

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Rôle des Radeaux Lipidiques dans l'Immunosénescence
des Sous-populations de Lymphocytes T Humains

Par

ANIS LARBI

Service d'Immunologie, Centre de Recherche sur le Vieillissement
Programme d'Études Supérieures en Immunologie

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Sherbrooke
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Immunologie

Juin 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-25912-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-25912-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Dédiée à ma Famille, à Jean-Pierre
et à toute ma Communauté

Rôle des Radeaux Lipidiques dans l'Immunosénescence des Sous-populations de Lymphocytes T Humains :

Par ANIS LARBI

Service d'Immunologie, Centre de Recherche sur le Vieillissement, Programme d'Études Supérieures en Immunologie, Thèse présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Sherbrooke en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en

Immunologie

Juin 2005

RÉSUMÉ

Le vieillissement s'accompagne d'un déclin de l'immunité, c'est l'immunosénescence. Les lymphocytes sont des cibles du vieillissement et lors de la stimulation de leur récepteur (TCR) la production d'interleukine-2 est déficiente. Pour expliquer la perte de fonctionnalité des lymphocytes T avec le vieillissement humain, plusieurs hypothèses sont mises en avant dont celle suggérant un défaut de transmission du signal intracellulaire à partir du TCR. Plusieurs études ont démontré que des défauts de signalisation sont effectivement présents dans les voies de signalisation du TCR. La plupart des voies de signalisation sont affectées et il est possible qu'une défaillance en amont puisse toutes les expliquer. Cependant, aucune explication ne pouvait être apportée jusqu'à la découverte de l'existence des radeaux lipidiques membranaires. Ces radeaux lipidiques enrichis en cholestérol et molécules facilitent la signalisation intracellulaire en permettant la formation du signalosome. Ces structures sont initiatrices de la signalisation du TCR. Nous avons émis l'hypothèse que ce sont des défaillances dans les fonctions des radeaux lipidiques qui expliqueraient les altérations en aval de la membrane. Nous avons démontré que les cellules T quiescentes de la personne âgée (+ 65 ans) ont une quantité de cholestérol deux fois plus importante dans les radeaux lipidiques. Ceci s'accompagne d'une diminution de la fluidité. La modulation du contenu en cholestérol par la cyclodextrine permet de contrôler la fluidité membranaire. Cependant, la cyclodextrine a d'autres effets et n'est pas préconisée pour moduler les fonctions des lymphocytes T. De plus, LAT est dans un état de phosphorylation significativement supérieur avec le vieillissement. En ce qui concerne Lck, la molécule est hyper-phosphorylée dans les radeaux lipidiques. Cet état d'activation est relié au phénomène d'Inflamm-Aging. Lors de la stimulation du TCR, le recrutement des molécules de signalisation est diminué par rapport aux sujets jeunes (18-25 ans). La phosphorylation de LAT et Lck est significativement diminuée dans les radeaux lipidiques des lymphocytes CD4⁺ activés de personnes âgées. La signalisation issue du CD28 est altérée dans ces cellules (Akt). La mesure de la quantité de CD28 dans les radeaux lipidiques est significativement supérieure dans les cellules CD8⁺ comparativement aux cellules CD4⁺. Les cellules CD8⁺ ont un signalosome pré-formé alors que les lymphocytes CD4⁺ sont dépendants de la polarisation des radeaux lipidiques. La perte d'expression du CD28 chez les cellules CD8⁺ n'a pas de répercussion sur sa signalisation alors que les cellules CD4⁺ ont un défaut dans la phosphorylation de Akt malgré l'expression du CD28 inchangée. L'immunosénescence s'explique en partie par la perte de fonction des radeaux lipidiques dans les cellules CD4⁺. Ces résultats suggèrent que les fonctions des radeaux lipidiques dans les sous-populations lymphocytaires définissent la capacité des cellules à répondre et à s'adapter au milieu environnant.

Mots clés : lymphocytes T, vieillissement, radeaux lipidiques, TCR/CD28, cholestérol

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	I
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	V
Liste des abréviations.....	VI
Introduction.....	1
1. La réponse immunitaire adaptative, rôle des lymphocytes T.....	1
2. L'hypothèse révolutionnaire des radeaux lipidiques.....	7
2.1 Les microdomaines membranaires.....	8
2.2 Des microdomaines aux radeaux lipidiques.....	10
2.3 Fonctions générales des radeaux lipidiques.....	15
2.4 La synapse immune.....	20
2.5 Formation et rôle des radeaux lipidiques chez les lymphocytes.....	22
2.6 Radeaux lipidiques et caveolae.....	25
3. La signalisation intracellulaire des lymphocytes T.....	26
3.1 Le récepteur des cellules T (TCR).....	26
3.2 La signalisation dans le temps.....	30
3.3 La signalisation dans l'espace.....	35
3.4 Cholestérol et radeaux lipidiques.....	36
3.5 Modulation des radeaux lipidiques et cas pathologiques.....	40
4 Vieillesse.....	45
4.1 Problème du vieillissement de la population.....	45

4.2 Définition.....	46
4.3 L'immunosénescence.....	48
4.4 L'immunosénescence et la signalisation.....	53
4.5 Cholestérol, « inflam-aging » et radicaux libres dans l'immunosénescence.....	55
4.6. Immunosénescence et radeaux lipidiques.....	57
5.1 Hypothèse de départ.....	59
5.2 Objectifs du projet.....	59
Manuscrit I.....	60
Manuscrit II.....	78
Manuscrit III.....	115
Manuscrit IV.....	142
6. Discussion.....	188
6.1 Inflam-Aging.....	188
6.2 Immunosénescence.....	188
7. Radeaux lipidiques et vieillissement.....	190
7.1 L'augmentation du cholestérol membranaire.....	190
7.2 Métabolisme du cholestérol cellulaire et vieillissement.....	191
7.3 Le stress oxydatif et le transport du cholestérol avec le vieillissement.....	193
8. Fonctions des radeaux lipidiques avec le vieillissement.....	195
8.1 Fonctions des radeaux lipidiques avec le vieillissement : CD4 ⁺	197
8.2 Fonctions des radeaux lipidiques avec le vieillissement : CD8 ⁺	198
8.3 Signalisation différentielle entre lymphocytes CD4 ⁺ et CD8 ⁺	199
8.4 Quelles sont les fonctions des radeaux lipidiques chez les CD8 ⁺ ?.....	200

9. Rôle du CD28 dans l'immunosénescence.....	201
10. Modulation du cholestérol membranaire.....	202
11. Conclusion générale.....	204
Remerciements.....	208
Bibliographie.....	212

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Développement des lymphocytes CD4 ⁺ et CD8 ⁺	2
Figure 2. Présentation antigénique.....	4
Figure 3. Polarisation des radeaux lipidiques.....	6
Figure 4. Bicouche lipidique.....	9
Figure 5. Protocole de séparation des radeaux lipidiques.....	11
Figure 6. Coalescence des radeaux lipidiques.....	14
Figure 7. Organisation des radeaux lipidiques l _o /l _d	16
Figure 8. CD28 et production d'IL-2.....	17
Figure 9. Cycle des radeaux lipidiques.....	19
Figure 10. Synapse immune.....	21
Figure 11. Radeaux lipidiques / Caveolae.....	27
Figure 12. Récepteur des cellules T.....	29
Figure 13. Signalisation du TCR/CD28.....	32
Figure 14. Signalisation dans l'espace.....	37
Figure 15. Métabolisme du cholestérol.....	38
Figure 16. Hétérogénéité des radeaux lipidiques et cholestérol.....	41
Figure 17. Immunosénescence et radeaux lipidiques.....	207

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition lipide-signalisation des radeaux lipidiques.....	12
Tableau 2. Rôle des radeaux lipidiques dans le système immunitaire.....	24
Tableau 3. Les voies de signalisation induite par la stimulation du CD28.....	34
Tableau 4. Maladies où les radeaux lipidiques sont ciblés.....	45
Tableau 5. Maladies associées au vieillissement.....	47
Tableau 6. Altérations chez les lymphocytes T avec le vieillissement.....	51
Tableau 7. Étapes de signalisation du TCR qui sont défectueuses au cours du vieillessement.....	55

LISTE DES ABRÉVIATIONS

« High-slow pool » : fraction de cholestérol extraite des autres domaines membranaires

« Hormesis »: stimulation chronique ou répétée

« Inflam-Aging »: Inflammation chronique de la personne âgée

« Low-fast pool »: fraction de cholestérol extraite des radeaux lipidiques

ABCA1 : ATP Binding Cassette-A1

ACAT : acyl cholesterol-acyl-transférase

Apo-A1 : apolipoprotéine-A1

APP : protéine précurseuse de l'amyloïde beta

CD45RA⁺ : Cellule T naïve

CD45RO⁺ : Cellule T mémoire

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice antigène

CTxB : Sous-unité bêta de la choléra toxine

DAG : diacylglycérol

DPH : diphénylhexatriène

DRM : *detergent resistant membrane*

ERK: *Extracellular regulated kinase*

f : fluidité

FRET : *Fluorescence Resonance Electron Transfert*

GM1 : Ganglioside M1

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

HDL : lipoprotéines de haute densité

HMG-coA réductase : Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

IL-2 : Interleukine-2

IP3 : inositol trisphosphate

ITAM : *ImmunoTyrosine-based Activation Motif*

LAT : *Linker of Activated T-cells*

l_d : phase désordonnée de la membrane (liquid disorder)

LDL : lipoprotéines de faible densité

l_o : phase ordonnée de la membrane (liquid order)

LSCM : *Laser scanning confocal microscopy*

MAPK : *Mitogen Activated Protein kinase*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MBCD : méthyl-bêta-cyclodextrine

NF-AT : *nuclear factor-AT*

NF-kB : *nuclear factor-kB*

PIP2 : inositol bisphosphate

PKB : Protéine kinase B

PKC : Protéine kinase C

PLC γ -1 : phospholipase C gamma 1

PMN : polymorphonucléaires neutrophiles

poly K : poly-L-lysine

PTK : *protein tyrosine kinase*

r : anisotropie

SDS-PAGE : *Sodiumdodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SLE : *lupus erythémateux disséminé*

SMAC : *zone d'action de la synapse immune (supramolecular activation cluster)*

TCR : *Récepteur des cellules T (T-cell receptor)*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*

WASP : *Wiskott-Aldrich syndrome protein*

ZAP-70 : *Zeta-chain associated protein of 70 kDa*

INTRODUCTION

1. La réponse immunitaire adaptative, rôle des lymphocytes T

La réponse immunitaire se divise en deux branches, la réponse innée qui a peu de spécificité et la réponse adaptative qui elle, est très spécifique d'un antigène et qui possède une mémoire (*Gourley et al. 2004*). Les cellules immunitaires de la réponse adaptative comprennent les lymphocytes B et T. Les lymphocytes B mûrissent au niveau de la moelle osseuse tandis que les lymphocytes T nécessitent une maturation supplémentaire dans le thymus. Cette maturation va engendrer des cellules de type $CD4^+$ (T auxiliaires) impliquées dans la stimulation de l'immunité humorale ou cellulaire et des cellules $CD8^+$ (T cytotoxiques) impliquées dans l'élimination des cellules infectées ou cancéreuses (*Anderson et al. 2000*). Cette maturation est graduelle, puisque les cellules T immatures sont de type $CD4^+CD8^+$ et selon l'hypothèse stochastique ou isocratique, un des deux corécepteur va être exprimé par rapport à l'autre (FIGURE 1). La production lymphocytaire est très intense et beaucoup de lymphocytes seront éliminés soit par sélection positive afin de supprimer les cellules qui ne reconnaissent pas le soi, soit par sélection négative afin de supprimer les cellules qui reconnaissent le soi comme non-soi. Ces étapes de sélection et de maturation permettent un contrôle du système immunitaire et évitent ainsi toute déviance et risques de maladies auto-immunes (*Morel et al. 2003*).

Une fois mûres, les lymphocytes T quittent le thymus et entrent dans la circulation sanguine. Ce sont alors des cellules T naïves, puisqu'elles n'ont pas encore eu de contact avec un antigène.

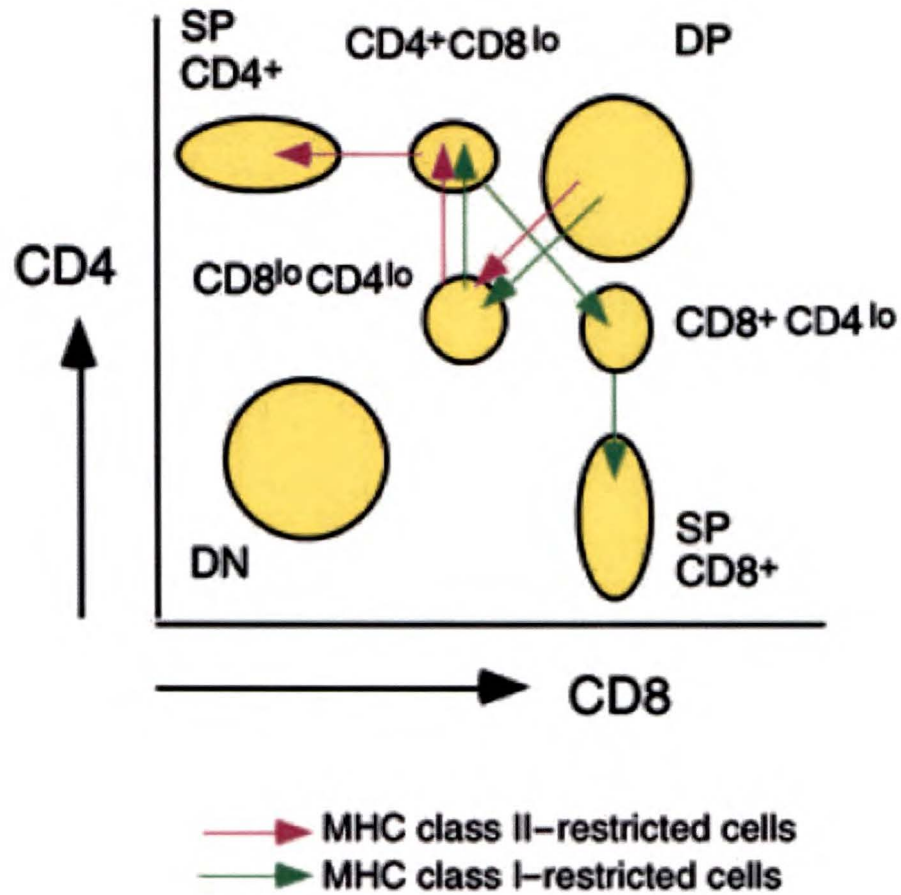


Figure 1. Développement des lymphocytes $CD4^+$ et $CD8^+$ dans le thymus suivant la restriction au CMH (*Kappes et al, Nat.Immunol, 2005*)

Représentation en diagramme de tests de cytométrie de flux analysant les proportions de cellules marquées avec les anticorps anti-CD4 et anti-CD8. Cette figure nous montre qu'à partir d'une cellule double positive ($CD4^+CD8^+$) et la perte du CD8 vont maturer les lymphocytes pour devenir simple positif, $CD4^+$ ou $CD8^+$.

Ces cellules dites naïves ($CD45RA^+$) resteront en circulation jusqu'à la rencontre d'un antigène présenté par une cellule spécialisée, la cellule présentatrice d'antigène (CPA) (*Heath et al. 2004*). En effet, la reconnaissance du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du soi par la cellule T grâce à la restriction au CMH (*Zinkernagel et al. 1979*) est essentielle à l'initiation de la réponse (FIGURE 2). L'interaction cellule T-CPA (ex : cellules dendritiques) aura lieu au niveau des ganglions lymphatiques et permettra la première étape de la réponse immunitaire. Lorsque l'antigène aura pénétré l'organisme, les CPA vont se charger de l'identifier et au niveau de leur cytosol ils vont cliver l'antigène en parties inactives. C'est une des fonctions du système du protéasome (*Goldberg et al. 2002*) dans le cas de la présentation antigénique via le CMH de classe I. Le clone de lymphocyte sera de type $CD4^+$ ou $CD8^+$ dépendamment du type antigénique. Le récepteur des cellules T (TCR) est composé de plusieurs sous-unités (*Frank et al. 1991*) et nécessite la coopération de molécules costimulatrices et/ou de corécepteurs afin d'atteindre un état d'activation optimum de la cellule (*Salazar-Fontana et al. 2001*). Le message transmis par le complexe CMH-antigène au TCR sera propagé (*Siegel et al. 1991*) et contrôlé à partir de la membrane. En effet, des études récentes ont démontré l'existence de microdomaines membranaires (*Simons et al. 1997*) appelés radeaux lipidiques (« lipid rafts »), qui sont responsables de la formation de la plateforme de signalisation (signalosome) induisant l'activation lymphocytaire (*Janes et al. 1999*). Ces radeaux lipidiques, d'un agencement très spécifique par rapport au reste de la membrane (*Nusrat et al. 2000*), sont enrichis en cholestérol et sphingolipides ainsi que de certaines molécules de signalisation (*Millan et al. 2001*). Ces molécules de signalisation sont pour la plupart celles impliquées dans la transduction du signal provenant du TCR (*Janes et al. 1999*), d'où le rôle très important de ces radeaux lipidiques dans l'activation lymphocytaire et plus généralement dans la réponse immune (*Baumruker et al. 2002*).

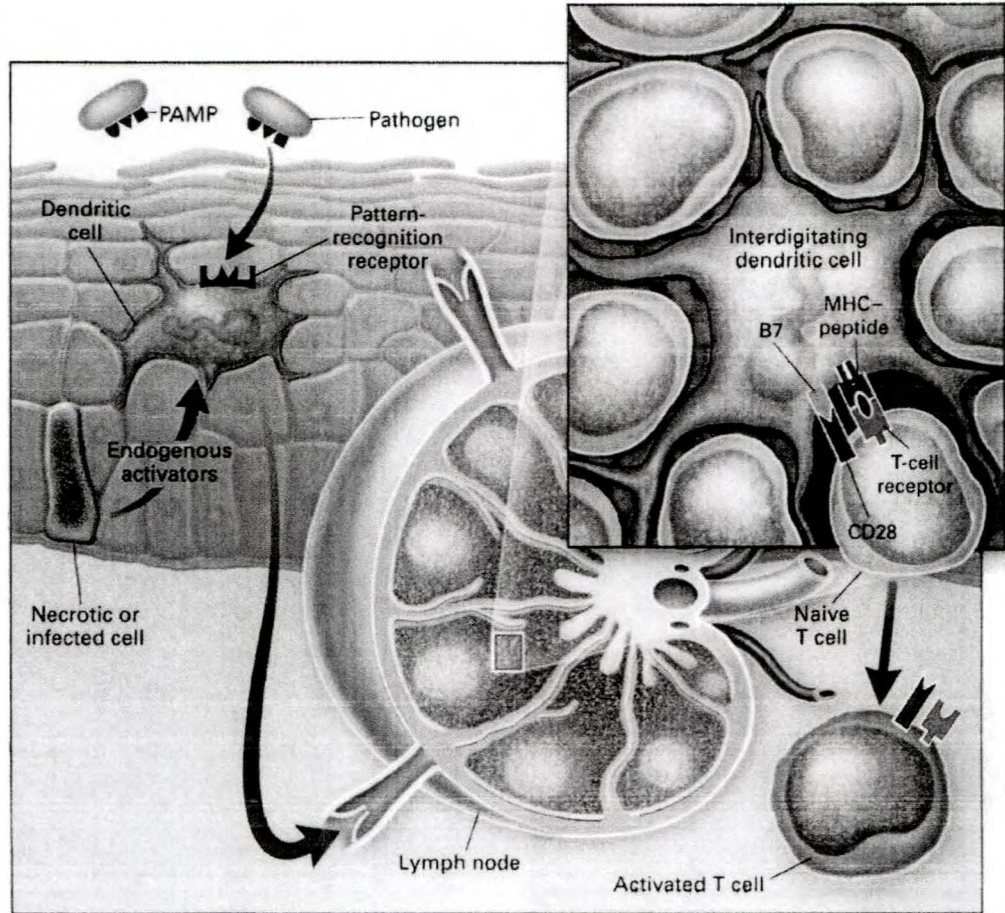


Figure 2. Présentation antigénique. (Delves et al, N Engl J Med, 2000)

Le pathogène est reconnu par la CPA. La présentation de l'antigène aux cellules T aura lieu dans les organes lymphoïdes primaires (ganglions lymphatiques). Grâce au TCR et au CMH, la reconnaissance pathogéniques est possible. Cette étape active le lymphocyte T qui peut initier une prolifération pour induire la réponse.

