 847-852.
- Chothia, C., Boswell, D.R., et Lesk, A.M. (1988). The outline structure of the T-cell $\alpha\beta$ receptor. *EMBO J.* *7*, 3745-3755.
- Ciurli, C., Sékaly, R.-P., et Soudeyns, H. (1996). Study of the T cell receptor repertoire in viral immunodeficiency disease. *Semin.Immunopathol.* *17*, 319-332.
- Ciurli, C., Sékaly, R.-P., et Denis, F. Highly biased CDR3 usage in restricted sets of BVs during vSAG9 response. a-Soumis pour publication dans *J.Exp.Med.*
- Ciurli, C., Rebai, N., et Sékaly, R.-P. Study of the T cell receptor repertoire in healthy human monozygotic twins. b-Soumis pour publication dans *Res. Immunol.*

- Claesson, L., Larhammer, D., Rask, L., et Peterson, P.A. (1983). cDNA clone for the human invariant gamma chain of class II histocompatibility antigens and its implications for protein structure. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 80, 7395-7399.
- Claverie, J.M., Prochnicka, C.A., et Bougueleret, L. (1989). Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor. *Immunol. Today* 10, 10-14.
- Clipstone, N.A., et Crabtree, G.R. (1992). Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 357, 695-697.
- Cole, B.C., Kartcher, D.R., et Wells, D.J. (1989). Stimulation of mouse lymphocytes by a mitogen derived from *Mycoplasma arthritidis*. *J.Immunol.* 142, 4131-4137.
- Cole, B.C., Knudtson, K.L., Oliphant, A., Sawitzke, A.D., Pole, A., Manohar, M., Benson, L.S., Ahmed, E., et Atkin, C.L. (1996). The sequence of the *Mycoplasma arthritidis* superantigen, MAM: Identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens. *J.Exp.Med.* 183, 1105-1110.
- Connors, M., Kovacs, A.J., Krevat, S., Gea-Banacloche, J.C., Sneller, M.C., Flanigan, M., Metcalf, J.A., Walker, R.E., Falloon, J., Baseler, M., Stevens, R., Feuerstein, I., Masur, H., et Lane, H.C. (1997). HIV induces changes in CD4⁺ T-cell phenotype and depletions within the CD4⁺ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nature Medicine* 3, 533-540.
- Conrad, B., Weidmann, E., Trucco, G., Rudert, W.A., Behboo, R., Ricordi, C., Rodriguez-Rillo, H., Finegold, D., et Trucco, M. (1994). Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* 371, 351-355.
- Conrad, B., Weissmahr, R.N., Böni, J., Arcari, R., Schüpbach, J., et Mach, B. (1997). A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type 1 diabetes. *Cell* 90, 303-313.
- Constant, S., Zain, M., West, J., Pasqualini, T., Ranney, P., et Bottomly, K. (1994). Are primed CD4⁺ T lymphocytes different from unprimed cells? *Eur.J.Immunol.* 24, 1073-1079.
- Corley, R.B., Lund, F.E., Randall, T.D., King, L.B., Doerre, S., et Woodland, D.L. (1992). Mouse mammary tumor proviral gene expression in cells of the B lineage. *Sem.Immunol.* 4, 287-296.

- Cornélis, F., Pile, K., Loveridge, J., Moss, P., Harding, R., Julier, C., et Bell, J. (1993). Systematic study of human $\alpha\beta$ T cell receptor V segments shows allelic variations resulting in a large number of distinct T cell receptor haplotypes. *Eur.J.Immunol.* *23*, 1277-1283.
- Cosgrove, D., Gray, D., Dierich, A., Kaufman, J., Lemeur, M., Benoist, C., et Mathis, D. (1991). Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* *66*, 1051-1066.
- Cossarizza, A. (1997). T cell repertoire and HIV infection: facts and perspectives. *AIDS (in Press)*.
- Cresswell, P. (1992). Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr.Opin.Immunol.* *1*, 87-92.
- Dadaglio, G., Garcia, S., Montagnier, L., et Gougeon, M.-L. (1994). Selective anergy of $V\beta 8^+$ T cells in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J.Exp.Med.* *179*, 413-424.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., et Weiss, R.A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* *312*, 763-767.
- Dalgleish, A.G., Wilson, S., Gompels, M., Ludlam, C., Gazzard, B., Coates, A.M., et Habeshaw, J. (1992). T-cell receptor variable gene products and early HIV-1 infection. *Lancet* *339*, 824-828.
- Danliczyk, U.G., et Delovitch, T.L. (1994). $\beta 2$ -microglobulin induces a conformational change in an MHC class I H chain that occurs intracellularly and is maintained at the cell surface. *J.Immunol.* *153*, 3533-3542.
- Davey, M.P., Meyer, M.M., Munkirs, D.D., Babcock, D., Braun, M.P., Hayden, J.B., et Bakke, A.C. (1991). T-cell receptor variable β genes show differential expression in CD4 and CD8 T cells. *Hum.Immunol.* *32*, 194-202.
- Davis, M.M., et Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* *334*, 395-401.
- Dayton, A.I., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Goh, W.C., et Haseltine, W.A. (1986). The *trans*-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* *44*, 941-947.
- De Libero, G. (1997). Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells. *Immunol. Today* *18*, 22-26.

- Dellabona, P., Peccoud, J., Kappler, J., Marrack, P., Benoist, C., et Mathis, D. (1990). Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 62, 1115-1121.
- Denzin, L.K., et Cresswell, P. (1995). HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82, 155-165.
- Di Rosa, F., et Matzinger, P. (1996). Long-lasting CD8 T cell memory in the absence of CD4 T cells or B cells. *J.Exp.Med.* 183, 2153-2163.
- Dobrescu, D., Ursea, B., Pope, M., Asch, A.S., et Posnett, D.N. (1995a). Enhanced HIV-1 replication in V β 12 T cells due to human cytomegalovirus in monocytes: evidence for a putative herpesvirus superantigen. *Cell* 82, 753-763.
- Dobrescu, D., Kabak, S., Mehta, K., Suh, C.H., Asch, A., Cameron, P.U., Hodtsev, A.S., et Posnett, D.N. (1995b). HIV-1 reservoir in CD4⁺ T cells is restricted to certain V β subsets. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 92, 5563-5567.
- Dohlsten, M., Abrahmsén, L., Björk, P., Lando, P.A., Hedlund, G., Forsberg, G., Brodin, T., Gascoigne, R.J., Förberg, C., Lind, P., et Kalland, T. (1994). Monoclonal antibody-targeted superantigens-A different class of anti-tumor agents. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88, 9287-9291.
- Donahue, J.P., Ricalton, N.S., Behrendt, C.E., Rittershaus, C., Calaman, S., Marrack, P., Kappler, J.W., et Kotzin, B.L. (1994). Genetic analysis of low V β 3 expression in humans. *J.Exp.Med.* 179, 1701-1706.
- Dyson, P.J., Knight, A.M., Fairchild, S., Simpson, E., et Tomonari, K. (1991). Genes encoding ligands for deletion of V β 11 T cells cosegregate with mammary tumor virus genomes. *Nature* 349, 531-532.
- Edwin, C., et Kass, E.H. (1989). Identification of functional antigenic segments of toxic syndrome toxin 1 by differential immunoreactivity and by differential mitogenic responses of human peripheral blood mononuclear cells, using active toxin fragments. *Infect.Immun.* 57, 2230-2236.
- Engel, I., et Hedrick, S.M. (1988). Site-directed mutations in the VDJ junctional region of a T cell receptor β chain cause changes in antigenic peptide recognition. *Cell* 54, 473-484.
- Fadock, V.A. (1992). Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Ann.Rev.Immunol.* 10, 267-293.