Dès que les radeaux lipidiques de la membrane se joignent au site de présentation de l'antigène; phénomène appelé coalescence ou polarisation (FIGURE 3) (*Varma et al. 1998*); la cellule se trouve dans un état prêt à l'activation. Il a été démontré dans le cas des cellules CD4⁺, que la molécule costimulatrice CD28 est nécessaire à ce phénomène de polarisation (*Viola et al. 1999*). La formation de ce signalosome va permettre la transmission du signal via de multiples voies de signalisation au niveau du cytosol et jusqu'au noyau (*Razzaq et al. 2004*). La réponse induite permettra d'augmenter l'expression membranaire de certains récepteurs (CD25) de même que la sécrétion de cytokines (IL-2) (*Marmor et al. 2001*). La réponse sera contrôlée en terme d'intensité et de durée (*Jiang et al. 2004*), ce qui permet d'éviter tout débordement et tout état pro-inflammatoire non-désiré. Ce contrôle est déterminé par la force et la durée du contact entre la CPA et le lymphocyte T, un phénomène connu sous le nom de synapse immune (*Dustin et al. 1999*). Cette synapse immune va permettre de réguler le ratio des cytokines et chemokines secrétés par les cellules immunitaires (*Bromley et al. 2001*). Tandis que les chemokines vont réguler l'abondance des cellules au site d'inflammation, les cytokines elles, vont réguler leur état d'activation. L'interleukine-2 est la cytokine de prédilection des lymphocytes T (*Paetkau, 1985*). Cette cytokine a un effet autocrine et paracrine ce qui accentue son efficacité. C'est pour cela qu'elle a un rôle primordial lors de l'expansion clonale. C'est de cette manière qu'à lieu la réponse immunitaire adaptative (*Judd et al. 2000*). La terminaison de la réponse immunitaire se traduit par une diminution de sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-2, TNF- α) et une augmentation des cytokines qui tendent à diminuer l'intensité de la réponse (IL-10).

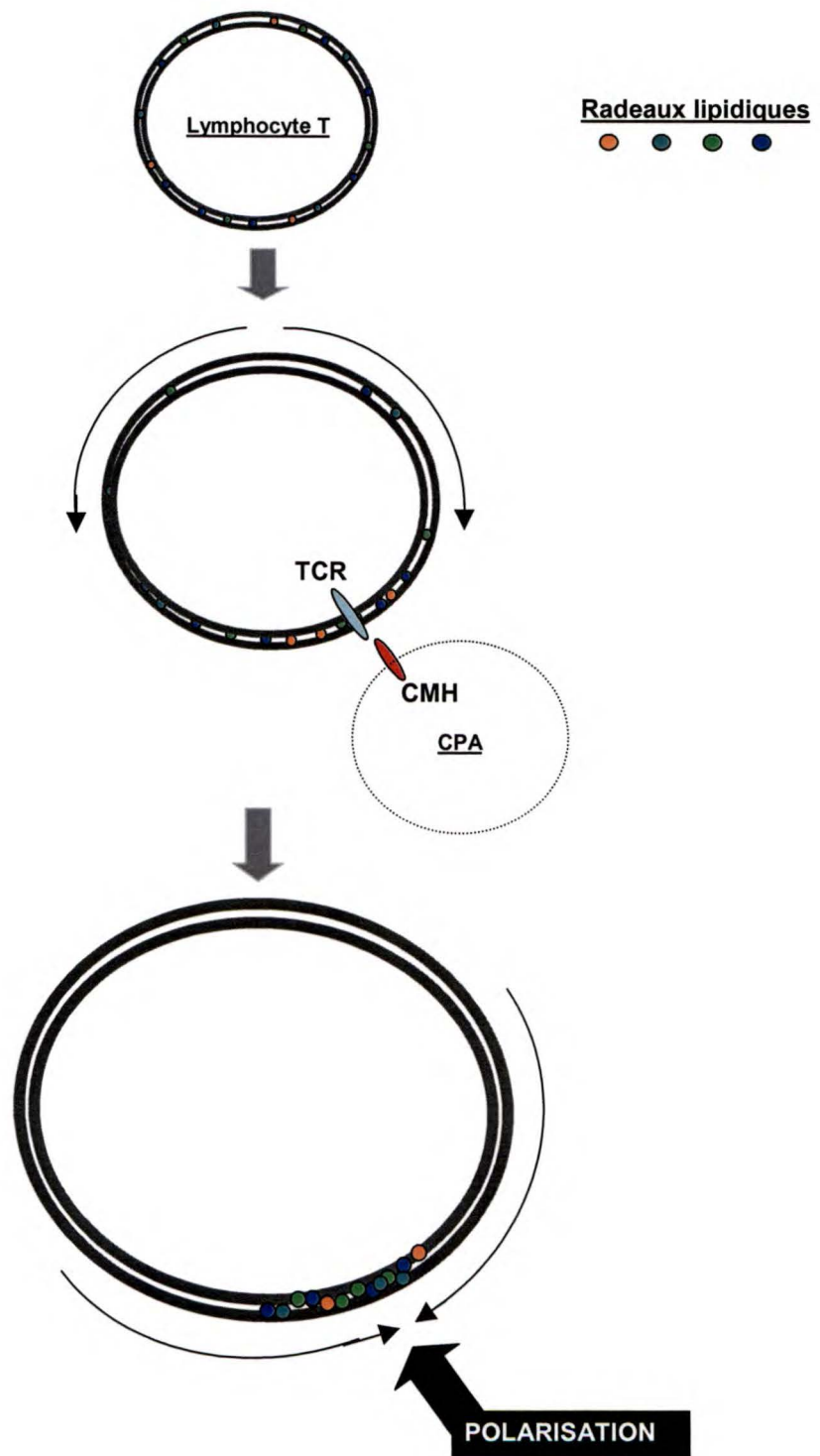


Figure 3. Phénomène de polarisation des radeaux lipidiques des lymphocytes T suite à la ligation du TCR et CD28.

Les lymphocytes activés vont alors être éliminés par apoptose (*Baumann et al. 2002*). Cependant, certains d'entre eux vont survivre pour devenir des cellules mémoires (CD45RO⁺). Cette mémoire immunitaire permet d'obtenir une réponse beaucoup plus rapide et intense lors d'une future rencontre avec ce même antigène. La réponse du lymphocyte va donc être la conséquence du signal reçu par le récepteur (TCR). Il convient donc de mettre en avant le rôle du contact physique entre les cellules et le rôle de la membrane dans cette activation cellulaire (*Friedl et al. 2002*).

2. L'hypothèse révolutionnaire des radeaux lipidiques

L'organisation de la membrane des cellules de l'organisme est connue depuis les travaux de *Davson et Danielli* en 1935. Ces travaux sont à l'origine de la théorie de la bicouche lipidique laquelle a, depuis, intégré les connaissances en biologie et en histologie. La bicouche membranaire, qui a été observée en microscopie, est apparue organisée de manière continue et invariable du pourtour cellulaire (*Wallach, 1969*) et définit la séparation entre le cytosol et le milieu environnant. Cette bicouche lipidique est composée de phospholipides comprenant une tête de groupements phosphorés hydrophiles et une queue d'acides gras hydrophobes (FIGURE 4). Cet agencement bien spécifique permet une certaine flexibilité à la membrane. Cette flexibilité permet les échanges entre le milieu environnant et le milieu intracellulaire. Les échanges moléculaires, ioniques, lipidiques, peptidiques, chimiques se font via la membrane. Ils peuvent être directs lorsque le composé traverse directement la membrane ou indirects lorsque le composé nécessite la présence d'un récepteur. C'est la découverte des récepteurs à la surface membranaire qui a permis de donner un rôle plus important à la membrane cellulaire (*Ishiko et al. 1959*), bien au-delà de son rôle de barrière physique. C'est de là qu'est venue le modèle de Singer-Nicholson (1972) qui inclus les protéines dans la bicouche lipidique, ce que le modèle de Danielli ne prenait pas en

compte. Singer et Nicholson (1972) proposent alors que les protéines soient réparties et insérées dans la double couche de lipides. Certaines protéines traversent la double couche de lipides, d'autres sont simplement incluses dans une des deux couche. Cette théorie apparait aujourd'hui comme étant incomplète et va être bouleversée par une découverte fortuite...comme c'est souvent le cas pour les grandes découvertes.

2.1 Les microdomaines membranaires

Il est courant d'utiliser l'ultracentrifugation pour séparer les organites cellulaires telles que les mitochondries (*Pryme, 1986*). Aussi ces méthodes sont couramment utilisées pour séparer les membranes cellulaires. L'amélioration des connaissances dans le domaine a permis de séparer les composants de la membrane. Certains groupes avaient même émis l'hypothèse que certaines fractions issues d'ultracentrifugation d'un gradient de sucrose à partir d'un concentré membranaire étaient composées très différemment du reste (*Resch et al. 1983*) et pouvaient représenter des domaines spécifiques de la membrane. Cette hypothèse a été confirmée par plusieurs études qui ont démontré que certaines fractions issues des ultracentrifugations (FIGURE 5) avaient une composition très différente du reste des fractions (*Barenholz, 2002; Kropshofer et al. 2002*). Ces fractions membranaires sont riches en cholestérol et sphingolipides. L'ultracentrifugation se faisant à partir d'un lysat préparé à l'aide d'un détergent non-ionique, le Triton X-100 (*London et al. 2000*), certains pensaient que c'est dû à une affinité et une interaction différentielle de certains lipides de la membrane (FIGURE 5). C'est ce que certains encore aujourd'hui appellent artéfact (*Munro, 2003*). En effet, l'existence de microdomaines membranaires n'a pu être révélée de manière directe. Les techniques utilisées étaient pour la plupart les techniques de chromatographie (*Ardail et al. 1990*).

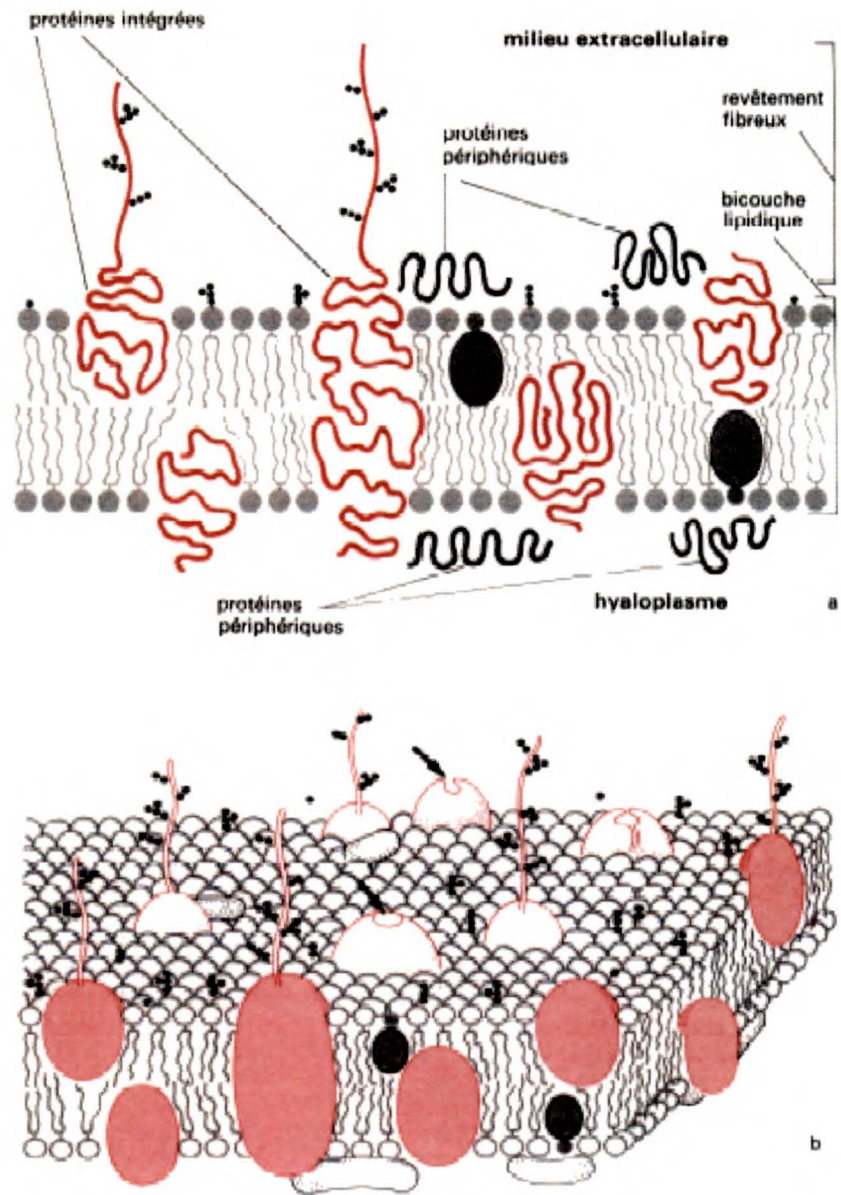


Figure 4. La bicouche lipidique, modèle de Singer-Nicholson, 1972

Ce n'est qu'en 1994, qu'un groupe eût l'idée de soumettre ces fractions membranaires à d'autres expérimentations dont les techniques s'inspiraient davantage de la biologie et de l'immunologie (*Arreaza et al. 1994*). Ainsi, en analysant par électrophorèse les fractions de sucrose, *Arreaza et al.* ont mis en évidence la présence de molécules de signalisation dont la première fût identifiée comme étant la protéine p62^{yes}. Certaines molécules étant présentes, mais de manière spécifique à ces domaines, i.e le reste des fractions en était dépourvu. Cette étude a corrélé la composition lipidique de ces fractions avec leur composition en molécules et protéines de signalisation (*von Haller et al, 2001*). Dès lors, la communauté scientifique a pu soumettre de manière significative l'hypothèse de l'existence de microdomaines membranaires, enrichis en cholestérol et en sphingolipides et composés de molécules de signalisation (TABLEAU 1). Cependant, ces études n'ont pas été faites sur un type cellulaire du système immunitaire seulement mais sur plusieurs types cellulaires très différents.

2.2 Des microdomaines aux radeaux lipidiques

L'existence de ces microdomaines va révolutionner le concept de la bicouche lipidique uniforme connu jusqu'à présent. Les microdomaines membranaires sont enrichis de certaines classes de lipides ce qui leur confère la dénomination de microdomaines lipidiques. Fait surprenant, un ganglioside, le ganglioside M1 (GM1) se retrouve de manière très spécifique dans les fractions enrichies en cholestérol/sphingolipides et en molécules de signalisation (*Nobile-Orazio et al. 1994*). Ce qui lui a valu d'être le marqueur spécifique des microdomaines lipidiques (*Naslavsky et al. 1997; Orlandi et al. 1998*). Il a fallu attendre quelques années pour que des groupes de recherche s'intéressent aux microdomaines des lymphocytes T.

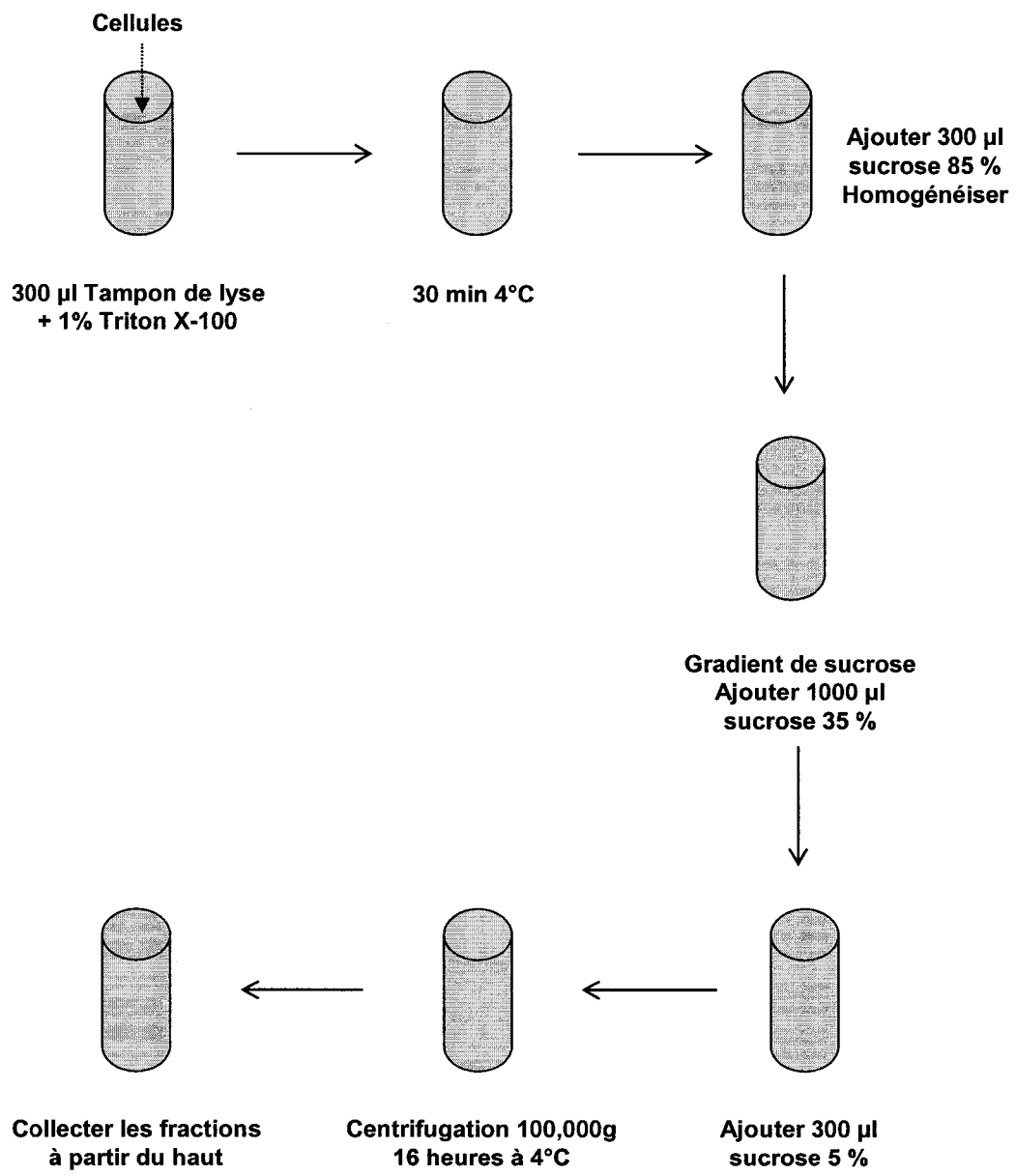


Figure 5. Protocole de séparation des radeaux lipidiques

Lipides	Molécules de signalisation
Cholestérol	LAT
Sphingolipides	SLP-76
Sphingomyélines	p56 ^{Lck}
Céramides	PI3K
Gangliosides	TCR
	CD4 (transitoire)
	GPI
	CD28
	CD25
	ZAP-70
	Vav
	Csk
	phospho-Bad
	Fas / FADD
	PLC- γ 1
	PKC θ
	Akt/PKB
	IKK

Tableau 1. Composition lipidiques et protéiques des radeaux lipidiques

En effet, *Viola et al.*, (1999) ont marqué les microdomaines lipidiques des lymphocytes T en utilisant la sous-unité bêta de la toxine de choléra (CTxB). Cette CTxB va se lier au GM1, ce qui permet de tracer les microdomaines lipidiques (*Viola et al. 1999*). Ils ont ainsi pu démontrer leur existence *in vitro* en utilisant la microscopie confocale (FIGURE 6). Cette étude a alors révélé la capacité de ces domaines enrichis en GM1 à polariser au site de stimulation. D'où le nom de radeaux lipidiques, faisant référence aux radeaux faits de matières plus compactes et glissants sur un environnement plus fluide. Dans les lymphocytes T, les radeaux lipidiques sont des structures enrichies en certains lipides dont le cholestérol qui stabilise leur structure. De ce fait, ces structures sont ordonnées d'une manière spécifique dite « liquid ordered » (l_o) par rapport au reste de la membrane (*Wang et al. 2000*) qui est en état « l_d » ou « l_c » (liquid disordered) (FIGURE 7).

Dans le cas du récepteur des cellules T (TCR) ainsi que la molécule co-stimulatrice CD28, les domaines « l_o » vont polariser au site de stimulation (*Sedwick et al. 1999*). Les études qui ont permis d'observer ce phénomène ont été menées en utilisant des billes recouvertes d'anticorps ciblant le TCR et le CD28. L'utilisation de billes ciblant le TCR seul ne permet pas d'obtenir cette polarisation (*Viola et al. 1999*). Fait marquant dans la relation et le rôle des radeaux lipidiques dans l'activation lymphocytaire, pour atteindre son état d'activation maximum, le lymphocyte nécessite à la fois la stimulation via le TCR et le CD28 (*Acuto et al. 2003*). Cela nous mène à penser que la stimulation du CD28 induit la polarisation des radeaux lipidiques, ce qui permet une activation complète du lymphocyte T qui se traduit par la production d'interleukine-2 (IL-2) et la prolifération (FIGURE 8) (*Nel, 2002*). Ces résultats *in vitro* ont aussi été confirmés en utilisant des cellules présentatrices d'un antigène (CPA) (*Hiltbold et al. 2003*), ce qui se traduirait par une expansion clonale *in vivo*. Ainsi, les radeaux lipidiques auraient un rôle primordial à jouer dans l'initiation, la régulation et la terminaison de la réponse immune.

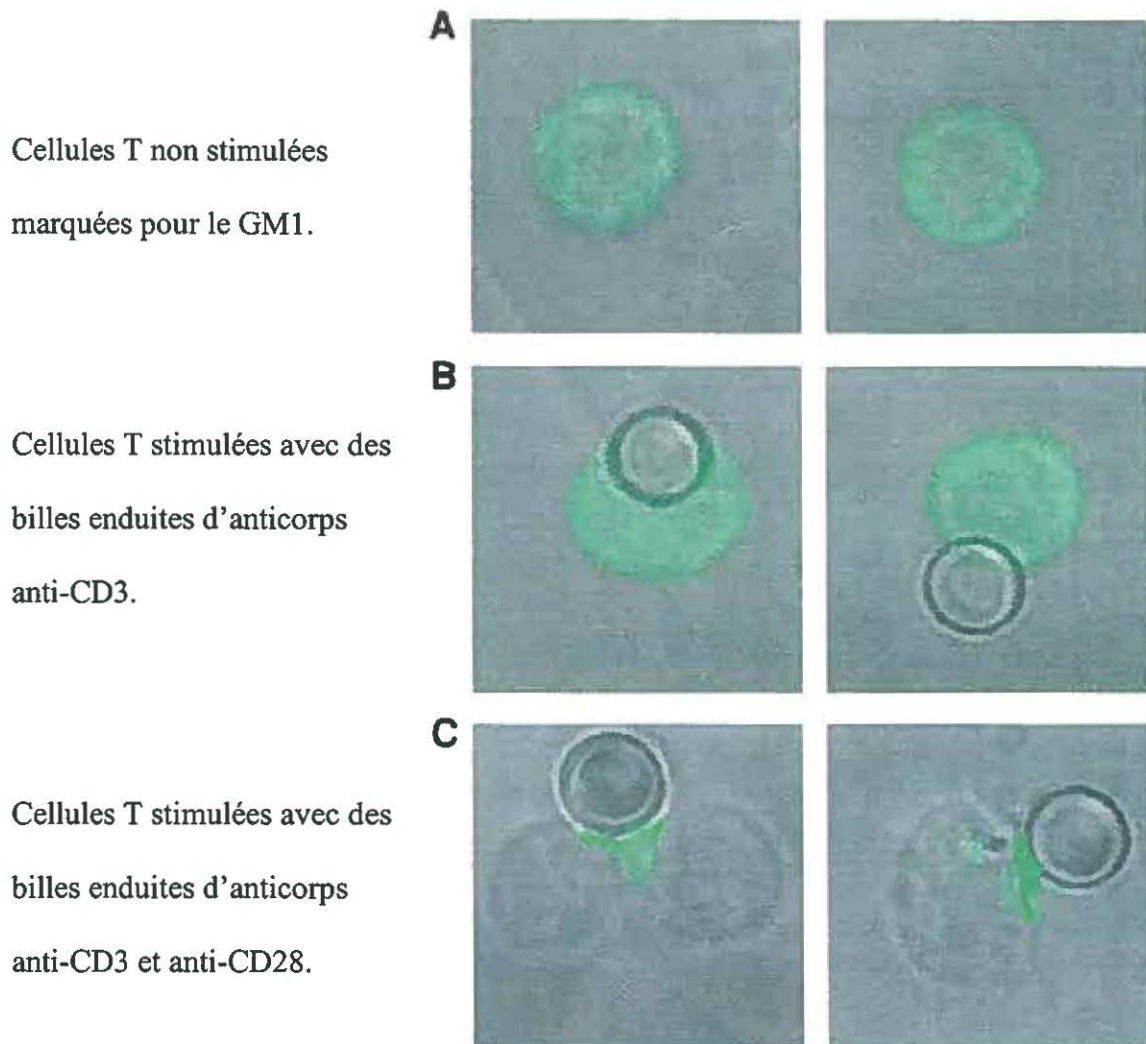


Figure 6. Polarisation des radeaux lipidiques.

(Viola et al. *Science*, 1999)

2.3 Fonctions générales des radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques sont des structures impliquées dans diverses fonctions cellulaires (*Cross, 2004; Camarota et al. 2004; Taylor et al. 2002*). Ces fonctions vont dépendre des propriétés des radeaux lipidiques et du type cellulaire. La fonction primaire des radeaux lipidiques des cellules immunitaires est d'induire une signalisation. La durée, l'intensité ainsi que le type de signalisation vont dépendre du récepteur sollicité. Dans le cas précis des lymphocytes T, les radeaux lipidiques fonctionnent comme une plateforme de signalisation du TCR (*Hoessli et al. 2000*), d'une part en permettant l'association de base et d'autre part en favorisant le recrutement de certaines molécules de signalisation (ex : p56^{Lck}, LAT, PKC- θ). Les molécules impliquées dans l'activation lymphocytaire y seront recrutées alors que celles habituellement inhibitrices de l'activation lymphocytaire en seront exclues (*Drevot et al. 2002*). C'est ce qu'on observe lors de la polarisation.

Pour garder cette capacité, la cellule maintient les radeaux lipidiques de sa membrane en produisant continuellement du cholestérol et en régénérant les radeaux lipidiques (*Harder, 2003*). Lors d'une activation, ils vont entrer dans un cycle de régénération. En effet, lors de l'activation lymphocytaire l'association des molécules de signalisation va être modulée par modification post-transcriptionnelle de ses molécules (*Resh, 2004*). Ces modifications incluent la palmitoylation essentiellement mais aussi l'acylation et la farnésylation. Le recrutement des molécules de signalisation décrit précédemment va donc être rendu possible par ces modifications post-transcriptionnelles (FIGURE 9). En fin d'activation, la cellule T va initier la « dé-palmitoylation » de ces molécules de signalisation ce qui va induire leur dissociation de la plateforme de signalisation des radeaux lipidiques. Ce cycle va aussi inclure les lipides (*Fielding et al. 2004*).

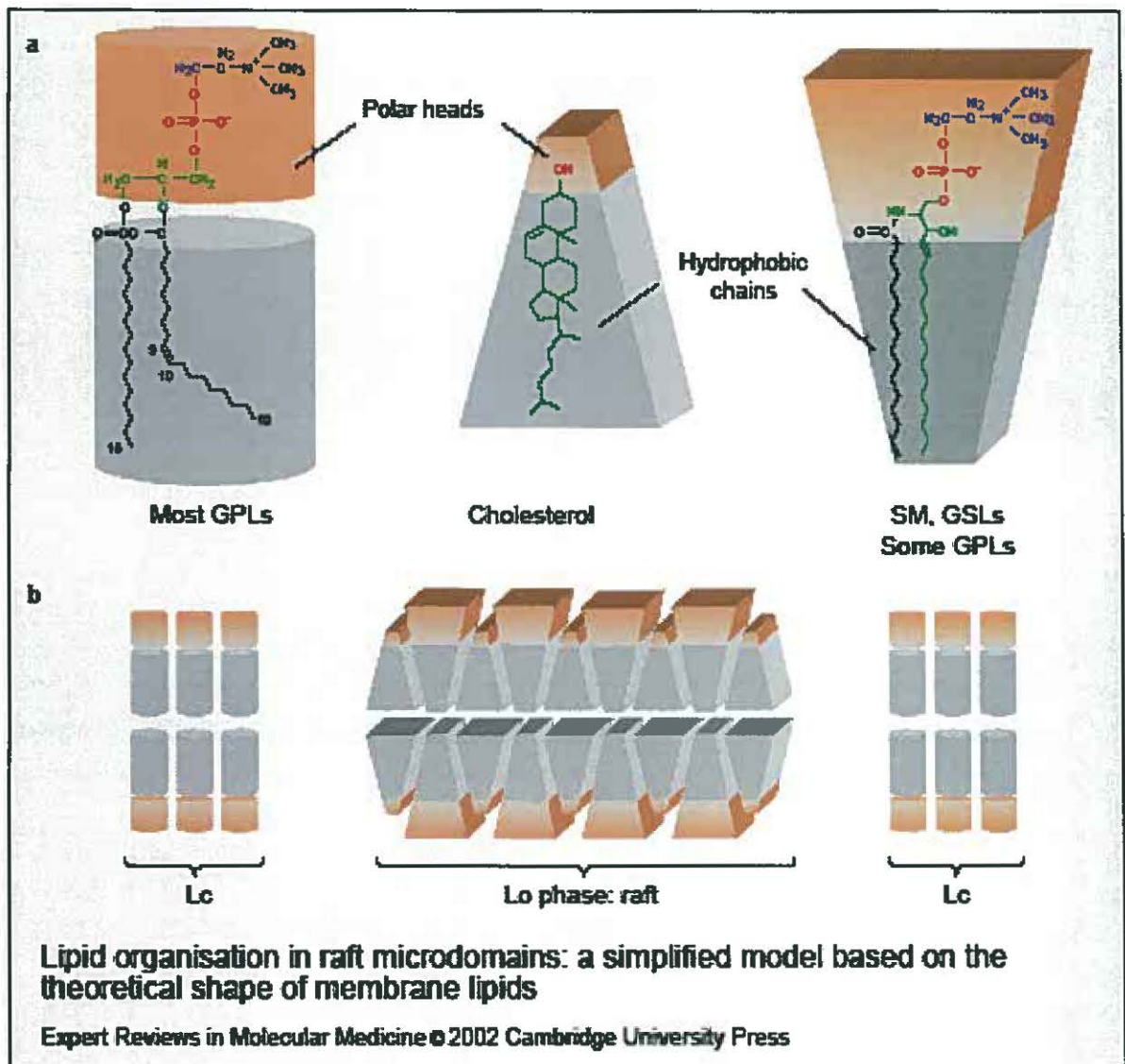


Figure 7. Organisation des rafts l_o/l_d . (Fantini et al. *Exp Rev Mol Med*, 2002)

l_c : “liquid disordered phase”

l_o : “liquid ordered phase”

SM : sphingomyéline

GPL : glycosphospholipides

GSL : glycosphingolipides

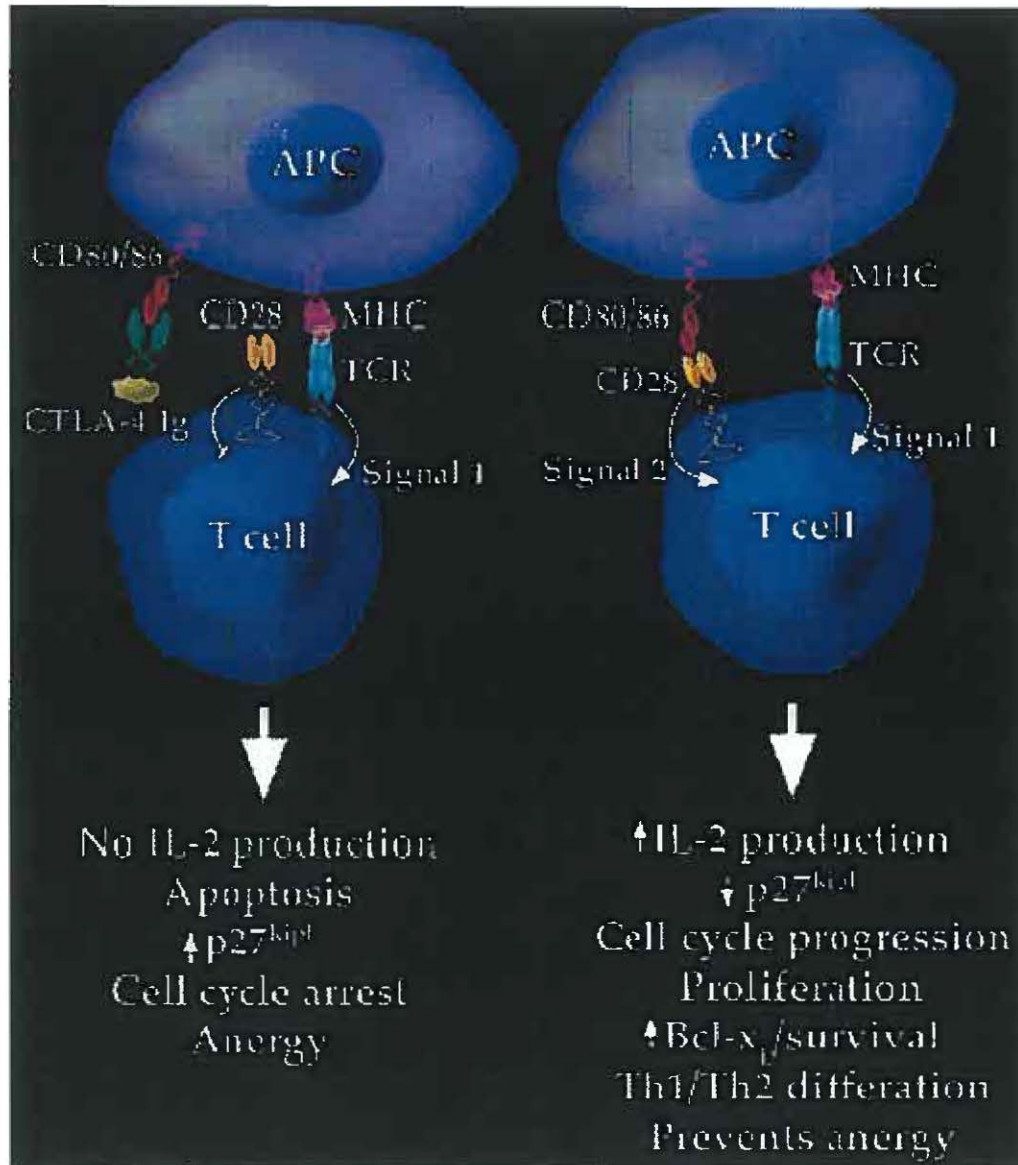


Figure 8. CD28 et production d'IL-2. (Nel, *J Allergy Clin Immunol*, 2002)

Le signal 1 seul (TCR) n'induit pas la production d'IL-2. C'est l'addition du signal 2 (CD28) qui va initier l'activation du lymphocyte T.

En effet, lors de l'activation il va y avoir un échange du cholestérol entre la membrane lymphocytaire et le milieu extracellulaire. Le cholestérol a donc un rôle important non seulement dans l'organisation de la membrane mais aussi lors de l'activation lymphocytaire. C'est en régulant le type et la quantité de molécules présentes dans les radeaux lipidiques que la cellule régule ses fonctions et détermine son niveau d'activation (*He et al. 2005*). Dans notre cas, le niveau d'activation des lymphocytes T dépend de la stimulation initiale du TCR et de son corécepteur, le CD28. Cependant, il dépend aussi de la durée des signaux qui persistent entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène. Ce contact physique entre CPA et lymphocyte T engendre la polarisation des radeaux lipidiques et permet la mise en place de la synapse immune (*Grakoui et al. 1999*) entre ces deux cellules. Cette stabilité physique prolongée entre lymphocyte T (TCR, CD28) et CPA (CMH, CD80/86) est nécessaire à la production IL-2 et à l'expansion clonale du lymphocyte T. La synapse immune est formée bien après le phénomène de polarisation des radeaux lipidiques. Cependant, de la polarisation de ces derniers va dépendre la formation de la synapse immune, dépendamment de la composition qualitative et quantitative en molécules de signalisation (*Grakoui et al. 1999*). Les radeaux lipidiques sont donc les premières structures impliquées dans l'activation des lymphocytes T et permettent de finaliser l'activation cellulaire par la mise en place de la synapse immune. Tous ces phénomènes impliquent un réarrangement de la membrane afin de faciliter les mouvements à travers la membrane en elle-même mais aussi entre elle et le cytosol. Ces réarrangements sont rendus possible grâce aux composantes du cytosquelette (*Krawczyk et al. 2001*). Ce sont les molécules de la famille ERM (ezrin-radixin-moesin) qui sont responsables de ces modifications structurales (*Tomas et al. 2002*). Néanmoins, les informations à ce niveau sont encore peu nombreuses pour valider une hypothèse sur le sujet.