- Ferradini, L., Roman-Roman, S., Azocar, J., Michalaki, H., Triebel, F., et Hercend, T. (1991). Studies on the human T cell receptor α/β variable region genes II. Identification of four additional V β subfamilies. *Eur.J.Immunol.* 21, 935-942.
- Festenstein, H. (1973). Immunogenic and biological aspects of *in vitro* allotransformation (MLR) in the mouse. *Transplant.Rev.* 15, 62-88.
- Fields, B.A., Obe, B., Malchiodi, E.L., Lebedeva, M.I., Braden, B.C., Ysern, X., Kim, J.-K., Shao, X., Ward, E.S., et Mariuzza, R.A. (1995). Crystal structure of the V α domain of a T cell antigen receptor. *Science* 270, 1821-1824.
- Fields, B.A., et Mariuzza, R.A. (1996). Structure and function of the T-cell receptor: Insights from X-ray crystallography. *Immunol. Today* 17, 330-336.
- Fields, B.A., Malchiodi, E.L., Li, H., Ysern, X., Stauffacher, C., Schlievert, P.M., Karjalainen, K., et Mariuzza, R.A. (1996b). Crystal structure of a T-cell receptor β -chain complexed with a superantigen. *Nature* 384, 188-192.
- Fischer, H., Dohlsten, M., Lindvall, M., Sjögren, H.-O., et Carlsson, R. (1989). Binding of Staphylococcal enterotoxin A to HLA-DR on B cell lines. *J.Immunol.* 142, 3151-3157.
- Fleischer, B., et Schrezenmeier, H. (1988). T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. *J.Exp.Med.* 167, 1697-1707.
- Fowlkes, B.J., Schwartz, R.H., et Pardoll, D.M. (1988). Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4⁺8⁺ precursor stage. *Nature* 334, 620-623.
- Frankel, W.N., Rudy, C., Coffin, J.M., et Huber, B.T. (1991). Linkage of Mls genes to endogenous mammary tumor viruses of inbred mice. *Nature* 349, 526-528.
- Fraser, J.D., Urban, R.G., Strominger, J.L., et Robinson, H. (1992). Zinc regulates the function of two superantigens. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 89, 5507-5511.
- Fraser, J.D., et Hudson, K.R. (1995). A structural model of bacterial superantigen binding to MHC class II and T cell receptors. J.I. Bell, M.J. Owen, E. Simpson, Oxford University Press, ed (USA), pp.425-446.
- Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussoiti, V.A., NG, J.W., Restivo Jr., V.A., Lombard, L.A., Gray, G.S., et Nadler, L.M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262, 909-911.

- Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A., et Wilson, I.A. (1992). Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. *Science* 257, 919-927.
- Galelli, A., et Truffa-Bachi, P. (1993). *Urtica dioica* agglutinin. A superantigenic lectin from stinging rhizome. *J.Immunol.* 151, 1821-1831.
- Garboczi, D.N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q.R., Biddison, W.E., et Wiley, D.C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.
- Garcia, K.C., Degano, M., Stanfield, R.L., Brunmark, A., Jackson, M.R., Peterson, P.A., Teyton, L., et Wilson, I.A. (1996). An $\alpha\beta$ T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274, 209-219.
- Garret, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L., et Wiley, D.C. (1989). Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342, 692-696.
- Gascoigne, N.R.J., et Ames, K.T. (1991). Direct binding of secreted T-cell receptor β chain to superantigen associated with class II major histocompatibility complex protein. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88, 613-616.
- Genevée, C., Diu, A., Nierat, J., Caignard, A., Dietrich, P.-Y., Ferradini, L., Roman-Roman, S., Triebel, F., et Hercend, T. (1992). An experimental validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V α 1-w29/V β 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur.J.Immunol.* 22, 1261-1269.
- Germain, R.N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-299.
- Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C., et Mathis, D. (1993). Mice lacking TdT: mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science* 261, 1175-1178.
- Goldberg, A.L., et Rock, K.L. (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357, 375-379.
- Golovkina, T.V., Chervonsky, A., Dudley, J.P., et Ross, S.R. (1992). Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 69, 637-645.
- Golovkina, T.V., Chervonsky, A., Prescott, J.A., Janeway Jr., C.A., et Ross, S.R. (1994). The mouse mammary tumor virus envelope gene product is required for superantigen presentation to T cells. *J.Exp.Med.* 179, 439-446.

- Gorga, J.C. (1992). Structural analysis of class II major histocompatibility complex proteins. *Crit.Rev.Immunol.* *11*, 305-335.
- Grant, M.D., Smail, F.M., et Rosenthal, K.L. (1994). Cytotoxic T lymphocytes that kill autologous CD4⁺ lymphocytes are associated with CD4⁺ lymphocyte depletion in HIV-infection. *J.Acquir.Immune Defic.Syndr.* *7*, 571-579.
- Groettrup, M., Ungewiss, K., Azogui, O., Palacios, R., Owen, M.J., Hayday, A.C., et von Boehmer, H. (1993). A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kDa glycoprotein. *Cell* *75*, 283-294.
- Grossman, D., Van, M., Mollick, J.A., Highlander, S.K., et Rich, R.R. (1991). Mutation of the disulfide loop in staphylococcal enterotoxin A. Consequences for T cell recognition. *J.Immunol.* *147*, 3274-3281.
- Grunewald, J., Janson, C.H., et Wigzell, H. (1991). Biased expression of individual T cell receptor V gene segments in CD4⁺ and CD8⁺ human peripheral blood T lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* *21*, 819-822.
- Guinan, E.C., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., et Nadler, L.M. (1994). Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* *84*, 3261-3282.
- Gulwani-Akolkar, B., Posnett, D.N., Janson, C.H., Grunewald, J., Wigzell, H., Akolkar, P., Gregersen, P.K., et Silver, J. (1991). T cell receptor V-segment frequencies in peripheral blood T cells correlate with human leukocyte antigen type. *J.Exp.Med.* *174*, 1139-1146.
- Günzburg, W.H., et Salmons, B. (1992). Factors controlling the expression of mouse mammary tumor virus. *Biochem.J.* *283*, 625-632.
- Günzburg, W.H., Heinemann, F., Wintersperger, S., Miethke, T., Wagner, H., Erfle, V., et Salmons, B. (1993). Endogenous superantigen expression controlled by a novel promoter in the MMTV long terminal repeat. *Nature* *364*, 154-158.
- Haas, W., Pereira, P. et Tonegawa, S. (1993). Gamma/delta T cells. *Annu.Rev.Immunol.* *11*, 637-685.
- Hansen, T.H., Carreno, B.M., et Sachs, D.H. (1993). The major histocompatibility complex. In *Fundamental Immunology*. 3rd edition W.E. Paul, ed. (New York: Raven press), pp.577-628.
- Harris, T.O., Grossman, D., Kappler, J.W., Marrack, P., Rich, R.R., et Betley, M.J. (1993). Lack of complete correlation between emetic and T-cell-stimulatory activities of Staphylococcal enterotoxins. *Infect.Immun.* *61*, 3175-3183.

- Hatada, M.H., Lu, X., Laird, E.R., Green, J., Morgenstern, J.P., Lou, M., Marr, C.S., Phillips, T.B., Ram, M.K., Theriault, K., Zoller, M.J., et Karas, J.L. (1995). Molecular basis for interaction of the protein tyrosine kinase ZAP-70 with the T-cell receptor. *Nature* 377, 32-38.
- Hatchcock, K.S., Laszlo, G., Dickler, H.B., Bradshaw, J., Linsley, P., et Hodes, R.J. (1995). Identification of an alternative CTLA-4 ligand costimulatory for T cell activation. *Science* 262, 905-907.
- Hawes, G.E., Struyk, L., et van den Elsen, P.J. (1993). Differential usage of T cell receptor V gene segments in CD4⁺ and CD8⁺ subsets of T lymphocytes in monozygotic twins. *J.Immunol.* 150, 2033-2045.
- Hedrick, S.M., Engel, I., McElligott, D.L., Fink, P.J., Hsu, M.-L., Hansburg, D., et Matis, L.A. (1988). Selection of amino acid sequences in the beta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239, 1541-1544.
- Hedrick, S. M. (1989). T lymphocyte receptors. In *Fundamental Immunology*. 2nd edition W.E. Paul, ed. (New York: Raven press), pp.291-313.
- Held, W., Schakov, A.N., Waanders, G., Scarpellino, L., Luethy, R., Kraehenbulh, J.-P., MacDonald, H.R., et Acha-Orbea, H. (1992). An exogenous mouse mammary tumor virus with properties of Mls-1^a (*Mtv-7*). *J.Exp.Med.* 175, 1623-1633.
- Held, W., Shakhov, A.N., Zui, S., Waanders, G.A., Scarpellino, L., MacDonald, H.R., et Acha-Orbea, H. (1993a). Superantigen-reactive T cells are required to stimulate B cells after infection with mouse mammary tumor virus. *J.Exp.Med.* 177, 359-366.
- Held, W., Waanders, G.A., Shakhov, A.N., Scarpellino, L., Acha-Orbea, H., et MacDonald, H.R. (1993b). Superantigen-induced immune stimulation amplifies mouse mammary tumor virus infection and allows virus transmission. *Cell* 74, 529-540.
- Herman, A., Croteau, G., Sékaly, R.-P., Kappler, J., et Marrack, P. (1990). HLA-DR alleles differ in their ability to present staphylococcal enterotoxins to T cells. *J.Exp.Med.* 172, 709-717.
- Herman, A., Labrecque, N., Thibodeau, J., Marrack, P., Kappler, J.W., et Sékaly, R.-P. (1991). Identification of the staphylococcal enterotoxin A superantigen binding site in the β 1 domain of the human histocompatibility antigen HLA-DR. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88, 9954-9958.
- Hérol, C., Elhabazi, A., Benussan, A., et Boumsell, L (1995). Implication des molécules CD dans la transmission des signaux d'activation des lymphocytes T. *Médecine/Sciences* 11, 669-680.

- Herrmann, T., Accolla, R.S., et MacDonald, H.R. (1989). Different staphylococcal enterotoxins bind preferentially to distinct major histocompatibility complex class II isotypes. *Eur.J.Immunol.* *19*, 2171-2174.
- Herrmann, T., Romero, P., Sartoris, S., Paiola, F., Accolla, R.S., Maryanski, J.L., et MacDonald, H.R. (1991). Staphylococcal enterotoxin-dependent lysis of MHC class II negative target cells by cytolytic T lymphocytes. *J.Immunol.* *146*, 2504-2512.
- Herzog, M., Lafage, M., Montano-Hirose, J.A., Fritzell, C., Scott-Algara, D., et Lafon, M. (1992). Nucleocapsid specific T and B cell responses in humans after rabies vaccination. *Virus Res.* *24*, 77-89.
- Heston, W.E., Deringer, M.K., et Andervont, H.B. (1945). Gene-milk agent relationship in mammary tumor development. *J.Nat.Cancer Int.* *5*, 289-307.
- Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., et Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* *76*, 977-987.
- Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., et Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* *373*, 123-126.
- Hodara, V.L., Jeddi-Tehrani, M., Grunewald, J., Andersson, R., Scarlatti, G., Esin, S., Holmberg, V., Libonatti, O., et Wigzell, H. (1993). HIV infection leads to differential expression of T-cell receptor V β genes in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *AIDS* *7*, 633-638.
- Hong, S.-C., Chelouche, A., Lin, R.-H., Shaywitz, D., Braunstein, N.S., Glimcher, L., et Janeway Jr., C.A. (1992). An MHC interaction site maps to the amino-terminal half of the T cell receptor α chain variable domain. *Cell* *69*, 999-1009.
- Hong, S.-C., Waterbury, G., et Janeway Jr., C.A. (1996). Different superantigen interact with distinct sites in the V β domain of a single T cell receptor. *J.Exp.Med.* *183*, 1437-1446.
- Hood, L., Kronenberg, M., et Hunkapiller, T. (1985). T cell antigens receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* *40*, 225-229.
- Iandolo, J.J. (1989). Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu.Rev.Microbiol.* *43*, 375-402.

- Ikuta, K., Ogura, T., Shimizu, A., et Honjo, T. (1985). Low frequency of somatic mutation in β -chain variable region genes of human T-cell receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82, 7701-7705.
- Imberti, L., Sottini, A., Bettinardi, A., Puoti, M., et Primi, D. (1991). Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V β sequences. *Science* 254, 860-862.
- Inaba, M., Inaba, K., Hosono, M., Kumamoto, T., Ishida, T., Muramatsu, S., Masuda, T., et Ikehara, S. (1991). Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *J.Exp.Med.* 173, 549-559.
- Iwashima, M., Irving, B.A., van Oers, N.S.C., Chan, A.C., et Weiss, A. (1994). Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* 263, 1136-1139.
- Janeway Jr., C.A., (1991). Selective elements for the V β region of the T cell receptor: Mls and the bacterial toxic mitogens. *Adv.Immunol.* 50,1-53.
- Jardetzky, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R., et Wiley, D.C. (1991). Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353, 326-329.
- Jardetzky, T.S., Brown, J.H., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Chi, Y.-I., Stauffacher, C., Strominger, J.L., et Wiley, D.C. (1994). Three-dimensional structure of human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368, 711-718.
- Jorgensen, J.L., Esser, U., Fazekas de St. Groth, B., Reay, P.A., et Davis, M.M. (1992). Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 355, 224-230.
- Jouvin-Marche, E., Trede, N., Bandeira, A., Tomas, A., Loh, D.Y., et Cazenave, P.-A. (1989). Different large deletions of T cell receptor V β genes in natural populations of mice. *Eur.J.Immunol.* 19, 1921-1926.
- Julius, M., Maroun, C.R., et Haughn, L. (1993). Distinct role for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signaling. *Immunol. Today* 14, 177-183.
- June, C.H., Fletcher, M.C., Ledbetter, J.A., et Samelson, L.E. (1990). Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J.Immunol.* 144, 1591-1599.
- Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., et Foeller, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest, 5th edition. Public Health Service, NIH, Bethesda MD.

- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, R.M., et Hengartner, H. (1996). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis *in vivo*. *Annu.Rev.Immunol.* *14*, 207-232.
- Kalland, T., Dohlsten, M., Lind, P., Sundstedt, A., Abrahmsén, L., Hedlund, G., Björk, P., Lando, P.A., et Bjorklund, M. (1993). Monoclonal antibodies and superantgens: a novel therapeutic approach. *Med.Oncol. & Tumor Pharmacother* *10*, 37-47.
- Kang, J., Chambers, C.A., Pawling, J., Scott, C., et Hozumi, N. (1994). Conserved amino-acid residues in the complementary-determining region 1 of the TCR beta-chain are involved in the recognition of conventional Ag and Mls-1 superantigen. *J.Immunol.* *152*, 5305-5317.
- Kappler, J.W., Staertz, U., White, J., et Marrack, P. (1988). Self-tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* *332*, 35-40.
- Kappler, J.W., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E.W., Bigler, R.D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D.N., Choi, Y., et Marrack, P. (1989). V β -specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* *244*, 811- 813.
- Kappler, J.W., Herman, A., Clements, J., et Marrack, P. (1992). Mutations defining functional regions of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *J.Exp.Med.* *175*, 387-396.
- Karp, D.R., et Long, E.O. (1992). Identification of HLA-DR1 β chain residues critical for binding staphylococcal enterotoxins A and E. *J.Exp.Med.* *175*, 415-424.
- Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Schakelford, D.A., et Strominger, J. (1984). The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell* *36*, 1-13.
- Kaufmann, S.H.E. (1996). γ/δ and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do? *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* *93*, 2272-2279.
- Kawabe, Y., et Ochi, A. (1990). Selective anergy of V β 8⁺CD4⁺ T cells in *Staphylococcus* enterotoxin B-primed mice. *J.Exp.Med.* *172*, 1065-1070.
- Kawabe, Y., et Ochi, A. (1991). Programmed cell death and extrathymic reduction of V β 8 CD4 T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* *349*, 245-248.
- Kelly, A.P, Monaco, J.J, Cho, S., et Trowsdale, J. (1991). A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* *353*, 571-573.