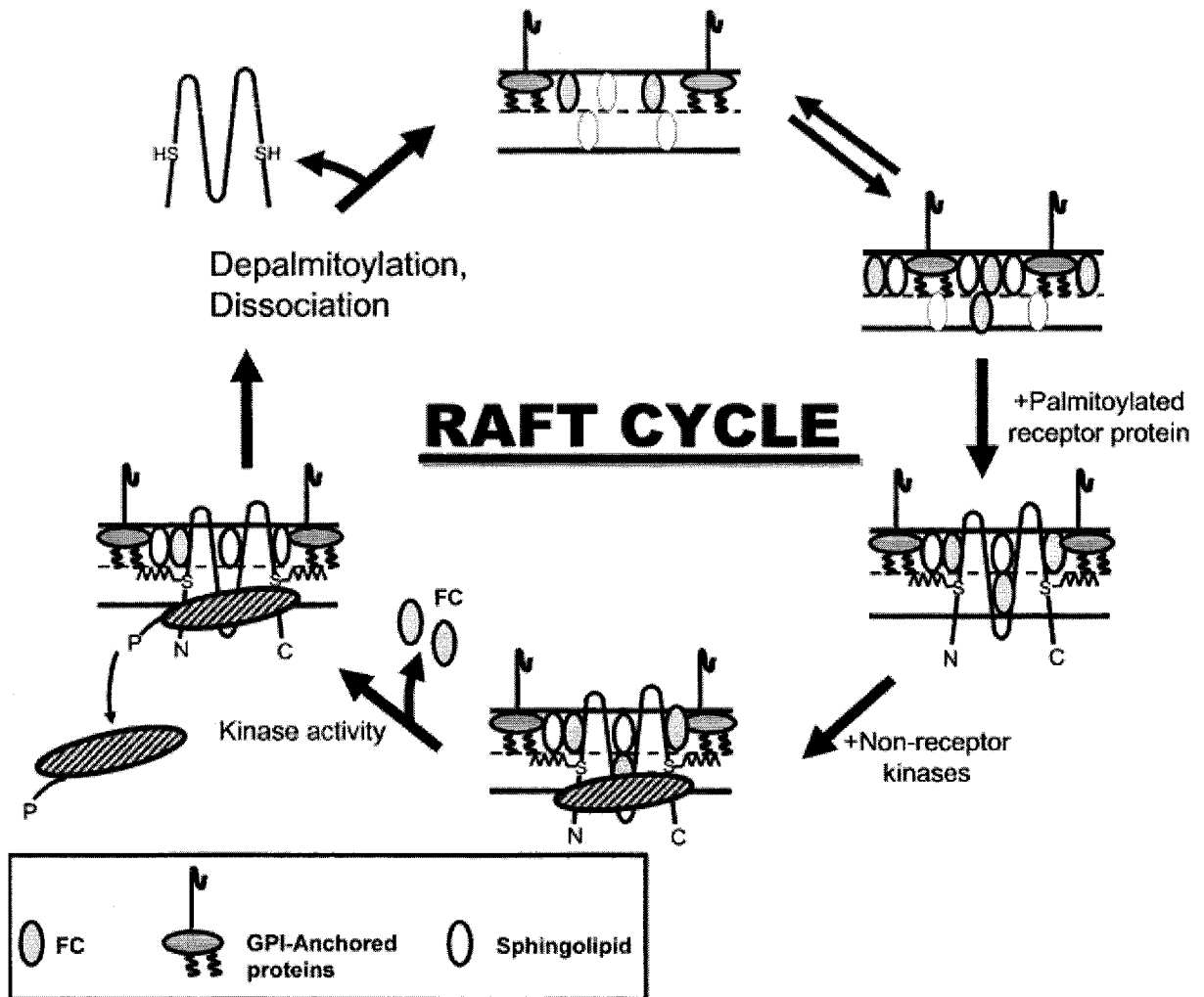


Figure 9. Cycle des radeaux lipidiques. (Fielding et al, *Biochem Soc Trans*, 2004)

FC : cholestérol libre

Lors de l'activation le lymphocyte T entre dans un cycle cellulaire. Parallèlement, la cellule entre dans son cycle de radeaux lipidiques qui implique les modifications post-transcriptionnelles des protéines ainsi qu'un échange de cholestérol avec le milieu environnant.

2.4 La synapse immune

La synapse immune a pu être révélée grâce à l'utilisation de techniques de microscopie de pointe telles que la microscopie confocale (*Groves et al. 2003*), le « Fluorescence Resonance Energy Transfer » (FRET) (*Vamosi et al. 2004*) ou encore le « Bioluminescence Resonance Energy Transfer » (BRET) (*Boute et al. 2002*). La synapse immune se définit par le contact physique entre la CPA et le lymphocyte. Ainsi, les molécules de signalisation vont se réorganiser en fonction du besoin de la cellule (*Sims et al. 2004*). À plus long terme, i.e au delà de 30 minutes de contact entre la CPA et le lymphocyte T, il va y avoir formation de deux zones distinctes. La formation de ces zones « SMAC » (supramolecular activation cluster) définit une zone centrale (central SMAC) composée du TCR, CD28 (*Burack et al. 2002; Grakoui et al. 1999*) ainsi que des molécules de signalisation nécessaire à l'activation de la cellule T ainsi que de la contrepartie CMH + B7 pour la CPA. Ces molécules sont celles présentes dans les radeaux lipidiques et qui ont été mis à disposition grâce à la polarisation. La zone périphérique (peripheral SMAC) est composée essentiellement de molécules d'adhésion telles que le « intracellular adhesion molecule-1 » (ICAM-1) pour la CPA et son co-récepteur chez le lymphocyte « very late antigen-4 » (VLA-4) (FIGURE 10). D'autres études ont validé ce modèle et ont permis de mettre en évidence le rôle de plusieurs autres molécules d'adhésion et intégrines (*Ardouin et al. 2003*). En effet, les intégrines peuvent être présentés dans les radeaux lipidiques (*Holleran et al. 2003*) et ainsi faciliter le contact avec les surfaces correspondantes lors de la migration ou lors du contact cellulaire. La polarisation des radeaux lipidiques joue donc un rôle primordiale dans la formation de la synapse immune en excluant les molécules non nécessaires à l'activation cellulaire ainsi qu'en modulant la quantité de molécules de signalisation. La polarisation va donc induire la formation de la synapse immune et cette dernière va réguler la durée, l'intensité ainsi que la terminaison de la réponse immune.

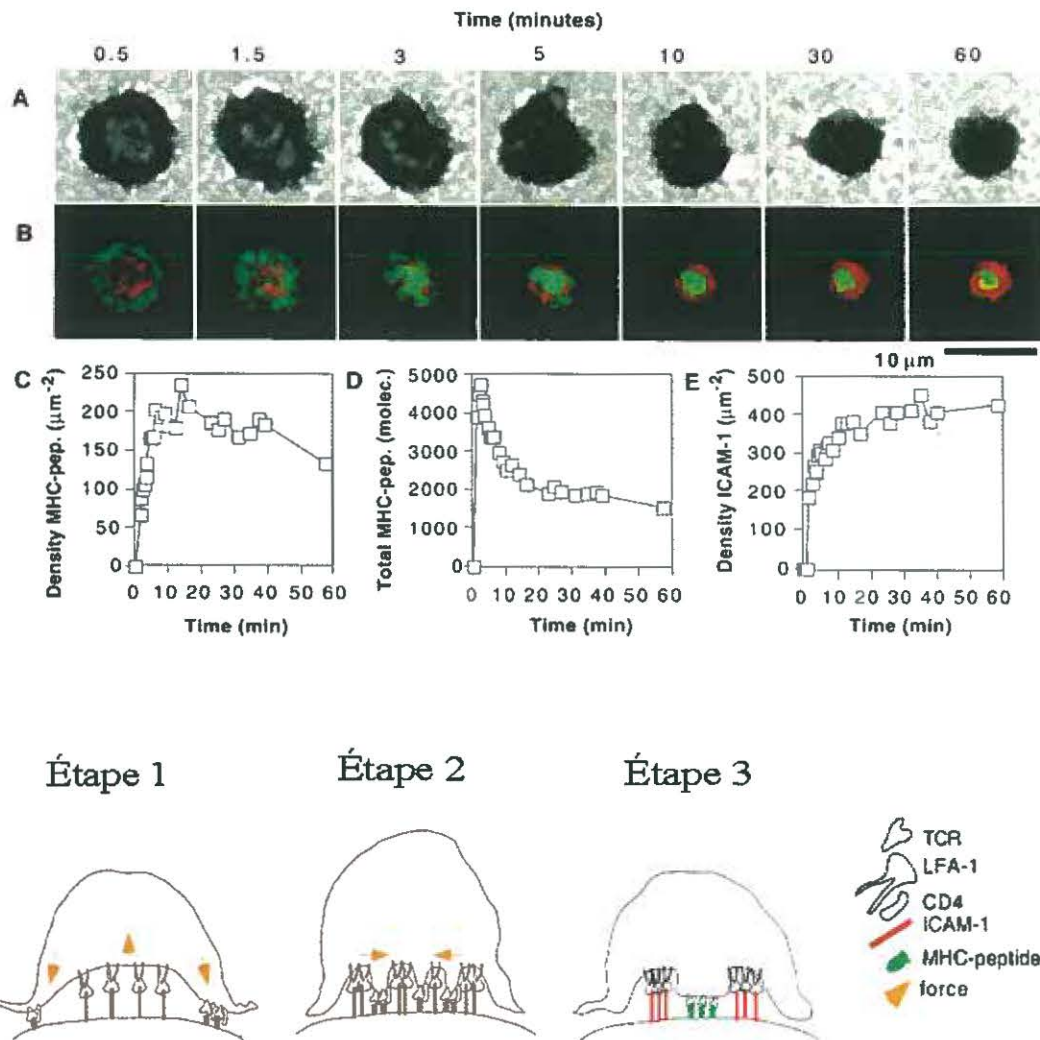


Figure 10. Synapse immune. (Grakoui et al, *Science*, 1999)

A synapse immune mature se forme après un contact de 30 minutes entre le lymphocyte T et la CPA. Les molécules d'adhésion vont se loger sur le pourtour de la synapse (p-SMAC, en rouge) lors des étapes de sa formation.

2.5 Formation et rôle des radeaux lipidiques des lymphocytes

Les cellules à propriétés phagocytaires et cytotoxiques telles que les neutrophiles vont posséder des radeaux lipidiques très différents (*Katsumata et al. 2001*) des lymphocytes qui n'ont pas ces fonctions. Cependant, ces variations de composition peuvent aussi être présentes au niveau d'une même population, les lymphocytes.

La maturation lymphocytaire dans le thymus va fournir des cellules fonctionnelles. Cependant, il est difficile de définir à quel moment les radeaux lipidiques sont formés, si les radeaux lipidiques sont nécessaires, ou s'ils participent à cette maturation. La participation des radeaux lipidiques à plusieurs phénomènes immunitaires est reconnue (TABLEAU 2). Une équipe de recherche s'est intéressée au sujet et a pu mettre en évidence les radeaux lipidiques chez des lymphocytes T immatures (*Ebert et al. 2000*). Malgré la présence de domaines riches en GM1, les lymphocytes T immatures $CD4^+CD8^+$ ne sont pas capables d'initier la polarisation des radeaux lipidiques (*Ebert et al. 2000*). Cependant, lors de la maturation de ces cellules en lymphocytes T $CD4^+$, il leur est possible d'induire cette polarisation lors de la stimulation du TCR et du CD28. Il est donc possible que les radeaux lipidiques interviennent lors des derniers stades de la maturation. La cellule a besoin de reconnaître le soi puis le non-soi, et ce contact doit être d'une intensité bien précise. On peut donc facilement imaginer que les radeaux lipidiques puissent jouer un rôle dans ce processus. Néanmoins, aucune étude n'a pu confirmer le rôle des radeaux lipidiques dans la maturation lymphocytaire. Une autre étude a pu démontrer qu'un modèle de cellules $CD8^+$ n'était pas capable d'induire la polarisation des radeaux lipidiques (*Kovacs et al. 2002*). Les lymphocytes T $CD8^+$ ne seraient donc pas capables d'initier la polarisation de leurs radeaux lipidiques bien que leur activation ait lieu alors que les cellules $CD4^+$ dépendent de cette polarisation pour être activées.

- Maturation lymphocytaire ?
- Localisation des récepteurs
- Présentation antigénique
- Signalisation / Activation
- Formation de la synapse immune
- Production de cytokines
- Expansion clonale
- Métabolisme du cholestérol
- Chimiotactisme
- Formation des pseudopodes
- Migration cellulaire
- Diapédèse
- Apoptose
- Entrée des virus
- Site de liaison des toxines

Tableau 2. Rôle des radeaux lipidiques dans les cellules immunitaires

Donc, les sous-types de lymphocytes T auraient des moyens différents d'initier leur activation. Il est donc évident que des différences existeraient dans la fonction des radeaux lipidiques dans les sous-populations lymphocytaires. Des études menées sur des cellules naïves et mémoires ont permis de mettre en évidence une régénération différentielle des radeaux lipidiques lors de l'activation (*Tuosto et al. 2001*). En effet, 48 heures après l'activation des cellules naïves et mémoires, le contenu membranaire en GM1 est fortement augmenté, ce qui laisse supposer la régénération des radeaux lipidiques. Cette étude a pu démontrer que la production de GM1 est significativement plus importante dans les cellules mémoires. Cela vient confirmer l'hypothèse selon laquelle les radeaux lipidiques auraient des fonctions différentes et seraient différemment régulés dans les sous-populations lymphocytaires, entre cellules auxiliaires ($CD4^+$), cytotoxiques ($CD8^+$), naïves ($CD45RA^+$) et mémoires ($CD45RO^+$). Malgré la qualité de ces informations, elles sont issues d'études menées à partir de lignées cancéreuses humaines ou de modèles murin mais pas de cellules primaires humaines.

Au début de ces chapitres, je mentionnais la controverse concernant l'existence des radeaux lipidiques en tant qu'entités fonctionnelles (*Munro et al., 2003*). Il est nécessaire de préciser que les radeaux lipidiques sont étudiés avec différents moyens. C'est de là que proviennent, je pense, les divergences concernant l'existence et les propriétés des radeaux lipidiques. Alors que les méthodes de séparation utilisant les détergents tels que le Triton-X100 permettent en effet de séparer différentes fractions de la membrane cellulaire, toutes les méthodes ne garantissent pas pour autant une pureté identique en fonction des protocoles utilisés. Les études par microscopies restent celles qui fournissent les informations les plus « directes ». C'est justement par cette méthode qu'une étude récente (*Douglass et al., 2005*) démontre, en utilisant la technique de microscopie du « TIRF » (total internal reflection fluorescence), que ce sont les interactions protéines-protéines

qui créent les microdomaines membranaire et qui déterminent quelles molécules sont incluses ou exclues de ces microdomaines. Tel décrit par Lin et al. (2005) dans cette même série du journal *Cell*, ces résultats remettent en cause les différents modèles proposés. « En effet, l'insolubilité dans les détergents utilisée pour discriminer les domaines de la membrane n'est pas responsable de l'assemblage du complexe de signalisation à la membrane. Cela n'invalide pas pour autant l'existence des radeaux lipidiques ou leur participation à la signalisation des lymphocytes T ». C'est donc au niveau conceptuel que réside le problème, qu'est-ce qu'un radeau lipidique ? Beaucoup d'études sont encore nécessaires pour donner une vision plus avancée sur le sujet. Se fiant à toutes ces études on peut malgré tout définir les radeaux lipidiques comme des entités très mobiles dans le plan de la membrane participant à la signalisation du TCR.

2.6 Radeaux lipidiques et caveolae

Ainsi, tel qu'énoncé précédemment, d'un type cellulaire à l'autre la composition de la membrane va différer. Ces différences peuvent simplement être liées au rôle différentiel de la membrane dans la fonction de la cellule. On peut illustrer cela en comparant un type de cellule dit « adhérent » telles que les cellules endothéliales à un type de cellule dit « circulant » telles que les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN).

Les cellules endothéliales qui tapissent les parois artérielles nécessitent une forte cohésion cellulaire et lors de la formation de nouveaux vaisseaux leur génération et migration doit être strictement respectées. Via les cellules de muscle lisse, les cellules endothéliales vont servir à contracter ou relâcher la paroi artérielle. Cela est un mécanisme de régulation de la pression sanguine et de la perfusion des organes. La vasodilatation est possible par la génération de monoxyde d'azote (NO) par les cellules endothéliales. Il a été démontré que l'enzyme responsable

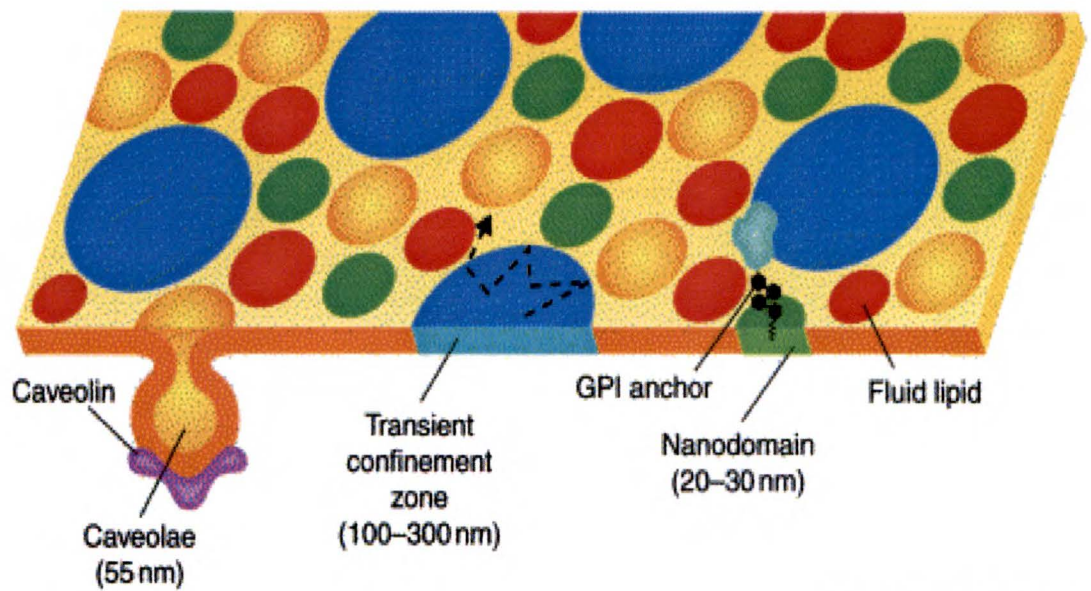
de la production de NO, la eNOS (endothelial nitric oxide synthase), est localisée au niveau des microdomaines séparables par ultracentrifugation (*Wickstrom et al. 2003*). L'induction du signal d'activation de la eNOS va induire sa dissociation du complexe membranaire et va permettre son activation (*Ostrom et al. 2004*). Lors de la séparation de ces microdomaines par ultracentrifugation des études on peut détecter la présence spécifique de cavéoline-1. La cavéoline-1 est considérée comme une molécule de soutien responsable de l'organisation spécifique de ces microdomaines appelés caveolae (*Krajewska et al. 2004*). En effet, contrairement aux radeaux lipidiques qui sont dans le plan de la membrane, les caveolae forment des invaginations dans la membrane (FIGURE 11).

Chez le neutrophile, les radeaux lipidiques sont notamment composés des enzymes responsables de leur effet lytique. Ainsi, la NADPH oxidase compose les radeaux lipidiques (*Shao et al. 2003*). On peut donc comprendre le rôle différentiel des microdomaines membranaires en fonction du type cellulaire. Ce rôle va donc dépendre des fonctions primaires de la cellule. On peut finalement relier la partie précédente avec ce qui vient d'être décrit en posant l'hypothèse que le rôle différentiel des radeaux lipidiques dans les lymphocytes soit dû aux fonctions qui sont différentes dans les sous-populations. L'essentiel des fonctions connues jusqu'à présent pour les radeaux lipidiques étant la signalisation, il convient de decrypter comment le lymphocyte T est activé.

3. La signalisation intracellulaire des lymphocytes T

3.1 Le récepteur des cellules T (TCR)

Le récepteur des lymphocytes T (TCR) est composé de plusieurs unités. La ligation du TCR entraîne la participation du complexe TCR/CD3 (*Call et al. 2004*). La partie TCR comprend 2 sous-unités, α et β qui possèdent une longue chaîne extracellulaire, qui va servir à la



Current Opinion in Cell Biology

Figure 11. Radeaux lipidiques et caveolae. (Maxfield, *Curr Opin Cell Biol*, 2002)

L'hétérogénéité des microdomaines membranaires est représentée schématiquement. De tailles différentes, de compositions différentes (couleur), les microdomaines sont très variés dans un même type cellulaire.

reconnaissance du complexe antigène-CMH. Certains lymphocytes expriment des récepteurs composés de sous-unités γ et δ (Reference + rajouter info sur γ δ). Leurs courtes chaînes intracellulaires ne leur permettent pas de participer à la transduction des signaux (FIGURE 12). C'est là que la partie CD3 entre en jeu. Le CD3 est en fait composé de plusieurs sous-unités ϵ (p20), ζ (p16), δ (gp20), γ (gp26) et η (p22). Lors de la ligation des chaînes α et β , les chaînes ζ vont être phosphorylées au niveau de motifs très spécifiques, ITAM (Immuno-Tyrosine based Activation Motifs) (Gergely *et al.* 1999). C'est cette phosphorylation des résidus tyrosine qui va permettre l'induction de la cascade de signalisation par phosphorylation (Janes *et al.* 1999). Dans le même temps, les chaînes ϵ vont suivre des mouvements de va-et-viens à travers la membrane, ce mouvement en « piston » (Gil *et al.* 2002) permet l'activation d'autres voies de signalisation. C'est par ce moyen notamment que la molécule Nck est activée. L'activation de la myriade de voies de signalisation entourant le complexe TCR/CD3 vont être complémentaires et permettront l'activation totale de la cellule T. Cette activation totale n'est cependant possible que si la molécule co-stimulatrice CD28 est elle aussi en contact avec son homologue à la surface de la CPA, le B7. Ce contact inter-cellulaire spécifique va modifier la composition et la structure de la membrane au site d'interaction.

La signalisation du TCR est bien documentée, cependant celle du CD28 est encore peu connue. Les données actuelles indiquent que c'est via l'activation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) et la molécule PKB/Akt que le CD28 induit ses effets chez le lymphocyte T. La signalisation via le TCR/CD3 et celle via le CD28 vont être complémentaires et indispensables connaissant l'importance du CD28 dans l'induction de la polarisation des radeaux lipidiques et dans la production d'IL-2 (FIGURE 8).

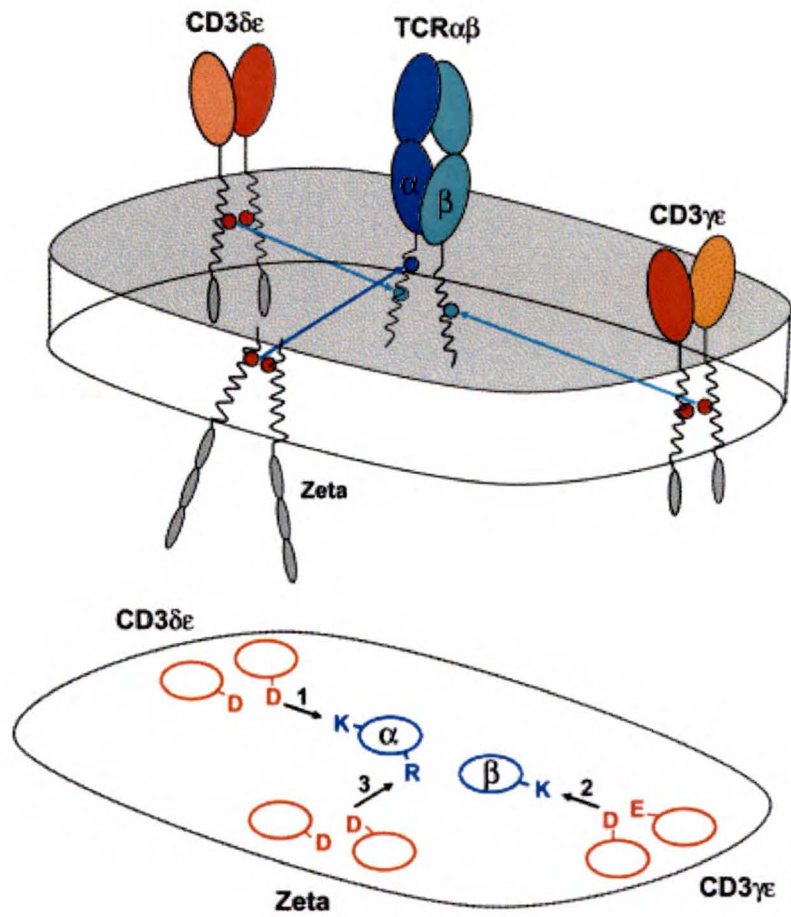


Figure 12. Récepteur des cellules T / CD3. (Call et *al.*, 2004)

Représentation schématique de l'organisation du récepteur des cellules T α/β (bleu) ainsi que le complexe CD3 (orange).

3.2 La signalisation dans le temps

Le type, l'intensité et la durée de la réponse immunitaire dépendent des signaux qui sont donnés aux lymphocytes T (*Gonzalez et al. 2005*). La ligation du TCR (FIGURE 8) induit un certain niveau d'activation du lymphocyte (signal 1) mais ne suffit pas à initier sa prolifération (*Nel et al. 2002*). C'est par la ligation de corécepteurs tel que le CD28 (signal 2) que l'activation des voies de signalisation sera complète et permettra la réponse immune (*Acuto et al. 2003*). On peut diviser ces voies de signalisation par leur intervention dans le temps. Les premiers éléments de l'activation lymphocytaire à prendre naissance sont l'augmentation du calcium intracellulaire libre (*Gardner, 1989*), la phosphorylation des sous unités du complexe TCR/CD3 (*Osman et al. 1995*), des protéines tyrosine kinases (PTK, ex : Lck) (*Danielian et al. 1989; Siegel et al. 1991*) et de molécules adaptatrices (ex : LAT) (*Zhang et al. 1998*).

Lck est sous une conformation tridimensionnelle inactive et lors d'une activation, une phosphatase, le CD45, va déphosphoryler le résidu tyrosine pTyr-505 (*Alexander et al. 2000*) et induire le changement de conformation de Lck sous une forme active. Cette activation de Lck induit la phosphorylation des domaines d'activation des sous-unités ζ du CD3 (Immuno Tyrosine based Activation Motif) ainsi que le recrutement de la PTK de la famille des Syk, ZAP-70 (FIGURE 13). Cette activation par phosphorylation est une cascade rapide et permet la mise en marche d'autres événements tels que l'augmentation du calcium intracellulaire, l'activation de kinases et le remaniement du cytosquelette (*Janes et al. 1999*). Ces événements sont dépendants de l'activité de ZAP-70 sur la molécule adaptatrice LAT (Linker of Activated T cells). LAT ne possède pas d'activité en tant que telle mais elle est associée à plusieurs second messagers et molécules de signalisation (*Zhang et al. 2000*). Parmi ces derniers on retrouve la phospholipase C gamma 1 (PLC γ -1) qui va produire l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG)

L'augmentation du calcium intracellulaire est rendue possible par le IP3 qui va se lier à son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique (IP3-R) et permettre sa libération des réserves. Cette étape très importante va initier la migration du facteur de transcription NF-AT grâce au complexe calcineurine/calmoduline (FIGURE 13). De son côté, le DAG va induire l'activation des protéines kinases C (*Isakov et al. 2002, Altman et al. 2003*). Ces événements sont considérés comme étant la partie précoce de la signalisation du TCR.

La partie intermédiaire implique l'activation des MAPKinases et le remaniement du cytosquelette. PKC participe à l'activation des MAPKKKinases. C'est par ce mécanisme que le facteur de transcription NF- κ B va transloquer au noyau. Cette translocation est rendue possible par la phosphorylation de I- κ B par le IKK. C'est Grb2, associé à LAT qui permet l'activation des différentes MAPKinases (*Salojin et al. 1999*). On distingue la voie ras-raf1-MEK-ERK1/2 et la voie ras-MEKK1-MKK-p38/JNK. Ces MAPKinases vont induire les promoteurs c-jun/c-fos au niveau du noyau (*Janes et al. 1999*) et détermineront la réponse. La voie des MAPK est impliquée dans le survie des lymphocytes T.

Le remaniement du cytosquelette permet d'atteindre l'état d'activation optimal des lymphocytes T. C'est Gads, lui aussi associé à LAT qui va permettre la phosphorylation en tyrosine de SLP-76 (FIGURE 13). Cette phosphorylation recrute Vav et Nck pour initier ce remaniement cytosquelettique. La protéine WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein) va jouer un grand rôle dans la redistribution des filaments d'actine. La signalisation intracellulaire va de paire avec le remaniement du cytosquelette.

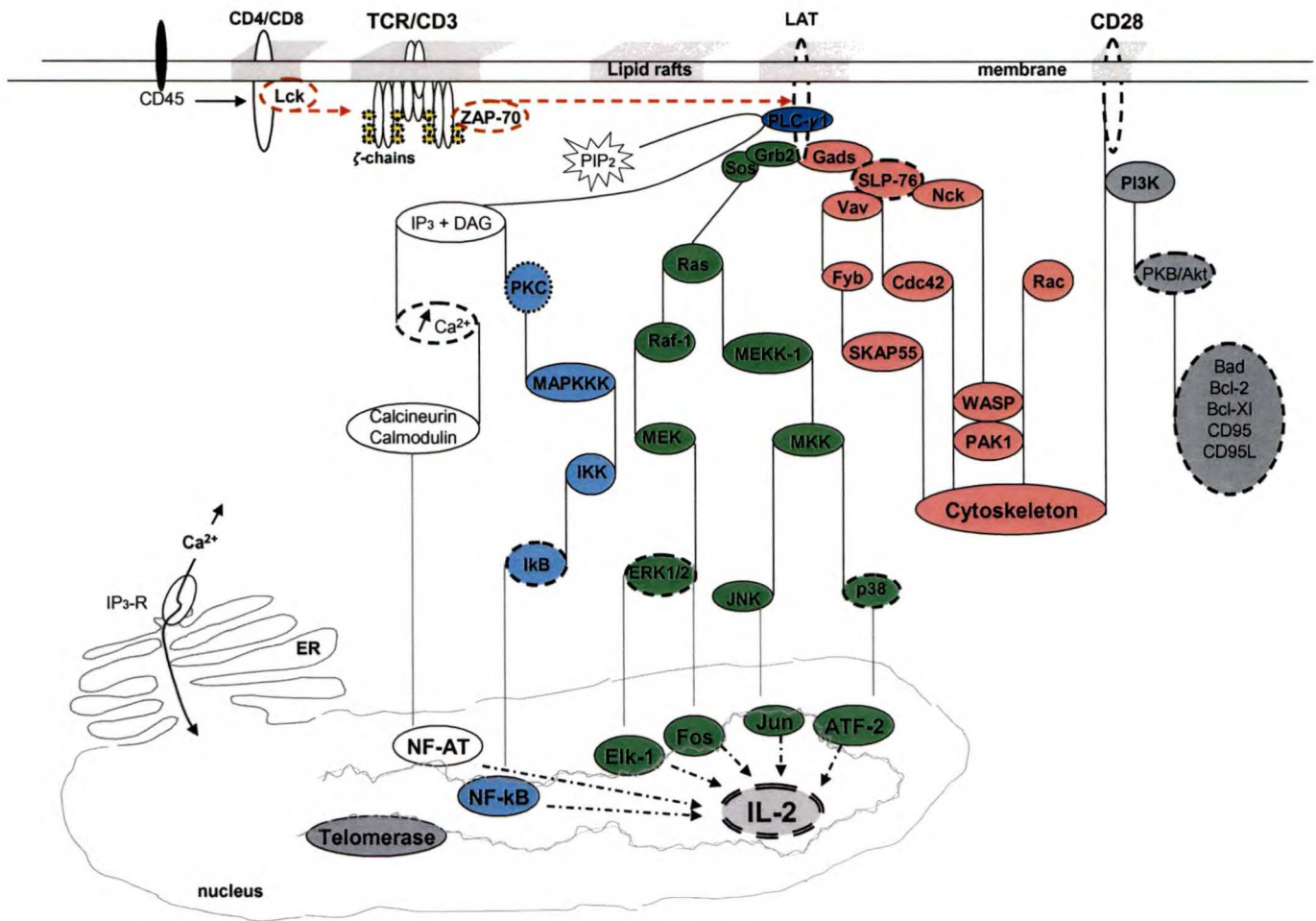


Figure 13. Signalisation du TCR/CD28 (Fulop et al. *Drugs Aging*, 2005)

Représentation schématique de la signalisation du TCR et du co-récepteur CD28. À partir des radeaux lipidiques, le TCR va transmettre une myriade de signaux via les molécules telles que Lck, LAT, ZAP-70, PI3K. Les différentes voies de signalisation représentées vont aboutir à la translocation des facteurs de transcriptions (NF-AT, NF-κB) au noyau. Tous ces éléments d'activation lymphocytaire conduisent à la production de l'interleukine-2, cytokine jouant un rôle déterminant dans l'expansion clonale et la réponse immune globale.

Toutes ces étapes dépendantes des radeaux lipidiques (*Kane et al. 2002*) vont permettre l'activation de la cellule et l'expansion clonale par production d'IL-2. En amont du site d'initiation de la transcription du gène de l'IL-2, on trouve une région de contrôle de la transcription très complexe constituée de courtes séquences sur lesquelles peuvent se fixer spécifiquement ces facteurs de transcription. La fixation augmente (ou diminue) la quantité d'ARN-messager synthétisée, ce qui ajuste le taux de transcription en fonction des besoins de la cellule. En amont du gène codant l'IL-2, on trouve, dans la région de contrôle, six séquences régulatrices sur lesquelles divers facteurs de transcription peuvent se fixer dont NF-AT, NF-kB, AP-1.

Notre connaissance de la signalisation découlant de la stimulation du CD28 est encore incomplète. Il a été démontré que c'est la protéine kinase B (PKB) qui va être phosphorylée par la PI3Kinase. L'activation de la PI3Kinase va influencer le ratio entre molécules pro- (Bcl-x1) et anti-apoptotiques et jouer ainsi un rôle anti-apoptotique (*Okkenhaug et al, 2004*). La stimulation du CD28 augmente l'expression des cyclines, l'activation des « cyclin-dépendant kinases » (*Appleman et al., 2000*) et la translocation du facteur de transcription NF-kB qui agit sur l'expression de Bcl-x1 (*Khoshnan et al., 2000*). Les molécules de signalisation Lck et Fyn s'associent au CD28 et y sont phosphorylées lors de la stimulation du CD28 (*Hutchcroft et al., 1994*). La stimulation joue aussi un rôle dans le remaniement du cytosquelette (*Sedwick et al., 1999*). Le Tableau 3 résume toutes les voies de signalisation activées à la suite de la stimulation du CD28 (*Ward, 1996*).

Table 1 Biochemical signals elicited by anti-CD28 mAbs, B7.1 and B7.2 in T cells

ND, not determined; +, activated; —, no detectable effect; * denotes that cross-linking is required.

Response	mAb	B7.1	B7.2	Remarks
1. Early signals				
Tyrosine phosphorylation	+	+	+	Phosphorylation of unidentified substrates in activated T cells and cell lines
PLC γ phosphorylation	+	+	ND	Activated T cells, Jurkat and murine hybridomas
[Ca ²⁺] _i elevation	+*	+	—	Cross-linking is a prerequisite in resting T cells, activated T cells and murine hybridomas but not necessarily Jurkat
Ins(1,4,5)P ₃ elevation	+*	ND	ND	Jurkat or activated T cells; B7.1 elicits no detectable PtdIns(4,5)P ₂ degradation
PI 3-kinase association	+	+	+	CD28 associates with the p85 α subunit
PI 3-kinase activation	+	+	+	Occurs in resting T cells, activated T cells, Jurkat and murine hybridomas
Association with Grb-2	+*	ND	ND	Resting T cells, Jurkat and HPB-ALL
p21 ^{ras} activation	+	—	—	Jurkat
Sphingomyelinase activation	+*	+	+	Acidic isoform activated in resting T cells, activated T cells and Jurkat
5-Lipoxygenase	+	ND	ND	Resting T cells
2. Intermediate events				
Vav	+	+	+	Tyrosine phosphorylated in Jurkat
p36	+	—	ND	Tyrosine phosphorylated in Jurkat
p62 (p120 ^{GAP} -associated)	+	+	+	Tyrosine phosphorylated in Jurkat
<i>c-cbl</i>	+	+	+	Tyrosine phosphorylated in Jurkat
Raf-1 activation	+	—	ND	Jurkat
ERK activation	+	—	—	Jurkat
JNK activation	+	+	+	Synergizes with anti-CD3 mAb in Jurkat cells; cyclosporin A-sensitive Synergizes with PMA/ionomycin; inactive alone
p70 ^{S6k} activation	+*	ND	ND	Resting T cells; rapamycin-sensitive and cyclosporin A-insensitive
3. Nuclear events				
I κ B α down-regulation	+	ND	ND	Jurkat and resting T cells; requires PMA; rapamycin-sensitive and cyclosporin A-insensitive
AP-1 regulation	+	+	+	Requires TCR signal in murine T cells; down-regulated during anergy
4. Co-stimulation (e.g. IL-2 secretion)				
	+	+	+	Resting T cells and Jurkat

† Also D. Sansom, personal communication.

Tableau 3. Les voies de signalisation induite par la stimulation du CD28 (Ward, 1996)

3.3 La signalisation dans l'espace

La signalisation était décrite jusqu'à la fin des années 90 comme elle était représentée dans les schémas, c'est à dire de façon plane. Ceci, simplement parce qu'on la représentait de façon chronologique. Cependant, avec la découverte des radeaux lipidiques ce modèle s'en trouve complètement changé voir même obsolète. En effet, la notion d'espace doit entrer dans la visualisation du phénomène d'activation lymphocytaire étant donné le mouvement latéral des molécules de signalisation à travers la membrane via les radeaux lipidiques (*Viola et al. 1999*). À ce jour, deux molécules de signalisation sont considérées comme essentielles à la signalisation du TCR via les radeaux lipidiques, la protéine tyrosine kinase Lck et la molécule adaptatrice LAT (FIGURE 14). Lck est au départ des phosphorylations et des interactions entre les molécules de signalisation des radeaux lipidiques. LAT est au centre d'une myriade de voies de signalisation. Ces deux molécules vont être des acteurs majeurs du signalosome. La polarisation des radeaux lipidiques chez les lymphocytes T CD4⁺ est possible lors de la costimulation du TCR et du CD28. Parallèlement, la production d'IL-2 est dépendante de la stimulation de la molécule de CD28 (*Acuto et al. 2003*). Cela suggère que le CD28 joue un rôle essentiel dans l'activation des cellules CD4⁺ et dans leur expansion clonale. Les radeaux lipidiques vont être des structures essentielles à la réponse impliquant les lymphocytes T CD4⁺ par la formation de la plateforme de signalisation. Ce signalosome (*Werlen et al. 2002*) se forgera en synapse immune en fonction du temps. Le temps est un paramètre essentiel dans le cas de la signalisation et l'activation lymphocytaire, néanmoins il est nécessaire d'intégrer aussi la notion d'espace (FIGURE 14) afin d'avoir une vue d'ensemble du mode d'activation des lymphocytes T.

3.4 Cholestérol et radeaux lipidiques

Nous avons précédemment vu que le cholestérol avait une place importante pour le maintien de la structure des radeaux lipidiques ainsi que son rôle dans le cycle des radeaux lipidiques. Le cholestérol cellulaire est synthétisé à l'aide de la hydroxy-méthyl-glutaraldéhyde-coenzyme-A réductase (HMG-coA réductase) (*Di Padova et al, 1982*), puis transporté via l'appareil de Golgi vers la membrane (FIGURE 15). Le cholestérol peut aussi provenir du milieu environnant, cet influx peut se faire de manière passive à travers la membrane mais fait aussi intervenir le récepteur SRB1 (*Williams et al. 2002*). Les radeaux lipidiques sont aussi préformés au niveau de l'appareil de Golgi (*Pang et al. 2004*), le transport du cholestérol suit le même chemin que celui des radeaux lipidiques. Lorsque le cholestérol est en excès la cellule l'estérifie par l'action de la ACAT (acyl cholesterol-acyl-transferease) et l'emmagasine dans des vésicules cytosoliques (*Buhman et al. 2000*). Une voie d'efflux du cholestérol fait intervenir les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui vont se lier à la membrane et notamment aux radeaux lipidiques pour extraire le cholestérol de la membrane via l'apolipoprotéine-A1 (Apo-A1) associée aux HDL (*Segrest et al. 2000*). Cette voie implique des transporteurs membranaires tel que le ABCA1 (ATP-Binding-Cassette-A1) (*Oram et al. 2000*). Ce cholestérol est ensuite transporté jusqu'au foie où il sera pris en charge.