- Kim, J., Urban, R.G., Strominger, J.L., et Wiley, D.C. (1994). Crystallographic structure of toxic shock syndrome toxin-1 complexed with a human class II major histocompatibility molecule HLA-DR1. *Science* 266, 1870-1874.
- Klausner, R.D., Lippincott-Schwartz, J., et Bonifacino, J.S. (1990). The T cell antigen receptor: Insights into organelle biology. *Annu.Rev.Cell.Biol.* 6, 403-431.
- Komori, T., Okada, A., Stewart, V., et Alt, F.W. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science* 261, 1171-1175.
- Konig, R., Huang, L.-Y., et Germain, R.N. (1992). MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* 356, 769-798.
- Korman, A.J., Bourgarel, P., Meo, T., et Rieckhof, G., (1992). The mouse mammary tumor virus long terminal repeat encodes a type II transmembrane glycoprotein. *EMBO J.* 11, 1901-1905.
- Kraulis, P.J. (1991). Molscript: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structure. *J.Appl.Crystallogr.* 24, 946-950.
- Kronenberg, M., Siu, G., Hood, L.E., et Shastri, N. (1986). The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 4, 529-591.
- Kupfer, A., et Singer, S.J. (1989). Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: Immunofluorescence microscopic studies on single cells and cell couples. *Ann.Rev.Immunol.* 7, 309-337.
- Labrecque, N., McGrath, H., Subramanyam, M., Huber, B.T., et Sékaly, R.-P. (1993). Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigens: V β restriction and conserved evolutionary features. *J.Exp.Med.* 177, 1735-1743.
- Labrecque, N., Thibodeau, J., Mourad, W., et Sékaly, R.-P. (1994). T cell receptor-major histocompatibility complex class II interaction is required for the T cell response to bacterial superantigens. *J.Exp.Med.* 180, 1921-1929.
- Lafon, M., Lafage, M., Martinez-Arends, A., Ramirez, R., Vuiller, F., Charron, D., Lotteau, V., et Scott-Algar, D. (1992). Evidence for a viral superantigen in human. *Nature* 358, 507-510.
- Lafon, M. (1993). Rabies virus superantigen. *Res.Immunol.* 144, 209-213.

- Langford, M.P., Stanton, G.J., et Johnson, H.M. (1978). Biological effects of staphylococcal enterotoxin A on human peripheral lymphocytes. *Infect.Immun.* 22, 62-68.
- Laurence, J., Hochtsev, A.S., et Posnett, D.N. (1992). Superantigen implicated in dependence of HIV-1 replication in T cells on TCR V β expression. *Nature* 358, 255-259.
- Lavoie, P.M., Sékaly, R.-P., Thibodeau, J., et Denis, F. (1997). Interaction of superantigens with MHC class II molecules. In *Superantigens: Molecular Biology, Immunology, and Relevance to Human Disease*. D.Y.M. Leung, B.T. Huber, P.M. Schlievert, Marcel, Dekker, New York, ed, pp 61-83.
- Lawlor, D.A., Zemmour, J., Ennis, P.D., et Parham P. (1990). Evolution of class-I MHC genes and proteins. *Annu.Rev.Immunol.* 8, 23-63.
- Li, Y., Szabo, P., Robinson, M.A., Dong, B., et Posnett, D.N. (1990). Allelic variations in the human T cell receptor V β 6.7 gene products. *J.Exp.Med.* 171, 221-230.
- Li, C.J., Friedman, D.J., Wang, C., Metelev, V., et Pardee, A.B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 268, 429-431.
- Liao, L., Gordon, L., Ciurli, C., Sékaly, R.-P., et Posnett, D.N. (1996a). Superantigens and a TcR mAb distinguish between TcR V β alleles. *The Immunologist* 4, 28-29.
- Liao, L., Marinescu, A., Molano, A., Ciurli, C., Sékaly, R.-P., Fraser, J.D., Popowicz, A., et Posnett, D.N. (1996b). TCR binding differs for a bacterial superantigen (SEE) and a viral superantigen (Mtv-9). *J.Exp.Med.* 184, 1471-1482.
- Linsley, P.S, Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., et 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.
- Listman, J.A., Rimm, I.J., Wang, Y., Geller, M.C., Tang, J.C., Ho, S., Finn, P.W., et Perkins, D.L. Plasticity of the T cell receptor repertoire in TCR beta-chain transgenic mice. *Cell.Immunol.* 167, 44-55.
- Long, E.O, LaVaute, T., Pinet, V., et Jaraquemada, D. (1994). Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J.Immunol.* 152, 1487-1494.
- Lotteau, V, Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Shmid, S.L., Quaranta, V., et Peterson, P.A. (1990). Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348, 600-605.

- Löwer, R., Löwer, J., et Kurth, R. (1996). The viruses in all of us: Characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 93, 5177-5184.
- Lowin, B., Hahne, M., Mattmann, C., et Tschopp, J. (1994). Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and fas lytic pathways. *Nature* 370, 650-652.
- Lukacher, A.E., Ma, Y., Carroll, J.P., Abromson-Leeman, S.R., Laning, J.C., Dorf, M.E., et Benjamin, T.L. (1995). Susceptibility to tumors induced by polyoma virus is conferred by an endogenous mouse mammary tumor virus superantigen. *J.Exp.Med.* 181, 1683-1692.
- Luyrink, L., Gabriel, C.A., Thompson, S.D., Grom, A.A., Maksymowych, W., Choi, E., et Glass, D.N. (1993). Reduced expression of a human V β 6.1 T-cell receptor allele. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90, 4369-4373.
- MacDonald, H.R., Schneider, R., Lees, R.K., Howe, R.C., Acha-Orbea, H., Festenstein, H., Zinkernagel, R.M., et Hengartner, H. (1988). T-cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mls-encoded antigens. *Nature* 332, 40-45.
- MacDonald, H.R., Glasebrook, A.L., Schneider, R., Lees, R.K., Pircher, H.P., Pedrazzini, T., Kanagawa, O., Nicolas, J.-F., Howe, R.C., Zinkernagel, R.M., et Hengartner, H. (1989). T-cell reactivity and tolerance to Mls^a-encoded antigens. *Immunol.Rev.* 107, 89-108.
- MacDonald, H.R., Baschieri, S., et Lees, R.K. (1991). Clonal expansion precedes anergy and death of V β 8⁺ peripheral T cells responding to staphylococcal enterotoxin B *in vivo*. *Eur.J.Immunol.* 21, 1963-1966.
- MacNeil, D., Fraga, E., et Singh, B. (1992). Inhibition of superantigen recognition by peptides of the variable region of the T cell receptor β chain. *Eur.J.Immunol.* 22, 937-941.
- Madden ,D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L., et Wiley, D.C. (1991). The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in a extended conformation. *Nature* 353, 321-325.
- Malissen, M., Trucy, J., Letourneur, F., Rebai, N., Dunn, D.E., Fitch, F.W., Hood, L., et Malissen, B. (1988). A T cell clone expresses two T cell receptor a genes but uses one $\alpha\beta$ heterodimer for allorecognition and self MHC-restricted antigen recognition. *Cell* 55, 49-59.
- Malissen, M., Trucy, J., Jouvin-Marche, E., Cazenave, P.-A., Scollay, R., et Malissen, B. (1992). Regulation of TCR α and β gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol. Today* 13, 315-322.