Comme les radeaux lipidiques sont dépendants de l'organisation de la membrane pour leur mobilité et étant donné leur rôle primordial dans la signalisation du TCR, il devient évident que des changements dans leurs propriétés physico-chimiques vont influencer le bon fonctionnement de la machinerie d'activation lymphocytaire. La composition ainsi que l'état de saturation et d'oxydation des lipides des radeaux lipidiques vont donc jouer un grand rôle dans la transmission d'un signal à travers la membrane.

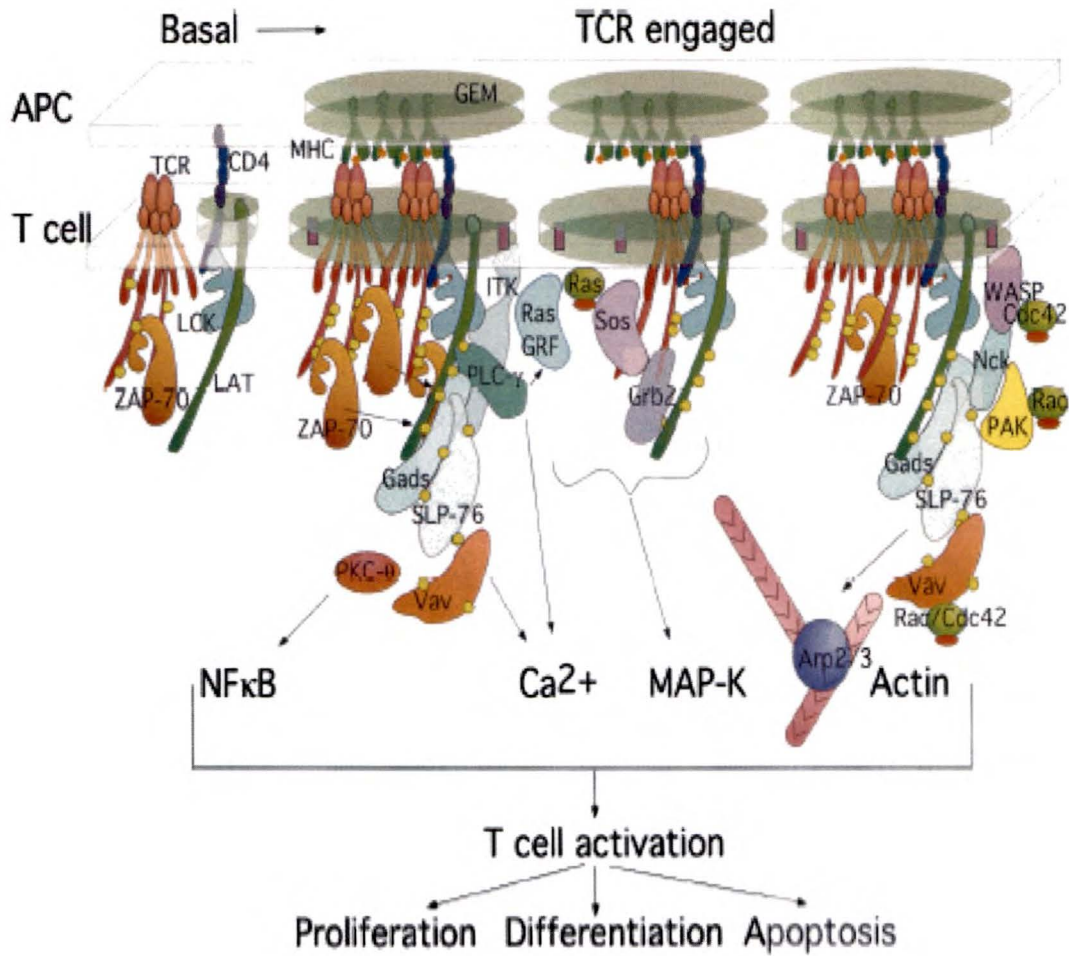


Figure 14. Signalisation dans l'espace. (Dustin et al. *Cell*, 2000)

Représentation schématique de la signalisation dans l'espace. La stimulation du TCR par le complexe CMH-peptide antigénique va induire une réorganisation dans l'espace de toute la machinerie de signalisation. On voit ici l'importance du rôle des radeaux lipidiques dans l'activation lymphocytaire.

GEM : radeaux lipidiques

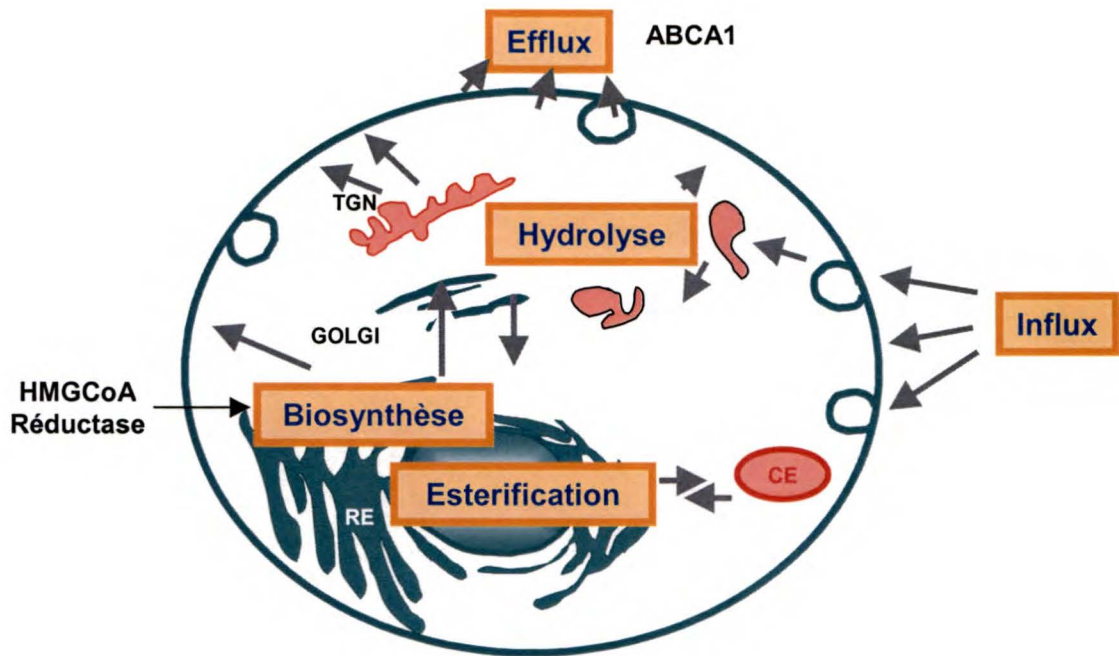


Figure 15. Métabolisme du cholestérol cellulaire

Représentation schématique des différentes voies du transport cellulaire du cholestérol.

RE : réticulum endoplasmique

TGN : trans-golgi network

ABCA1 : ATP-Binding Cassette-A1

CE : ester de cholestérol

Outre les événements rapides de l'activation lymphocytaire via les radeaux lipidiques (coalescence, recrutement de molécules de signal), ces derniers vont initier les changements nécessaires à la réponse, notamment le remaniement du cytosquelette et l'établissement de la synapse immune. Le rôle des radeaux lipidiques dans l'activation lymphocytaire est énorme et toute entrave au bon fonctionnement de cette machinerie peut entraîner des changements dans la réponse qui en découle.

Des techniques de pointes permettent maintenant de synthétiser des membranes artificielles. Des groupes de recherche ont relevé le défi de créer des radeaux lipidiques synthétiques (*Dietrich et al. 2001; Li et al. 2003*). Malgré tous les efforts déployés par ces groupes, il n'a pas été encore possible de créer ces structures telles qu'elles se retrouvent *in vivo*. La synthèse de domaines d'une composition lipidique donnée est somme toute possible, mais c'est lors de l'insertion de composante de la signalisation que ces complexes synthétiques ne se maintiennent plus en place. Cependant, des travaux réalisés par *Crane et al.* ont permis de mettre en évidence des domaines artificiels d'une nature complètement différente en fonction de la quantité de cholestérol apportée au complexe (FIGURE 16). En effet, la modulation de la quantité de cholestérol laisse entrevoir une modulation des radeaux lipidiques (*Mouritsen et al. 2004*). Cette modulation se traduit par une structure différente, l'agencement de la bicouche lipidique tend vers un profil plus ou moins fluide et qui facilite plus ou moins l'association d'autres molécules. C'est à ce jour l'étude qui a pu le mieux démontrer le rôle et la place du cholestérol des radeaux lipidiques dans la bicouche lipidique (*Crane et al. 2004*).

A cet effet, afin de démontrer l'association des molécules de signalisation aux radeaux lipidiques, beaucoup de groupes de recherche utilisent les agents de la famille des cyclodextrines (*Bibby et al. 2000*). Les cyclodextrines sont utilisés en médecine car ils facilitent la libération de médicaments à

travers les membranes. Ces cyclodextrines ont aussi été découvertes pour leur capacité à extraire le cholestérol de la membrane (*Ilangumaran et al. 1998*) et en fait elles sont actuellement utilisées pour perturber la structure des radeaux lipidiques. En effet, l'exposition des cellules à la méthyl- β -cyclodextrine (MBCD) entraîne une dissociation des molécules des radeaux lipidiques, et perturbe ainsi la signalisation intracellulaire (*Dreja et al. 2002*).

D'autres moyens sont aussi disponibles et utilisés afin de perturber la signalisation via les radeaux lipidiques. Parmi ces moyens, beaucoup ont la même cible, le cholestérol. Ainsi la filipine est utilisée pour séquestrer le cholestérol de la membrane cellulaire. D'autres agents vont cibler les composantes de la régulation du métabolisme du cholestérol. Les statines ont un rôle de prévention des maladies cardiovasculaires en diminuant le taux de cholestérol plasmatique via l'inhibition de la synthèse du cholestérol cellulaire. Ainsi, les statines sont utilisées *in vitro* pour inhiber la HMG-CoA réductase et en contrôlant la quantité de cholestérol dans le milieu extracellulaire la cellule va être perturbée (*Barenholz, 2004*).

3.5 Modulation des radeaux lipidiques et cas pathologiques

Plusieurs méthodes sont utilisées pour moduler la structure des radeaux lipidiques, principalement en attaquant leur structure en ciblant le cholestérol. Le nombre important d'études sur le cholestérol et les radeaux lipidiques est dû au fait que nos connaissances sur les radeaux lipidiques sont encore faibles par rapport à la complexité de ce nouveau domaine de recherche; notamment dans sa relation à l'immunologie. Néanmoins, des études récentes ont permis d'observer la modulation des radeaux lipidiques en utilisant des lipides. L'état de saturation des lipides qui composent les radeaux lipidiques va avoir une très forte influence sur leur fonction et sur la stabilité de l'association des molécules de signalisation. En effet, *Stulnig et al. (2000)* ont

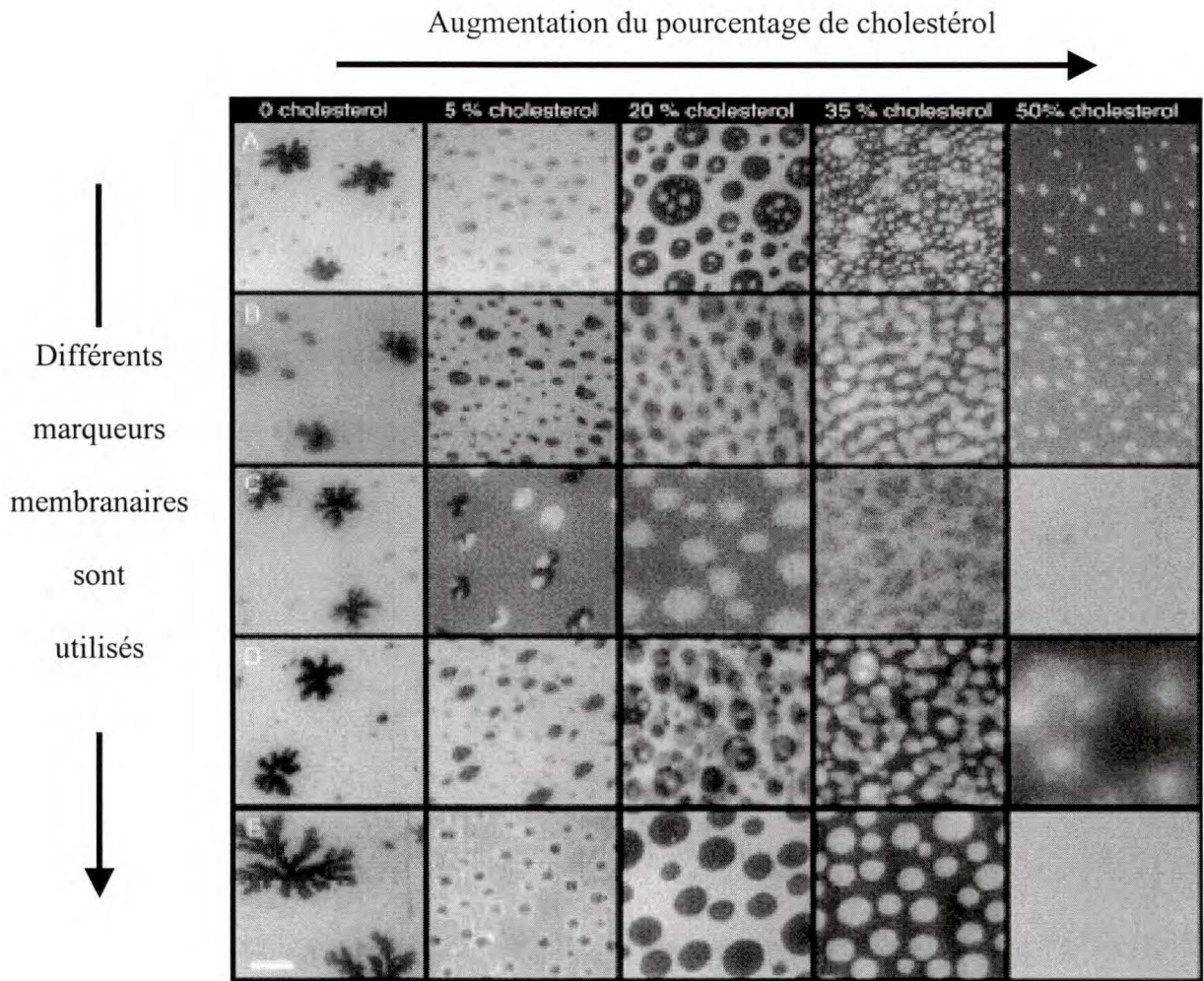


Figure 16. Hétérogénéité des radeaux lipidiques et cholestérol (*Crane et al. Biophys. J, 2004*)

La modulation du contenu en cholestérol va engendrer des structures synthétiques très différentes. En marquant les structures synthétiques avec différents marqueurs lipidiques on peut se rendre compte qu'elles ont des propriétés très différentes (fluidité, empacquetement) en fonction de la quantité de cholestérol qui compose ces structures.

montré que l'incubation de cellules de la lignée lymphocytaire Jurkat E6.1 avec des acides gras poly-insaturés inhibe le libération du calcium lors de la stimulation subséquente du TCR. Ces premières expériences ont été validées *Switzer et al. (2004)* et *Calder (2002)*.

Ces études menées chez la souris ont permis de démontrer que mise à part l'incubation *in vitro* des cellules, l'incorporation de ces acides gras dans l'alimentation de ces souris mène à des modifications importantes du système immunitaire, notamment des lymphocytes T. Ces modifications se traduisent essentiellement par la perte de fonctions telle que la capacité à produire des cytokines lors de l'activation. Ces études laissent supposer que la modulation dans la composition des radeaux lipidiques puisse être en partie responsable des effets suppresseurs de la réponse lymphocytaire.

D'une manière générale, toute modulation de l'organisation membranaire va aboutir à la modification de l'activation lymphocytaire par la modulation des radeaux lipidiques. La déstabilisation de ces structures essentielles peut engendrer une signalisation défectueuse ou incomplète, ce qui peut expliquer les défauts de fonctions.

Il existe des cas pathologiques où l'activation lymphocytaire est anormalement excessive. C'est le cas de l'arthrite rhumatoïde (RA) et du lupus érythémateux disséminé (systemic lupus erythematosus). En effet, dans le cas du SLE, *Jury et al. (2004)* ont montré une corrélation entre l'hyperactivation lymphocytaire et les phénomènes auto-immuns et les modifications au niveau des radeaux lipidiques. Cette étude a permis de mettre en évidence, pour la première fois, les conséquences de la chronicité de la pathologie sur la composition et les fonctions des radeaux lipidiques. En effet, les molécules de signalisation sont quantitativement plus associées aux radeaux lipidiques des lymphocytes T CD3⁺ de ces patients, parallèlement, le contenu en GM1 est augmenté de manière significative. En fait, les lymphocytes T CD3⁺ des patients souffrant de SLE

sont dans un état pré-activé. Cela va mener à la production de cytokines pro-inflammatoires dans l'environnement de ces cellules et va expliquer la chronicité de la maladie. Cependant, rien n'explique encore comment ces radeaux lipidiques se trouvent modifiés.

Plusieurs études sont maintenant en cours afin de déterminer le rôle des radeaux lipidiques dans d'autres pathologies (TABLEAU 4). Par exemple, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il est connu que les sécrétases, qui sont responsables du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde bêta (APP) sont localisées en partie dans les radeaux lipidiques (*Ehehalt et al. 2003*), et qu'avec le vieillissement cette localisation est augmentée (*Wood et al. 2002*). Cela va engendrer une affinité et un contact plus important entre ces sécrétases et l'APP, ce qui résulte en la formation des plaques d'amyloïde β ou plaques séniles caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Désormais, il devient évident que tous les processus cellulaires impliquant la membrane vont être influencés par la modulation des radeaux lipidiques. Cela laisse entrevoir de nouvelles avenues quant au rôle des radeaux lipidiques dans les déficiences immunitaires qu'elles soient d'ordre pathologique ou physiologique comme on peut le voir lors du vieillissement.

Table 1

Diseases for which rafts and raft proteins are targets

Alzheimer disease
Parkinson disease
Muscular dystrophy
Polyneuropathies, demyelinating diseases
Autoimmune disease, chronic inflammation, vaccine response
B cell response
T cell response
Asthma and allergic response
Neoplasia
Atherosclerosis
Hypertension, hemodynamic regulation
Diabetes
Hyperparathyroidism
Osteoarthritis
Gastrointestinal ulceration
Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria
Lysosomal storage disease
Niemann-Pick disease
Tay-Sachs disease, morbus Fabry, metachromatic leukodystrophy
Pilzaeus-Merzbacher disease
Postsqualene cholesterol biosynthesis disorders
Pore-forming toxins (gas gangrene)
Sepsis, septic shock
Bacterial infections
<i>Escherichia coli</i>
<i>Mycobacteria tuberculosis</i> and <i>bovis</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Clostridium difficile</i> (pseudomembranous colitis)
<i>Clostridium tetani</i>
<i>Salmonella, Shigella</i>
Viral infections
Influenza virus
HIV-1
Measles virus
Respiratory syncytial cell virus
Filoviridae (Ebola virus, Marburg virus)
Papillomaviridae and polyomaviridae
Epstein-Barr virus
Echovirus 1
Other pathogens
<i>Plasmodium</i> (malaria)
<i>Trypanosoma</i> (sleeping sickness)
<i>Leishmania</i>
Prions (Creutzfeldt-Jakob disease, Kuru, Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome)
<i>Toxoplasma gondii</i>

See supplemental reading list (www.jci.org/cgi/content/full/110/5/S97/DC1) for detailed references.

Tableau 4. Maladies où les radeaux lipidiques sont ciblés (Simons et al., *J. Clin. Invest.* 2002)

4 Vieillesse

4.1 Problème du vieillissement de la population

Le vieillissement est un processus naturel du cycle de la vie. Le nombre de personnes âgées (> 65 ans) est de plus en plus important dans nos sociétés. Le vieillissement n'est pas une maladie, cependant plusieurs maladies y sont associées ou en découlent (*Kaplan et al. 1999*) et à vrai dire, nos connaissances sur le système immunitaire de la personne âgée sont très limitées. Il devient alors primordial d'accroître ces connaissances afin de pouvoir mieux répondre, dans un avenir proche, aux spécificités et attentes des personnes âgées. Le but de ces recherches ne doit pas être d'augmenter encore la durée de vie, mais de faire en sorte que les dernières décennies de vie se passent dans les meilleures conditions, c'est le « vieillissement réussi ». Un paramètre important est le coût des services de santé fournis aux personnes âgées. En effet, le vieillissement de la population ne va pas de pair avec l'augmentation des jeunes travailleurs, ce qui crée des crises économiques importantes dans les pays occidentaux. L'avancement de la médecine, la meilleure hygiène de vie ainsi qu'une meilleure information de la population ont permis d'augmenter de manière significative l'espérance de vie. Ce changement démographique nécessite aussi une augmentation de la natalité pour faire face au nombre grandissant de personnes âgées et retraitées. Le ratio population retraité : population active augmente donc et crée des problèmes financiers majeurs. Il est clair que subvenir aux besoins d'une personne âgée non autonome, souffrant de diabète et de démence, comme cela arrive souvent, est difficile et coûteux. La bio-gérontologie est une spécialité qui permettra de couvrir un large spectre des problèmes liés au vieillissement physiologique. L'intérêt d'étudier le système immunitaire des personnes âgées ainsi que son adaptation à l'environnement est grand et nécessaire. Le but final n'étant plus de rallonger la durée de vie mais bien de permettre à ces personnes âgées de vivre en santé le plus longtemps possible.

4.2 Définition

Le vieillissement humain peut être défini de plusieurs manières. Le vieillissement se caractérise par des modifications physiques mais aussi par des changements moins faciles à détecter quelquefois. Parmi ces changements, on dénombre des modifications dans les fonctions endocriniennes (*Heaton, 2001*), dans le métabolisme du glucose (résistance à l'insuline), dans les fonctions du cerveau (maladie d'Alzheimer, Parkinson), dans la régulation des muscles (sarcopénie) (*Evans, 1995*), dans le maintien des structures osseuses (ostéoporose), dans le système cardio-vasculaire (athérosclérose) et dans le contrôle du stress oxydatif. D'un point de vue immunologique, le vieillissement est associé à une diminution des fonctions immunitaires menant à une plus grande susceptibilité aux infections, cancers, maladies auto-immunes (TABLEAU 5).

Le vieillissement des cellules est appelé sénescence. Il y a deux théories en vogue qui peuvent expliquer ce phénomène. C'est *Leonard Hayflick* (1968) qui a établi la théorie qui porte son nom sur la sénescence cellulaire. Cette théorie veut qu'une cellule se divise jusqu'à une certaine limite (*Hayflick, 1968*). La cellule atteint alors un état de « crise », c'est la limite de Hayflick à partir de laquelle la cellule va devenir sénéscente, c'est à dire qu'elle ne va plus être capable de répondre à une stimulation ou alors elle va se transformer en cellule cancéreuse par mutation du matériel génétique. Ces mutations sont souvent dues à des défaut de mécanisme de réparation et notamment par la perte de la taille des télomères responsables de la protection du matériel génétique. L'augmentation des radicaux libres (*Harman, 1992*) par rapport aux protections anti-oxydantes est responsable de ces mutations.

- Arthrose
- Athérosclérose
- Maladie d'Alzheimer
- Maladie de Parkinson
- Cancers
- Maladies auto-immunes
- Infections récurrentes
- Diabète
- Ostéoporose

Tableau 5. Maladies associées au vieillissement

(Fülöp et al. Drugs Aging, 2005)

Ces radicaux vont donc cibler premièrement la membrane puis les protéines cytosoliques et enfin le noyau. C'est la théorie des radicaux libres proposée par Denham Harman (1956). L'application du phénomène de sénescence aux cellules immunitaires est appelé immunosénescence (Leech, 1980).

4.3 L'immunosénescence

L'immunosénescence est un phénomène mal connu. D'une part, parce que les travaux sur la sénescence traitent de cellules de type fibroblastique ou endothélial. En effet, par culture continue *in vitro* on peut amener ces types cellulaires vers un phénotype sénescents. Ce phénotype inclut la rigidité membranaire (Bartosz *et al.* 1981) et une dégénérescence globalisée très bien connue. D'autre part, parce que l'étude de cellules immunitaires périphériques est rare dans le cadre du vieillissement humain. Il faut bien différencier la sénescence *in vitro* et l'immunosénescence *in vivo*. Les causes de la première sont connues tandis que les causes de l'immunosénescence sont mal connues.

L'immunosénescence touche tous les aspects de la réponse immunitaire. Pendant longtemps, la question du degré d'altération de la réponse immune innée a été débattu (Solana *et al.*, 1999; Plackett *et al.* 2004). On peut malgré tout voir des changements dans la réponse des neutrophiles (Fulop *et al.*, 2004), des monocytes/macrophages (Plowden *et al.*, 2004; Lloberas *et al.*, 2002), des cellules NK (Plackett *et al.* 2004; Mocchegiani *et al.*, 2004). En ce qui concerne la réponse adaptative, les recherches sont beaucoup plus avancées. Des changements significatifs sont démontrés chez les cellules B avec le vieillissement (Allman *et al.*, 2005; Cancro, 2005). Les cellules B mûrissent au niveau de la moëlle osseuse alors que les cellules T mûrissent au niveau du thymus. Or, lors du vieillissement on observe l'involution du thymus. Dès lors, les études ont pu

confirmer que les cellules T ont leurs fonctions principales altérées (TABLEAU 6). De plus, les cellules T jouent un rôle d'intégrateur de toute la réponse immune, c'est pour ces raisons que les cellules T sont d'un intérêt primordial pour l'étude de l'immunosénescence.

Ainsi, les lymphocytes T subissent des modifications qui ne leur permettent pas de répondre de manière adéquate, contrôlée et soutenue avec le vieillissement (*Makinodan, 1980*). L'involution du thymus (*Piantanelli et al., 1990*) se traduit par une diminution de la capacité thymique à produire des lymphocytes T. Même si aucun changement dans le nombre total de lymphocytes circulant n'est démontré dans la littérature, il est très possible que le répertoire de lymphocyte soit restreint à cause de ce phénomène. Il est aussi possible que le manque de lymphocytes T nouvellement produit soit comblé par le maintien de cellules T anergiques en circulation. C'est de là que vient le nom d'immunosénescence, les lymphocytes anergiques sont en sénescence, ils ne répondent pas à la stimulation, ni aux signaux de mort ce qui restreint fortement le répertoire de lymphocytes circulant. Cela pourrait expliquer l'augmentation de l'incidence des infections et d'autres pathologies au cours du vieillissement.

L'immunosénescence est un phénomène normal puisqu'il intervient lors du vieillissement normal. Cependant, il est important de comprendre comment le système immunitaire s'adapte au vieillissement. Certaines fonctions vont être ainsi diminuées telles que les fonctions lymphocytaires alors que le nombre de cellules NK va augmenter (*Mocchegiani et al., 2004*). Y-a-t-il une adaptation du système immunitaire à l'augmentation du nombre de NK ? Cela se traduirait-il en partie par l'involution du thymus. Ou au contraire y-a-t-il une adaptation dans le nombre et l'activité des cellules NK à la vue de l'involution du thymus ? Ces questions restent encore en suspens, mais permettront de comprendre pourquoi l'immunosénescence existe.

Les nombreuses divisions lymphocytaires qui ont lieu lors des différentes étapes de la réponse immune vont avoir un impact sur les fonctions de ces cellules. En effet, lors d'une division cellulaire, le lymphocyte perd de son matériel télomérique (*Franceschi et al. 1999*). Les télomères sont des répétitions ordonnées au bout des chromosomes. Ces télomères vont servir à protéger le matériel génétique de toute dégénération. Lors de chaque division, la taille des télomères est diminuée. Arrive alors une limite où la taille des télomères ainsi que l'enzyme responsable de ce maintien génétique, la télomérase n'arrivent plus à garantir l'intégrité de l'ADN. En fait, il est connu que lors du phénomène de sénescence *in vitro*, les divisions cellulaires s'arrêtent lorsque les cellules épuisent les télomères. En ce qui concerne le vieillissement humain, des études *in vivo* ont montré une diminution de la taille des télomères chez les lymphocytes T (*Lord et al., 2002*). Il est aussi apparu que les cellules avec les télomères les plus courts sont ceux dit en « sénescence réplivative ».

- Calcium libre intracellulaire
- Production de IP3
- Translocation de PKC
- Expression de CD69
- Expression de CD71
- Expression de CD28
- Fluidité membranaire
- Translocation de NF-AT
- Activité du protéasome
- Défaut de signalisation
- Nombre de cellules naïves
- Nombre de cellules mémoires
- Prolifération
- Production d'IL-2
- Taille des télomères
- Expression du récepteur d'IL-2

Tableau 6. Altérations chez les lymphocytes T avec le vieillissement

(Fülöp et al. Drugs Aging, 2005)

Cette population ne réponds pas à la stimulation, de quelque nature que ce soit et ne rentre pas dans le lot de cellules qui vont être éliminé par apoptose (*Franceschi et al. 2000*). Ce défaut d'apoptose va conduire à l'accumulation d'une population inactive, ce qui interfère avec le phénomène d'homéostasie puisque ces cellules étant anergiques, elles ne vont pas être régénérées. Ceci laisse donc la place à l'antigène pour lequel la cellule T en « sénescence réplivative » est spécifique de pouvoir entrer dans l'organisme sans être attaqué par le système immunitaire (*Pawelec et al. 2002*). On comprends donc pourquoi la personne âgée a plus de difficultés à contrecarrer une attaque antigénique quelconque.

De plus, il est important de signaler que même si le nombre de lymphocytes ne diminue pas significativement au cours du vieillissement, il y a un changement significatif dans le ratio de cellules mémoires et naïves. En effet, les cellules naïves ($CD45RO^+$) spécifiques pour un antigène qui a déjà été rencontré, vont devenir des cellules mémoires ($CD45RA^+$). Au cours du vieillissement, une inversion du ratio cellules mémoires : cellules naïves a lieu. Un indice de risque de mortalité a été établi par *Pawelec et al. (2005)*. Ce « Immunological Risk Phenotype » prend en compte plusieurs paramètres dont le nombre de cellules spécifiques pour le cytomégalovirus (CMV) ainsi que le ratio entre cellules CD4 :CD8. Cette étude, réalisée sur une très grande variété de sujets (sujets sains, sujets déments, sujets malades d'une pathologie diverse, sujets malades et déments, etc...) a permis de conclure qu'un ratio inférieur à 1 est un indice de risque pour l'individu. Les donneurs SENIEUR utilisés pour mon étude ont tous un ratio supérieur à 1.

4.4 L'immunosénescence et la signalisation

Afin d'étudier le vieillissement sans qu'une ou plusieurs maladies viennent interférer les données, des protocoles ont été mis en place afin de cibler la population vieillissante en bonne santé (protocole SENIEUR). Ceci permet d'étudier le vieillissement physiologique (*Ligthart et al. 1984*) et d'éviter la mauvaise interprétation des maladies sous-jacentes. Actuellement, 3 causes intrinsèques sont admises pour expliquer l'immunosénescence : 1- l'involution du thymus (*George et al. 1996*) 2- les changements dans les sous-populations de lymphocytes (*Dubiski et al. 1989*) 3- les défauts de signalisation (*Pawelec et al. 2001*). La principale découverte au niveau du système immunitaire adaptatif avec le vieillissement, est la diminution significative de la capacité des lymphocytes T à produire l'interleukine-2 (*Thoman et al. 1981; Cheung et al. 1983*) lors de la stimulation du TCR/CD28. Or, l'interleukine-2 est primordiale pour l'expansion clonale. Il y a donc un problème entre la ligation du TCR/CD28 et la production d'IL-2. Des études ont été faites et ont démontré que cette diminution de production d'IL-2 n'est pas due à un défaut dans les voies de sécrétion de la cytokine mais c'est bien au niveau pré-transcriptionnel qu'un problème existe. C'est donc un problème de transmission du signal entre le TCR/CD28 et le noyau (*Whisler et al. 1996*) qui serait à l'origine de cette déficience immunitaire, c'est notre hypothèse de travail.

Avec le vieillissement, l'expression intracellulaire des molécules de signalisation n'a pas été montrée comme étant altérée. On peut supposer que les lymphocytes T restent théoriquement aussi bien équipés lors du vieillissement. Par contre, il a été démontré que les lymphocytes de la personne âgée perdent l'expression membranaire du corécepteur CD28 (*Fagnoni et al. 1996*). D'autres changements ont lieu au niveau de l'expression de certains récepteurs membranaires des lymphocytes T avec le vieillissement (TABLEAU 6). Ainsi, lors de la stimulation des lymphocytes

T, l'expression de CD69 ainsi que l'expression du récepteur d'IL-2 (CD25) sont diminués chez la personne âgée.

Dans cette optique, plusieurs groupes de travail donc celui du *Dr. Fülöp* ont pu démontrer des défauts de signalisation intracellulaire chez les lymphocytes T avec le vieillissement humain (*Varga et al. 1990; Fülöp et al. 1991; Fülöp, 1994; Fülöp et al. 1995; Fülöp et al. 1999; Fülöp et al. 2001*). Ainsi, dans la voie de signalisation du TCR, l'activité de p56^{Lck} ainsi que son état de phosphorylation sont significativement diminués avec le vieillissement humain chez les lymphocytes T CD3⁺. La mobilisation du calcium intracellulaire, la production de IP3 et la translocation de PKC θ à la membrane sont des évènements démontrés comme étant diminués lors du vieillissement. D'autres voies de signalisation induites par la ligation du TCR ont aussi été montrées comme altérées (TABLEAU 7). Ainsi, la signalisation des cellules T via les MAPKinases est altérée lors du vieillissement (*Douziech et al. 2002; Pawelec et al. 2001*). La phosphorylation des chaînes zêta du TCR/CD3, l'activité de Fyn, l'activation de LAT, de Raf-1, de MEK, de ERK, de PKC- θ , de Vav, de JNK sont diminués avec le vieillissement dans les lymphocytes T (FIGURE 13).

Ces études ont permis de valider l'hypothèse selon laquelle les défauts de signalisation du TCR expliquent une production d'IL-2 inférieure à celle observée chez des sujets jeunes. La signalisation intracellulaire est donc altérée à différents niveaux de la cascade. Cependant, ces études n'ont pas pris en compte la signalisation issue de la ligation du CD28 qui est pourtant nécessaire pour la production d'IL-2. L'immunosénescence nécessite donc encore beaucoup d'études afin de pouvoir isoler les causes. Les voies de signalisation en aval de la membrane sont pour la plupart déficientes avec le vieillissement (TABLEAU 7). Alors quelles sont les raisons de

ces déficiences ? Est-ce un problème au niveau de la membrane en elle-même ? Les radeaux lipidiques membranaires ont-ils un rôle à jouer dans ce phénomène ?

4.5 Cholestérol, « inflam-aging » et radicaux libres dans l'immunosénescence

Lorsque la structure des radeaux lipidiques est perturbée par extraction du cholestérol avec la MBCD, l'activation cellulaire s'en trouve gravement affectée. Lors du vieillissement on observe le phénomène inverse, c'est à dire une augmentation significative du cholestérol membranaire (*Fülöp et al. 2001*). Les effets de cette augmentation sont encore largement inconnus mais on sait qu'elle est spécifique aux lymphocytes T puisque les neutrophiles qui sont de courte durée de vie (24 heures) ne subissent pas une telle modification (*Larbi et al.*, non publié). Cette augmentation du cholestérol membranaire reste encore inexpliquée puisque les donneurs jeunes (18-25 ans) et âgés (> 65 ans) sont normolipidémiques avec des concentrations plasmatiques de lipoprotéines, de cholestérol, de triglycérides dans la normale. Il reste donc la possibilité qu'une ou plusieurs voie(s) de régulation du cholestérol cellulaire soi(en)t en cause. Puisque le cholestérol est important dans la structure des radeaux lipidiques, l'augmentation de cholestérol cellulaire peut expliquer pourquoi la signalisation est altérée lors du vieillissement.

Les modifications de la membrane et de la réponse lymphocytaire sont aussi expliqués par le phénomène d'« Inflam-Aging » intégré par *Franceschi et al. (2000a)* met en évidence l'inflammation de base chez la personne âgée. L'« Inflam-Aging » se caractérise par plusieurs facteurs mais d'une manière générale ce sont tous les paramètres extrinsèques aux lymphocytes (*Franceschi et al. 2000b*). Ceux-ci inclus notamment les cytokines, le stress oxydatif, les hormones.

- Phosphorylation de la chaîne zeta
- Activité de Fyn
- Activation de LAT
- Production de PIP2
- Activation de Raf-1
- Activation de MEK
- Activation de ERK
- Recrutment de PKC- θ
- Activation de Vav
- Phosphorylation de JNK
- Translocation de NF-AT, NF-kB

Tableau 7. Étapes de signalisation du TCR qui sont défectueuses au cours du vieillissement

(Fülöp et al., Arthritis Research Therapy, 2003)

Il a été démontré que la personne âgée possède une concentration plasmatique d'interleukine-6, de tumor-necrosis factor- α détectable même en absence d'un antigène (*Bruunsgaard et al. 2001*). Tout comme la perte des capacités anti-oxydantes des cellules immunitaires (*Meydani et al. 1995*), ceci va avoir un impact direct sur les lymphocytes T. Cet impact se traduit par un état pro-inflammatoire chronique chez la personne âgée (*Giacconi et al. 2004*).

Aussi, l'action des radicaux libres modifie l'organisation lipidique membranaire et va participer à la rigidification de la membrane (*Hendricks et al. 1988*). Les radicaux libres (anion superoxide, peroxyde d'hydrogène) sont produits par les macrophages et neutrophiles lors de la réponse innée. Les neutrophiles sont des cellules à courte durée de vie, les radicaux libres n'auront pas d'effets à long terme sur ces cellules. Par contre, les lymphocytes T sont des cellules de longue durée de vie, les cellules mémoires peuvent même vivre plusieurs décennies. Ainsi, ces cellules sont plus susceptibles d'être les cibles des attaques radicalaires. Ces attaques vont influencer la disposition des phospholipides membranaires (*Marathe et al. 2000*), ainsi que tous les lipides qui composent les radeaux lipidiques.

4.6. Immunosénescence et radeaux lipidiques

Quelle que soit la ou les causes exactes de la rigidité membranaire, la conséquence est que tous les phénomènes dépendants de la fluidité et de l'organisation de la membrane vont être affectés. De la présentation antigénique, en passant par la signalisation, le métabolisme du cholestérol, la production de cytokines, la diapédèse en allant jusqu'à l'apoptose, les radeaux lipidiques sont les premières structures impliquées dans ces processus. Il est alors évident que le maintien de ces structures est primordial pour la régulation de la réponse lymphocytaire et de la réponse immune en général. La modification des radeaux lipidiques est observée dans le cas du

SLE où la signalisation et l'activation lymphocytaire sont fortement augmentées. Toutes les études jusqu'à présent ont mis en avant le rôle de la signalisation intracellulaire pour expliquer l'immunosénescence, tout au moins en partie. Le laboratoire du Dr. Fülöp s'intéresse à la signalisation des lymphocytes T, et de nombreuses preuves ont été apportées pour valider cette hypothèse (*Pawelec et al. 2001*).

Qu'en est-il des radeaux lipidiques dans l'immunosénescence ?