- Malhotra, U., Spielman, R., et Concannon, P. (1992). Variability in T cell receptor V β gene usage in human peripheral blood lymphocytes. *J.Immunol.* *149*, 1802-1808.
- Marrack, P., Kushnir, E., et Kappler, J. (1991). A maternally inherited superantigen encoded by a mammary tumor virus. *Nature* *349*, 524-526.
- Matis, L.A. (1990). The molecular basis of T-cell specificity. *Annu.Rev.Immunol.* *8*, 65-82.
- Mazda, O., Watanabe, Y., Gytoku, J.-I., et Katsura, Y. (1991). Requirement of dendritic cells and B cells in the clonal deletion of Mls-reactive T cells in the thymus. *J.Exp.Med.* *173*, 539-547.
- McCoy, J.P., Jr., Overton, W.R., Blumstein, L., Baxter, J.D., Gekowski, K.M., et Donaldson, M.H. (1995). Alterations of T-cell receptor variable region expression in human immunodeficiency virus disease. *Cytometry* *22*, 1-9.
- Meyaard, L., Otto, S.A., Jonker, R.R., Mijinker, M.J., Keet, R.P.M., et Miedema, F. (1992). Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* *257*, 217-219.
- Mohan, N., Mottershead, D.G., Subramanyam, M., Beutner, U., et Huber, B.T. (1993). Production and characterization of an Mls-1-specific monoclonal antibody. *J.Exp.Med.* *177*, 351-358.
- Molina, I.J., Cannon, N.A., Hyman, R., et Huber, B.T. (1989). Macrophages and T cells do not express Mls^a determinants. *J.Immunol.* *143*, 39-44.
- Mollick, J.A., Cook, R.G., et Rich, R.R. (1989). Class II MHC are specific receptors for *Sa*phyllococcus enterotoxin A., *Science* *244*, 817-819.
- Mollick, J.A., Chintagumpala, M., Cook, R.G., et Rich, R.R. (1991). Staphylococcal exotoxin activation of T cells: role of exotoxin-MHC class II binding affinity and class II isotype. *J.Immunol.* *146*, 463-468.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., et Papioannou, V.E. (1992). RAG-1 deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869-877.
- Morris, P., Shaman, J., Attaya, M., Amaya, M., Goodman, S., Bergman, C., Monaco, J.J., et Mellins, E. (1994). An essential role for the HLA-DM in antigen presentation by MHC class II major histocompatibility molecules. *Nature* *368*, 551-554.
- Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., et Zinkernagel, R.M. (1993). Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* *362*, 758-761.

- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., et Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136, 2348-2357.
- Mosmann, T.R., et Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann.Rev.Immunol.* 7, 145-173.
- Moss, P.A.H., et Bell, J.I. (1995). The human T cell receptor repertoire. In T cell receptors. J.I. Bell, M.J. Owen, E. Simpson, Oxford University Press, ed (USA), pp.111-132.
- Mottershead, D.G., Hsu, P.N., Urban, R.G., Strominger, J.L., et Huber, B.T. (1995). Direct binding of the Mtv-7 superantigen (Mls-1) to soluble MHC class II molecules. *Immunity* 2, 149-154.
- Murphy, K.M., Heimberger, A.B., et Loh, D.Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR^{lo} thymocytes *in vivo*. *Science* 250, 1720-1723.
- Mustelin, T., Pessa-Morikawa, T., Autero, M., Gassmann, M., Anderson, L.C., Gahmberg, C.G., et Burn, P. (1992). Regulation of the p59^{lyn} protein tyrosine kinase by the CD45 phosphotyrosine phosphatase. *Eur.J.Immunol.* 22, 1173-1178.
- Nanda, N.K., Apple, R., et Sercarz, E. (1991). Limitations in plasticity of the T-cell receptor repertoire. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88, 9503-9507.
- Neefjes J.J., et Momburg F. (1993). Cell biology of antigen presentation. *Curr.Opin.Immunol.* 5, 27-34.
- Nusse, R. (1988). The *int* genes in mammary tumorigenesis and in normal development. *Trends Genet.* 4, 291-295.
- Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., et Li, G.C. (1996). Requirement for ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382, 551-555.
- Ochi, A., Yuh, K., et Migita, K., (1993). Not every superantigen induces tolerance *in vivo*. *Sem.Immunol.* 5, 57-63.
- Oettinger, M.A., Schat, D.G., Gorka, C., et Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2 adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517-1523.

- Padovan, E., Casorati, G., Dellabona, P., Meyer, S., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A. (1993). Expression of two T cell receptor α chains: Dual receptor T cells. *Science* 262, 422-424.
- Padovan, E., Giachino, C., Cella, M., Valiutti, S., Acuto, O., et Lanzavecchia, A. (1995). Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor β chains: Implication for the mechanism of allelic exclusion. *J.Exp.Med.* 181, 1587-1591.
- Paliard, X., West, S.G., Lafferty, J.A., Clements, J.R., Kappler, J.W., Marrack, P., et Kotzin, B.L. (1991). Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* 253, 325-329.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M., et Kourilsky, P. (1993). The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90, 4319-4323.
- Pannetier, C., Even, J., et Kourilsky, P. (1995). T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today* 16, 176-181.
- Pantaleo, G., Demarest, J.F., Soudeyns, H., Graziosi, C., Denis, F., Adelsberger, J.W., Borrow, P., Saag, M.S., Shaw, G.W., Sékaly, R.-P., et 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.
- Pantaleo, G., Demarest, J.F., Schacker, T., Vaccarezza, M., Cohen, O.J., Daucher, M., Graziosi, C., Schnittman, S.S., Quinn, T.C., Shaw, G.M., Perrin, L., Tambussi, G., Lazzarin, A., Sékaly, R.-P., Soudeyns, H., Corey, L., et Fauci, A.S. (1997). The qualitative nature of the primary immune response to HIV infection is a prognosticator of disease progression independent of the initial level of plasma viremia. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 94, 254-258.
- Panzara, M.A., Gussoni, E., Steinman, L., et Oksenberg, J.R. (1992). Analysis of the T cell repertoire using the PCR and specific oligonucleotide primers. *BioTechniques* 12, 728-736.
- Pardoll, D., et Carrera, A. (1992). Thymic selection. *Curr.Opin.Immunol.* 4, 162-165.
- Park, C.G., Jung, M.-Y., Choi, Y., et Winslow, G.M. (1995). Proteolytic processing is required for viral superantigen activity. *J.Exp.Med.* 181, 1899-1904.
- Patten, P.A., Rock, E.P., Sonoda, T., Fazeka de St. Groth, B., Jorgensen, J.L., et Davis, M.M. (1993). Transfer of putative complementarity-determining region loops of T cell receptor V domains confers toxin reactivity but not peptide/MHC specificity. *J.Immunol.* 150, 2281-2294.

- Peavy, D.L., Adler, W.H., et Smith, R.T. (1970). The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes. *J.Immunol.* *105*, 1453-1458.
- Peck, A.B., Janeway Jr, C.A., et Wigzell, H. (1977). T lymphocytes responses to Mls locus antigens involve recognition of H-2 I region gene products. *Nature* *266*, 840-842.
- Pedersen, L.O, Stryhn, A., Holtet, T.L, Etzerodt, M., Gerwien, J., Nissen, M.H., Thogersen, H.C., et Buus, S. (1995) The interaction of beta 2-microglobulin (beta2m) with mouse class I major histocompatibility antigens and its ability to support peptide binding. A comparison of human and mouse beta2m. *Eur.J.Immunol.* *25*, 1609-1616.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., et Ho, D.D. (1996). HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* *271*, 1582-1586.
- Peterlin, M., Anderson, G., Lötscher, E., et Tsang, S. (1990). Transcriptional regulation of HLA class-II genes. *Immunol.Res.* *9*, 164-177.
- Petrie, H.T., Livak, F., Schatz, D.G., Strasser, A., Crispe, N., et Shortman, K. (1993). Multiple rearrangements in T cell receptor α chain genes maximize the production of useful thymocytes. *J.Exp.Med.* *178*, 615-622.
- Pontzer, C.H., Irwin, M.J., Gascoigne, N.R.J., et Johnson, H.M. (1992). T-cell antigen receptor binding sites for the microbial superantigen staphylococcal enterotoxin A. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* *89*, 7727-7731.
- Pontzer, C.H., Griggs, N.D., et Johnson, H.M. (1993). Agonist properties of a microbial superantigen peptide. *Biochem.Biohys.Res.Comm.* *193*, 1191-1197.
- Porcelli, S., Brenner, M.B., et Band, H. (1991). Biology of the human $\gamma\delta$ T-cell receptor. *Immunol.Rev.* *120*, 138-183.
- Posnett, D.N., Wang, C.Y., et Friedman, S.M. (1986). Inherited polymorphism of the human T-cell antigen receptor detected by a monoclonal antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* *83*, 7888-7892.
- Posnett, D.N. (1990). Allelic variations of human TCR V gene products. *Immunol. Today* *11*, 368-373.
- Posnett, D.N., Hodstev, A.S., Kabak, S., Friedman, S.M., Cole, B.C., et Bhardwaj, N. (1993a). Interaction of the *Mycoplasma arthritidis* superantigen (MAM) with human T-cells. *Clin.Infect.Dis.* *17*, S170-S175.

- Posnett, D.N., Kabak, S., Hodtsev, A.S., Goldberg, E.A., et Asch, A. (1993b). TCR-V β subsets are not preferentially deleted in AIDS. *AIDS* 7, 625-631.
- Posnett, D.N., Vissinga, C.S., Pambuccian, C., Wei, S., Robinson, M.A., Kostyu, D., et Concannon, P. (1994). Level of human TCRBV3S1 (V β 3) expression correlates with allelic polymorphism in the spacer region of the recombination signal sequence. *J.Exp.Med.* 179, 1707-1711.
- Posnett, D.N., Sinha, R., Kabak, S., et Russo, C. (1994b). Clonal populations of T cells in normal elderly humans: The T cell equivalent to "Benign Monoclonal Gammopathy". *J.Exp.Med.* 179, 609-618.
- Posnett, D.N., Romagne, F., Necker, A., Kotzin, B.L., et Sékaly, R.-P. (1996). First human TcR monoclonal antibody workshop. *The Immunologist* 4, 5-8.
- Pouis, S.J., Townsend, A.R.M., Deverson, E.V. Bastin, J., Butcher, G.W., et Howard, J.C. (1991). Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* 354, 528-531.
- Prashar, Y., Li, Y., Kubinec, J.S., Jones, N., et Posnett, D.N. (1991). A monoclonal antibody (OT145) specific for the T cell antigen receptor V β 6.7a allele detects an epitope related to a proposed superantigen-binding site. *J.Immunol.* 147, 3441-3444.
- Pucillo, C., Cepeda, R., et Hodes, R.J. (1993). Expression of a MHC class II transgene determines both superantigenicity and susceptibility to mammary tumor virus infection. *J.Exp.Med.* 178, 1441-1445.
- Pullen, A.M., Marrack, P., et Kappler, J.W. (1988). The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 335, 796-801.
- Pullen, A.M., Wade, T., Marrack, P., et Kappler, J.W. (1990). Identification of the region of T cell receptor β chain that interacts with self-superantigen Mls-1^a. *Cell* 61, 1365-1374.
- Pullen, A.M., Potts, W., Wakeland, E.K., Kappler, J., et Marrack, P. (1990b). Surprisingly uneven distribution of the T cell receptor V β repertoire in wild mice. *J.Exp.Med.* 171, 49-62.
- Pullen, A.M., Bill, J., Kubo, R.T., Marrack, P., Kappler, J.W. (1991). Analysis of the interaction site for the self-superantigen Mls-1^a on the T cell receptor V β . *J.Exp.Med.* 173, 1183-1192.

- Pullen, A.M., Choi, Y., Kushnir, E., Kappler, J. et Marrack, P. (1992). The open reading frames in the 3' long terminal repeats of several mouse mammary tumor virus integrants encode V β 3-specific superantigens. *J.Exp.Med.* 175, 41-47.
- Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Withehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway Jr., S.R., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C., et Wong-Staal, F. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313, 277-284.
- Raulet, D.H., Garman, R.D., Saito, H., et Tonegawa, S. (1985). Development regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature* 314, 103-107.
- Rebai, N., Pantaleo, G.P., Demarest, J.F., Ciurli, C., Soudeyns, H., Adelsberger, J.W., Vaccarezza, M., Walker, R.E., Sékaly, R.-P., et Fauci, A.S. (1994). Analysis of the T-cell receptor β -chain variable-region (V β) repertoire in monozygotic twins discordant for human immunodeficiency virus: Evidence for perturbations of specific V β segments in CD4⁺ T cells of the virus-positive twin. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91, 1529-1533.
- Rellahan, B.L., Jones, L.A., Kruisbeek, A.M., fry, A.M., et Matis, L.A. (1990). *In vivo* induction of anergy in peripheral V β 8⁺ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J.Exp.Med.* 172, 1091-1100.
- Reyburn, H., Cornélis, F., Russell, V., Harding, R., Moss, P., et Bell, J. (1993). Allelic polymorphism of human T-cell receptor V alpha gene segments. *Immunogenetics* 38, 287-291.
- Ritter, M.A., et Boyd, R.L. (1993). Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol. Today* 14, 462-469.
- Robey, E., et Fowlkes, B.J. (1994). Selective events in T cell development. *Annu.Rev.Immunol.* 12, 675-705.
- Robinson, M.A. (1989). Allelic sequence variations in the hypervariable region of a T-cell receptor β chain: Correlation with restriction fragment length polymorphism in human families and populations. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86, 9422-9426.
- Robinson, M.A., et Kindt, T.J. (1989). Major histocompatibility complex antigens and genes. In *Fundamental Immunology* 2nd edition. W.E. Paul, ed. (New York: Raven press), pp.489-540.
- Robinson, M.A. (1991). The human T cell receptor β -chain gene complex contains at least 57 variable gene segments. Identification of six V β genes in four new gene families. *J.Immunol.* 146, 4392-4397.

- Robinson, M.A., Mitchell, M.P., Wei, S., Day, C.E., Zhao, T.M., et Concannon, P. (1993). Organization of human T-cell receptor β -chain genes: clusters of V β genes are present on chromosome 7 and 9. *Proc.Natl.Acad. USA* 90, 2433-2437.
- Roche P.A., et Cresswell, P. (1990). Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature*. 354, 615-618.
- Roche, P.A., Marks, M.S., Cresswell, P. (1991). Formation of a nine-subunit complex by LA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 353, 392-394.
- Roche, P.A., Teletski, C.L., Stang, E., Bakke, O., et Long, E.O. (1993). Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90, 8581-8585.
- Romagnoli, P., et Germain, R.N. (1994). The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* 180, 1107-1113.
- Rosenberg, W.M., Moss, P.A.H., et Bell, J.I. (1992). Variation in human T cell receptor V β and J β repertoire: Analysis using anchor polymerase chain reaction. *Eur.J.Immunol.* 22, 541-549.
- Rowen, L., Koop, B.F., et Hood, L. (1996). The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science* 272, 1755-1762.
- Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.-S., et von Boehmer, H. (1994). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science* 266, 1208-1212.
- Salmons, B., et Günzburg, W.H. (1987). Current perspectives in the biology of mouse mammary tumor virus. *Virus Res.* 8, 81-102.
- Samelson, L.E., Harford, J.B., et Klausner, R.D. (1985). Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43, 223-231.
- Sanders, M.E., Makgoba, M.W., Sharrow, S.O., Stephany, D., Springer, T.A., Young, H.A., et Shaw, S. (1988). Human memory T lymphocytes express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2 and LFA-1) and three other molecules (UCHL-1, CDw29 and Pgp-1) and have enhanced IFN-gamma production. *J.Immunol.* 140, 1401-1407.
- Sanderson, F., Thomas, C., Neefjes, J.J., et Trowsdale, J. (1996). Association between HLA-DM and HLA-DR *in vivo*. *Immunity* 4, 87-96.

- Satyanarayana, K., Hata, S., Devlin, P., Roncarlo, M.G., De Vires, J.E., Spits, H., Strominger, J.L., et Krangel, M.S. (1988). Genomic organization of the human T-cell antigen-receptor α/δ locus. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85, 8166-8170.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., et Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene RAG-1. *Cell* 59, 1035-1048.
- Schiff, B., Mizrahi, Y., Orgard, S., Yaron, M., et Gazit, E. (1982). Association of HLA-Aw31 and HLA-DR1 with adult rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 41, 403-404.
- Scholl, P.R., Diez, A., Karr, R., Sékaly, R.-P., Trowsdale, J., et Geha, R.S. (1990). Effect of isotypes and allelic polymorphism on the binding of staphylococcal exotoxins to MHC class II molecules. *J.Immunol.* 144, 226-230.
- Schwab, R., Szabo, P., Manavalan, J.S., Weksler, M.E., Posnett, D.N., Pannetier, C., Kourilsky, P., et Even, J. (1997). Expanded CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones in elderly humans. *J.Immunol.* 158, 4493-4499.
- Schwartz, R.H. (1992). Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production. *Cell* 71, 1065-1068.
- Seboun, E., Robinson, M.A., Kindt, T.J., et Hauser, S.L. (1989). Insertion/deletion-related polymorphisms in the human t cell receptor β gene complex. *J.Exp.Med.* 170, 1263-1270.
- Sékaly, R.-P., Croteau, G., Bowman, M., Scholl, P., Burakoff, S., et Geha, R.S. (1991). The CD4 molecule is not always required for the T cell response to bacterial enterotoxins. *J.Exp.Med.* 173, 367-371.
- Sherman, M.A., Weber, D.A., et Jensen, P.E. (1995). DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity.* 3, 197-205.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Tewart, V., Mendelson, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., et Alt, F.W. (1992). RAG-2 deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Silver, J., Gulwani-Akolkar, B., Akolkar, P.N. (1995). The influence of genetics, environment, and disease state on the human T-cell receptor repertoire. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 756, 28-52.

- Siu, G., Clark, S.P., Yoshikai, Y., Malissen, M., Yanagi, Y., Strauss, E., Mak, T.W., et Hood, L. (1984). The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell* 37, 393-401.
- Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., et Zaller, D.M. (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375, 802-806.
- Smith, H.P., Phuong, L., Woodland, D.L., et Blackman, M.A. (1992). T cell receptor α -chain influences reactivity to Mls-1 in V β 8.1 transgenic mice. *J.Immunol.* 149, 887-896.
- Smith, L.R., Kono, D.H., Kammuller, M.E., Balderas, R.S., et Theofilopoulos, A.N. (1992). V β repertoire in rats and implications for endogenous superantigens. *Eur.J.Immunol.* 22, 641-645.
- Sottini, A., Imberti, L., Gorla, R., Cattaneo, R., et Primi, D. (1991). Restricted expression of T cell receptor V β but not V α genes in rheumatoid arthritis. *Eur.J.Immunol.* 21, 461-466.
- Soudeyns, H., Rebai, N., Pantaleo, G.P., Ciurli, C., Boghossian, T., Sékaly, R.-P., et Fauci, A.S. (1993). The T cell receptor V β repertoire in HIV-1 infection and disease. *Semin.Immunol.* 5, 175-185.
- Soudeyns, H., Routy, J.-P., et Sékaly, R.-P. (1994). Comparative analysis of the T cell receptor V β repertoire in various lymphoid tissues from HIV-infected patients: Evidence for an HIV-associated superantigen. *Leukemia* 8, S95-S97.
- Spies, T., et DeMars, R. (1991). Restored expression of major histocompatibility class I molecules by gene transfer of a putative peptide transporter. *Nature* 351, 323-324.
- Sprent, J., Schaefer, M., Hurd, M., Surh, C.D., et Ron, Y. (1991). Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. *J.Exp.Med.* 174, 717-728.
- Sprent, J., et Tough, D.F. (1994). Lymphocyte life-span and memory. *Science* 265, 1395-1400.
- Stephan, D., Sun, H., Fischer Lindahl, K., Meyer, E., Hämmerling, G., Hooh, L., et Steinmetz, M. (1986). Organization and evolution of D region class I genes in the mouse major histocompatibility complex. *J.Exp.Med.* 163, 1227-1244.
- Stern, L.J., et Wiley, D.C. (1994). Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Structure* 2, 245-251.

- Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D., et Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* *11*, 2407-2414.
- Straus, D.B., et Weiss, A. (1993). The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J.Exp.Med.* *178*, 1523-1530.
- Strubin, M., Mach, B., et Long, E.O. (1984). The complete sequence of the mRNA for HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity. *EMBO J.* *3*, 869-872.
- Subramanyam, M., McLellan, B., Labrecque, N., Sékaly, R.-P., et Huber, B.T. (1993). Presentation of the Mls-1 superantigen by human HLA class II molecules to murine T cells. *J.Immunol.* *151*, 2538-2545.
- Surman, S., Deckhut, A.M., Blackman, M.A., et Woodland, D.L. (1994). MHC-specific recognition of a bacterial superantigen by weakly reactive T cells. *J.Immunol.* *152*, 4893-4902.
- Sutkowski, N., Pakalma, T., Ciurli, C., Sékaly, R.-P., Thorley-Lawson, D.A., et Huber, B.T. (1996). An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J.Exp.Med.* *184*, 971-980.
- Swaminathan, S.S., Furey, W., Pletcher, J., et Sax, M. (1992). Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen. *Nature* *359*, 801-806.
- Tiedemann, R.E., Urban, R.J., Strominger, J.L., et Fraser, J.D. (1995). Isolation of HLA-DR1-staphylococcal enterotoxin A trimers in solution. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* *92*, 12156-12159.
- Thibodeau, J., Cloutier, I., Lavoie, P.M., Labrecque, N., Mourad, W., Jardetzky, T., et Sékaly, R.-P. (1994). Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding. *Science* *266*, 1874-1878.
- Tomonari, K., Fairchild, S., et Rosenwasser, O.A. (1993). Influence of viral superantigens on V β and V α specific positive and negative selection. *Immunol.Rev.* *131*, 131-168.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575-581.
- Torres, B.A., et Johnson, H.M. (1994). Identification of an HIV-1 Nef peptide that binds to HLA class II antigens. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* *200*, 1059-1065.
- Tough, D.F., et Sprent, J. (1994). Turnover of naive-and memory-phenotype T cells. *J.Exp.Med.* *179*, 1127-1135.

- Tough, D.F., et Sprent, J. (1995). Lifespan of lymphocytes. *Immunol.Res.* 14, 1-12.
- Townsend, A., Ohlen, C., Bastin, J., Ljunggre, H.G., Foster, L., et Karre, K. (1989). Association of class I major histocompatibility heavy and light chain induced by viral peptides. *Nature* 340, 443-448.
- Toyonaga, B., Yoshikai, Y., Vadasz, V., Chin, B., et Mak, T.W. (1985). Organization and sequences of the diversity, joining and constant region genes of the human T-cell receptor β chain. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 82, 8624-8628.
- Toyonaga, B., et Mak, T.W. (1987). Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Ann.Rev.Immunol.* 5, 585-620.
- Trono, D. (1995). HIV accessory proteins: Leading roles for supporting cast. *Cell* 82, 189-192.
- Tsubura, A., Inaba, M., Imai, S., Murakami, A., Oyaizu, N., Yasumizu, R., Ohnishi, Y., Tanaka, H., Morii, S., et Ikehara, S. (1988). Intervention of T-cells in transportation of mouse mammary tumor virus (milk factor) to mammary gland cells *in vivo*. *Cancer Res.* 48, 6555-6559.
- Vacchio, M.S., et Hodes, R.J., (1989). Selective decreases in T cell receptor V β expression. Decreased expression of specific V β families is associated with expression of multiple MHC and non-MHC gene products. *J.Exp.Med.* 170, 1335-1346.
- Vacchio, M.S., Kanagawa, O., Tomonari, K., et Hodes, R.J. (1992). Influence of T cell receptor V α expression on Mls^a superantigen-specific T cell responses. *J.Exp.Med.* 175, 1405-1408.
- Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P.G., Ploegh, H.L., et Tonegawa, S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4⁸⁺ T cells. *Cell* 71, 1205-1214.
- Veillette, A., Bookman, M.A., Horak, E.M., et 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., Bookman, M.A., Horak, E.M., Samelson, L.E., et Bolen, J.B. (1989). Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane protein tyrosine kinase p56^{lck}. *Nature* 338, 257-259.
- Vissinga, C.S., Charmley, P., et Concannon, P. (1994). Influence of a coding region polymorphism on the peripheral expression of a human TCR V β gene. *J.Immunol.* 152, 1222-1227.

- Viville, S., Neeffes, J., Lotteau, V., Dierich, A., Lemeur, M., Ploegh, H., Benoist, C., et Mathis, D. (1993). Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72, 635-648.
- von Boehmer, H. (1993). Tolerance by exhaustion. *Nature* 362, 696.
- von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76, 219-228.
- Wallace, V.A., Rahemtulla, A., Timms, E., Penninger, J., et Mak, T.W. (1992). CD4 expression is differentially required for deletion of Mls-1^a-reactive T cells. *J.Exp.Med.* 176, 1459-1463.
- Waanders, G.A., et MacDonald, H.R. (1992). Hierarchy of responsiveness *in vivo* and *in vitro* among T cells expressing distinct Mls-1^a reactive V β domains. *Eur.J.Immunol.* 22, 291-293.
- Waanders, G.A., Lussow, A.R., et MacDonald, H.R. (1993). Skewed T cell receptor V α repertoire among superantigen reactive murine T cells. *Int.Immun.* 5, 55-61.
- Wannamaker, L.W., et Schlievert, P.M. (1988). Exotoxins of group A streptococci. In *Handbook of bacterial toxins*, Vol. 4. C.M. Hardegree, A.T. Tu, Marcel Dekker, New York, ed, pp.267-295.
- Watret, K.C., Whitelaw, J.A., Froebel, K.S., et Bird, A.G. (1993). Phenotypic characterization of CD8⁺ T cell populations in HIV disease and in anti-HIV immunity. *Clin.Exp.Immunol.* 92, 93-99.
- Webb, S.R., Okamoto, A., Ron, Y., et Sprent, J. (1989). Restricted tissue distribution of Mls^a determinants. Stimulation of Mls^a-reactive T cells by B cells but not dendritic cells or macrophages. *J.Exp.Med.* 169, 1-12.
- Webb, S.R., et Sprent, J. (1990). Response of mature unprimed CD8⁺ T cells to Mls^a determinants. *J.Exp.Med.* 171, 953-958.
- Wei, S., Charmley, P., Robinson, M.A., et Concannon, P. (1994). The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics* 40, 27-36.
- Weiss, A., et Littman, D.R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.
- Weissenberger, J., Altmann, A., Meuer, S., et Flugel, R.M. (1994). Evidence for superantigen activity of the Bel 3 protein of the human foamy virus. *J.Med.Virol.* 44, 59-66.

- Wen, R., Cole, G.A., Surman, S., Blackman, M.A., et Woodland, D.L. (1996). Major histocompatibility complex class II-associated peptides control the presentation of bacterial superantigens to T cell. *J.Exp.Med.* *183*, 1083-1092.
- Westby, M., Manca, F., et Dlagleish, A.G. (1996). The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol. Today* *17*, 120-126.
- White, J., Herman, A., Pullen, A.M., Kubo, R.T., Kappler, J.W., et Marrack, P. (1989). The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* *56*, 27-35.
- White, J., Pullen, A., Choi, K., Marrack, P., et Kappler, J.W. (1993). Antigen recognition properties of mutant V β 3⁺ T cell receptors are consistent with an immunoglobulin-like structure for the receptor. *J.Exp.Med.* *177*, 119-125.
- Williams, G.T., et Smith, C.A. (1993). Molecular regulation of apoptosis: genetic controls of cell death. *Cell* *74*, 777-779.
- Wilson, R.K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R.K., et Hood, L.E. (1988) Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor α and β chain gene families. *Immunol.Rev.* *101*, 149-172.
- Winslow, G.M., Scherer, M.T., Kappler, J.W., et Marrack, P. (1992). Detection and biochemical characterization of the mouse mammary tumor virus 7 superantigen (Mls-1^a). *Cell* *71*, 719-730.
- Winslow, G.M., Marrack, P., et Kappler, J.W. (1994). Processing and major histocompatibility complex binding of the MTV7 superantigen. *Immunity* *1*, 23-33.
- Woodland, D.L., Pat Happ, M., Gollob, K.J., et Palmer, E. (1991). An endogenous retrovirus mediating deletion of $\alpha\beta$ T cells? *Nature* *349*, 529-530.
- Woodland, D.L., et Blackman, M.A. (1993). How do T-cell receptors, MHC molecules and superantigens get together. *Immunol. Today* *14*, 208-212.
- Woodland, D.L., Wen, R., et Blackman, M.A. (1997). Why do superantigens care about peptides. *Immunol. Today* *18*, 18-22.
- Wucherpfennig, K.W., et Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T-cell mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* *80*, 695-705.
- Yagi, J.J., Rath, S., et Janeway Jr., C.A., (1991). Control of T cell responses to staphylococcal enterotoxins by stimulator cell MHC class II polymorphism. *J.Immunol.* *147*, 1398-1405.

- Zagury, D., Bernard, J., Leonard, R., Cheynier, R., Feldman, M., Sarin, P.S., et Gallo, R.C. (1986). Long-term cultures of HTLV-III-infected T cells: A model of cytopathology of T-cell depletion in AIDS. *Science* 231, 850-853.
- Zhao, T.M., Whitaker, S.E., et Robinson, M.A. (1994). A genetically determined insertion/deletion related polymorphism in human T cell receptor β chain (TCRB) includes functional variable gene segments. *J.Exp.Med.* 180, 1405-1414.
- Zheng, B., Xue, W., et Kelsoe, G. (1994). Locus-specific somatic hypermutation in germinal centre T cells. *Nature* 372, 556-559.
- Zhou, P., Anderson, G.D., Savarirayan, S., Inoko, H., et David, C. (1991). Thymic deletion of $V\beta 11^+$, $V\beta 5^+$ T cells in H-2E negative, HLA-DQ β^+ single transgenic mice. *J.Immunol.* 146, 854-859.
- Zinkernagel, R.M., et Doherty, P.C. (1974). Immunological surveillance against altered self components by sensitized T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251, 547-548.