Aucune étude à ce jour n'a identifié des altérations dans les propriétés des radeaux lipidiques lors du vieillissement. La principale cause de ce manque de données est la nouveauté du concept de radeaux lipidiques. La suite logique à l'étude de la signalisation dans l'immunosénescence est l'étude des radeaux lipidiques qui sont les structures essentielles à l'initiation de l'activation lymphocytaire. Il devient primordial d'identifier les changements qui ont lieu dans les microdomaines de la membrane. Un point important est l'augmentation de cholestérol membranaire avec le vieillissement. On peut émettre l'hypothèse que les propriétés des radeaux lipidiques changent avec le vieillissement et pourraient expliquer toutes les altérations dans la cascade de signalisation qui en découle et donneraient une explication au défaut de production d'IL-2, de prolifération et seraient un modèle expliquant tout au moins en partie, l'immunosénescence. Au début de ma thèse, aucune étude sur l'humain n'était disponible dans ce domaine. Au cours de ma thèse, des données importantes concernant la signalisation des cellules CD4⁺ et CD8⁺ ont orienté ma recherche vers ces deux types lymphocytaires.

5.1 HYPOTHÈSE DE DÉPART

Les radeaux lipidiques des sous-populations de lymphocytes T subissent des modifications qui expliquent la réponse lymphocytaire diminuée.

5.2 OBJECTIFS DU PROJET

1. Étudier les propriétés physico-chimiques des radeaux lipidiques avec le vieillissement
2. Déterminer la capacité des radeaux lipidiques à être activés avec le vieillissement et les moduler afin d'améliorer les fonctions lymphocytaires
3. Déterminer le rôle des radeaux lipidiques chez les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺
4. Moduler les radeaux lipidiques et voir ces effets sur les fonctions lymphocytaires

MANUSCRIT I

Larbi A., Dupuis G., Douziech N., Khalil A., Fülöp T. (2004). Low grade inflammation with aging has consequences for T lymphocytes signalling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1030:125-133.

Préambule

Ce manuscrit décrit les propriétés des radeaux lipidiques des lymphocytes T CD3⁺ quiescents. Nous montrons l'effet du vieillissement physiologiques sur la composition en cholestérol des radeaux lipidiques et sur leur distribution. L'inflammation normale qui vient avec le vieillissement (Inflam-Aging) a des effets au niveau de l'état d'activation chez des lymphocytes au repos. Ces données sont les premières à démontrer de tels changements dans les radeaux lipidiques avec le vieillissement. J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans ce manuscrit.

LOW GRADE INFLAMMATION WITH AGING HAS CONSEQUENCES FOR T LYMPHOCYTES SIGNALLING

Anis Larbi^{1,2}, Gilles Dupuis^{2,3}, Nadine Douziech¹, Abdelouahed Khalil^{1,4}, Tamàs Fülöp^{1,2,4}

¹Research Center on Aging, University of Sherbrooke Geriatric Institute, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 4C4.

²Graduate Program in Immunology, Clinical Research Center and ³Department of Biochemistry Faculty of Medicine, Sherbrooke, Canada.

⁴Department of Medicine (Geriatric division), University of Sherbrooke, Quebec, Canada.

*Correspondence to : Dr. Tamàs Fülöp Jr., Research Center on Aging, University of Sherbrooke, 1036 Belvedere St. South, Sherbrooke, QC, Canada J1H 4C4. Fax: (819) 829-7141

E-mail: tamas.fulop@usherbrooke.ca

Abstract

T lymphocytes are key players of immune responses which are associated to immune senescence because their functions are the most affected with aging. Defects in signal delivery to the nucleus have been demonstrated, by our group and others, in human aging and may explain the dysfunctions that occur in T cells with aging. Although aging has been related to a decline in several biological functions, it is also associated with a basal low grade pro-inflammatory state as well as an increase in oxidative stress that lead to several changes and damages. However, there are no clear data concerning the basal state of activation of T lymphocytes and its putative link with the low grade inflammation observed with aging. Since membrane microdomains (lipid rafts) are specialized plasma membrane structures involved in T lymphocytes activation, we studied the effect of aging on the phosphorylation state of signalling molecules associated with lipid rafts. We found that the signalling molecules in T lymphocytes from elderly donors were hyperphosphorylated and that the high basal state of phosphorylation did not allow activation exposure to a T cell stimulus. We found that the cholesterol composition is changed in lipid rafts of resting T cells. We analyzed lipid raft distribution *in situ* using confocal microscopy and found a disorganization of these microdomains in T cell from aged donors. In conclusion, we show a link between aging, T lymphocytes lipid rafts, immune senescence and low grade inflammation.

Key words: lipid rafts; aging; signal transduction; low-grade inflammation

Introduction

Aging is associated with several diseases that may be linked to changes in the immune response (1). These changes were first described as a decline in the immune system to mount an efficient response against an antigen. The increased understanding of the interactions between immune cells has led to a clearer molecular view of several pathological processes such as Alzheimer's disease, autoimmune phenomena, atherosclerosis and cancer. These pathologies have been associated to immunological defects or changes with aging. Among the cells involved in acquired immunity, T lymphocytes have been described as the most affected with aging. Several hypotheses have been put forward to clarify this as yet poorly understood immune senescence (1). One of the consequences of immune senescence is a diminished T lymphocyte proliferation and clonal expansion which is mostly controlled by interleukin-2 (IL-2) and its receptor. Thus, a defect in intracellular signal transduction is an attractive hypothesis since several studies have clearly demonstrated alterations in many signalling pathways following T cell receptor (TCR) ligation of aged individuals (2). Alterations in the series of events from the plasma membrane (early events) through the cytoplasm (intermediate events) and to the nucleus (late events) may have critical consequences towards T cell activation given the fact that T cells do not possess alternative pathway of activation. The late events involving transcription factors such as NF-AT, AP-1, NF- κ B and IL-2 production can be affected by the upstream defects previously mentioned. It has been clearly established that the cholesterol-enriched lipid raft microdomains are key elements of formation of the immune synapse and TCR activation (3). In this connection, we have published that lipid raft properties from T lymphocytes are modified with aging. Specifically, we found changes increases in cholesterol content, distribution of T cell signalling molecules and impaired

lipid raft coalescence (4). We interpreted these data to suggest that they may explain, at least in part, the impairment in T cell activation and proliferation associated with aging (4). Although aging is associated with a decline in T lymphocytes functions that may be related in part to defects in intracellular signalling, it is also associated with a low grade pro-inflammatory status (5). This behaviour may result from repetitive antigenic stimulations during life that may lead to partial unresponsiveness (immune exhaustion) of the immune response and accumulation of memory cells. Furthermore, slight but detectable amounts of the pro-inflammatory cytokines, increase in by-products of reactive oxygen species and more generally of the oxidative stress are detected in this basal pro-inflammatory state (2,6). The low chronic increase of cytokine production has been associated with obesity, but also with insulin resistance and atherosclerosis which are associated with aging. In the present study, we were interested to investigate the basal activation status of T lymphocytes from young and elderly donors. We have previously shown that the lipid raft-associated Lck and LAT signalling proteins were activated to a lower extent in stimulated T cells from aged donors (4). We report the results of investigation of the status of phosphorylation of Lck and LAT in lipid rafts of resting T lymphocytes from healthy young and elderly subjects and lipid raft organization in T lymphocytes from both groups of donors. We found that Lck and, to a much lesser degree, LAT were hyperphosphorylated in resting T cells from elderly subjects as compared to young subjects. The hyperphosphorylated state of Lck and LAT in the case of elderly donors prevented their increased phosphorylation upon stimulation, a situation that was not observed in the case of young donors. Moreover, lipid rafts organization was not maintained in T lymphocytes from elderly donors as observed by confocal microscopy and by the change in cholesterol content. Taken together, these data put an emphasis on the link between the pro-inflammatory stresses

observed with aging and the activation state of T lymphocytes explaining in part the difficulty to achieve full activation of T lymphocytes from elderly donors.

Materials and Methods

Subjects and T lymphocyte preparation

Twenty elderly volunteers aged 65 to 78 years (mean, 73 years) and twenty young subjects aged 19 to 25 years (mean, 22 years) participated in the study. The lipid profile was determined by routine biochemical analysis and all the subjects were in good health, normolipidemic and satisfied the inclusion criteria of the SENIEUR protocol for immune investigations of human elderly subjects. Heparinized blood was obtained by venipuncture and lymphocytes were isolated by Ficoll–Hypaque density sedimentation. The resulting mononuclear cell fraction was depleted of monocytes by adhesion on plastic tissue culture flasks coated with autologous serum (1 h, 37°C). B-lymphocytes and residual phagocytic cells were removed by absorption to pre-warmed nylon wool column (1 h, 37°C). The resulting highly enriched T cell population was phenotyped by flow cytometry and shown to contain less than 3% contaminating B or NK cells. Cell viability was greater than 95% (Trypan blue exclusion).

T-cell stimulation and isolation of DRM on sucrose gradients

Freshly prepared T cells were kept for 1 h in RPMI medium at 37°C. Untreated T cells (20×10^6) and anti-CD3 (5 µg/ml) and anti-CD28 (5 µg/ml) mAb stimulated T cells were lysed (4°C, for 30 min) by treatment with 300 µl of HEPES-buffered saline (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.9) containing 0.5% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 10

mM phenylmethane sulfonate and 200 mM orthovanadate. An 85% (w/v) solution of sucrose in Hepes-buffered saline was added to a final concentration of 42.5% and the solution transferred to 5 ml ultracentrifuge tubes. The lysates were gently overlaid with 1 ml of sucrose 35% (w/v) and 300 μ l of sucrose 5% dissolved in Hepes-buffered saline. Centrifugations were performed at 4°C for 16 h at 200,000 x g in a Beckman TLA-100.4 rotor (Beckman Instruments, Montreal, QC). Nine fractions of 200 μ l each were collected from the top of the gradient (4).

Western blotting

The fractions (25 μ l) were immunoprecipitated with Lck or directly sized on SDS-PAGE (10% acrylamide gels), proteins were transferred to nitrocellulose membranes blocked with skimmed powdered milk in Tris-buffered saline (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) containing 0.1% (v/v) Tween. Membranes were then incubated with the relevant antibodies, anti-cholera toxin B subunit (CbTx), anti-phosphotyrosine (1:1000), anti-CD45 (1:1000), anti-LAT (1:1000), anti-Lck (1:1000) or anti-pLAT (1:200) overnight at 4°C under constant rotary movement. The membranes were washed and the corresponding secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was added (1:2000) for 1 h. The membranes were then washed and proteins revealed by enhanced chemiluminescence. Densitometric analyses were performed using an image analyzer (Chemigenius2 Bio Imaging System, Syngene, Frederick, MD).

Quantification of cholesterol

Cholesterol concentrations were measured in sucrose gradient fractions of T-cell lysates using a modification of the procedure of Katsanidis et al. (7). Briefly, 100 μ l of each fraction from 20 x 10⁶ cells were added to a mixture of chloroform/methanol (2:1) and vigorously mixed for 2 min. The tubes were centrifuged and the organic layer was collected and analyzed by HPLC. The

chromatographic system consisted of a Shimadzu pump and a PDA detector (Shimadzu Scientific Instruments, Guelph, ON). Fifty microliters samples were applied to a silica-packed column (Zorbax RX-SIL, 5 μm particle size, 4.6 x 250 mm). The mobile phase was a mixture of hexane-isopropanol (99:1) and the flow rate was 1.3 ml/min. Effluents were monitored at a wavelength of 202 nm. The retention time of cholesterol was 4 min.

Confocal microscopy analysis

Circular glass coverslips (22-mm) were coated with poly-*L*-lysine (0.1 mg/ml) for 15 min at 37°C. T cells (1×10^6 lymphocytes) in PBS (1 ml) were treated with Alexa 594-conjugated CTxB (10 μg) for 15 min at 4°C, washed and resuspended in the same medium. The cells were allowed to adhere to the coverslips (10 min) and fluorescence was recorded along the *z*-axis. The system was from Thermo Noran (Middleton, WI) and has been already described in details (4). Optical sections (0.2 μm -thick) were recorded. Image processing was done using the NIH Image freeware (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

Statistical analysis

Results were analyzed using Student's *t*-test for paired data and significance was set for $p < 0.05$ or as indicated.

Results

Levels of Lck and LAT phosphorylation in cell lysates and lipid raft fractions of resting T lymphocytes from young and elderly donors

The phosphorylation state of two major signalling molecules involved in T cell activation was analyzed by Western blotting. The protein tyrosine kinase Lck is one of the earliest molecules

involved in TCR signalling cascade where LAT is phosphorylated later on to play its role as a signalling platform. Resting T lymphocytes from both groups of donors were lysed and lipid rafts were separated by ultracentrifugation on a sucrose gradient. Analysis of phosphorylated Lck (pLck) in T cell lysates revealed that the basal levels were 1.5-fold higher in the cases of resting T lymphocytes from elderly donors in comparison with young donors (figure 1A, $p < 0.05$, $n = 10$). The difference between the two populations of donors was not due to experimental conditions since Western blot analysis clearly indicated that equal amounts of proteins were loaded in lane (Fig. 1A). We next investigated whether the differences in pLck between the two populations of donors was reflected in the lipid raft fraction. Results showed (figure 1A) 2-fold higher levels of pLck in the lipid raft fraction isolated from T cells of elderly subjects in comparison with young donors ($p < 0.01$, $n = 10$). We have previously shown that stimulation of each population of T cells resulted in increase levels of pLck in the case of young donors only (7). In contrast, the levels of pLAT were not significantly different in resting T cell lysates from both groups of donors (Fig. 1B, left panel). The distribution of pLAT in lipid raft fractions was analyzed by Western blotting. The GM₁ ganglioside-positive fractions 1 to 3 were considered as lipid rafts fractions. Results showed (Fig. 1B, right panel) low levels of pLAT in lipid rafts fractions of both groups of donors, suggesting that the phosphorylated form of LAT did not segregate to T cell microdomains. Western analysis rather showed that pLAT was associated with the heavy sucrose gradients fractions (Fig. 1B, right panel).

FIGURE 1

Lipid raft composition and organization in T lymphocytes from young and elderly donors

Data reported above established that a high basal phosphorylated state is present in resting T lymphocytes from elderly subjects. The age-related chronic inflammatory status may affect the activation of the initial components of T lymphocytes signalling including the properties of lipid raft microdomains. We quantitated the cholesterol content of the lipid raft fractions (1 to 3) derived from T lymphocytes of young and elderly donors. Results showed that the cholesterol content of lipid rafts fractions from elderly donors (filled columns) was at least two fold higher when compared to that of young donors (empty columns) (Fig. 2A). Of interest, the serum lipid composition (cholesterol, low-density lipoproteins, high-density lipoproteins and triglycerides) were analyzed routinely for each donor and no significant differences were found between the two groups of donors (data not shown). We next analyzed the distribution of lipid rafts in resting T lymphocytes from both groups of donors. T lymphocytes we labelled with Alexa-594-conjugated CbTx. We found a homogenous distribution of fluorescence in the case of T lymphocyte from young donors (Fig. 2B, left panel). In marked contrast, T lymphocytes from elderly donors revealed a non-homogeneous, diffuse distribution of fluorescence with obvious patches. These observations suggest that T cell lipid raft structure of elderly subjects may be less functional than young individual and these observations may have critical consequences in the formation of the immune synapse and the recruitment of and signalling molecules.

FIGURE 2

Discussion

Human aging is associated with immune deficiencies and T lymphocytes have been suggested as playing a critical role in this immune dysregulation. This immune senescence is explained in part by alterations in the delivery of signals from the receptor (T cell receptor) to the nucleus. The rise of intracellular calcium is impaired in T lymphocytes from healthy elderly humans. Our group and others have shown a decline in p56^{Lck} activation *in vitro* upon TCR ligation accompanied with defects in the activation of ZAP-70, LAT, SLP-76, and protein kinase C (PKC) translocation to the membrane (8,9). These early events are delayed or altered with aging leading to defects in intermediate events in TCR signalling cascade such as the Ras-mitogen activated protein kinases (MAPK) pathway (4). The late events involving transcription factors such as NF-AT, AP-1, NF- κ B and IL-2 production are affected by these upstream defects leading to impaired proliferative capacities. However, aging is not only associated with a decline in immune functions, but also with an increase in some immune parameters. Among them, slight, but detectable amounts of IL-6, IL-8, TNF- α , CRP and other acute phase proteins in the serum have been described (6,10) as part of the low grade inflammatory state observed in healthy aging. Even if the levels of cytokines are not similar to those observed during an intense immunogenic challenge, they may affect the immune system and more specifically, T lymphocyte functions and activation state. Moreover, aging is associated with an increase in by-products of oxidative stress such as oxidized lipoproteins or reactive oxygen species (11). These have dramatical effects on cellular membrane by targeting and damaging the phospholipids bilayer. It can be easily argued that low grade inflammation accompanying healthy aging along with the increase of oxidative stress may modulate basal T lymphocyte functions and basal activation status. Since lipid rafts are essential components in T cell receptor signalling and since these membrane lipid rafts may be the first targets of the low

grade inflammatory process, we were interested in signalling molecules phosphorylation in lipid rafts. We clearly found a significant increase in pLck in lipid rafts of T cells from elderly donors when compared to young donors (Fig. 1A). With respect to LAT, we did not find the same increase (Fig. 1B). It is of note that the increased Lck activation did not precede to LAT activation. This could suggest that the degree of activation of Lck through TCR is not sufficient to complete the activation of T cells, suggesting that the signal is lost within the cascade. This interpretation would also suggest that lymphokines which activate the src kinases are not linked specifically to LAT. Thus, a higher state of activation of resting T lymphocyte with aging may be also associated with the slight increase in pro-inflammatory cytokines. Although we have previously reported similar alterations in neutrophils (2), these data are the first description of the putative effects of age-related low-grade inflammation on T lymphocyte basal activation and signalling. Furthermore, this state of phosphorylation did not allow an increased level of phosphorylation upon T lymphocyte activation, using a variety of stimuli (4). As changes in signalling molecule phosphorylation occurred significantly in lipid rafts, we studied lipid rafts properties with aging. First, we confirmed previous works showing an increase in cholesterol content in lipid rafts from elderly donors (Fig. 2A). The cause of this increase is still unknown since the serum lipid parameters were not different in the two groups of donors. Defects in intracellular cholesterol storage, in cholesterol esterification or in cholesterol transport may explain the increase in membrane cholesterol. However, no studies have been done as yet to explain this finding. When we analyzed lipid raft distribution *in situ*, we found that T lymphocytes from elderly donors were not as well organized as in T lymphocytes from young donors. As shown in Fig. 2B, lipid rafts were not homogeneously distributed through the cellular membrane. To the best of our knowledge, these observations are the first to report changes in lipid raft distribution with aging in resting T

cells. Lipid raft heterogeneity may have critical consequences in T lymphocyte activation since it has been demonstrated that lipid rafts recruitment to a site of stimulation is essential to enhance T lymphocyte activation and commitment to proliferation (3). Since cholesterol is one of the major molecules involved in lipid raft structural organization, a change in lipid composition may explain why lipid rafts are not well organized. Moreover the age-related increase in free radicals and other by-products and modified proteins may explain why membranes are not structurally the same. We can put forward the hypothesis that signalling molecules could be phosphorylated upon an oxidative stress, modifying their interaction with membrane lipids or by cytokines ligation to their receptors. Free radicals can damage cell membranes and stop or slow down proteins movement within the plane of the plasma membrane explaining in turn the decline in phosphorylated proteins upon stimulation. In summary, our study shows a modified state of phosphorylation of signalling molecules in T lymphocytes with aging and perturbation of lipid raft composition and distribution. These findings may provide a link between age-related low-grade inflammation and T lymphocytes signalling. Our laboratory is currently investigating the mechanisms linking low-grade inflammation to lipid raft function.

Legends to figures

Figure 1. Lck and LAT phosphorylation in resting T lymphocytes from young and elderly subjects. T lymphocytes were lysed and lysates were layered on a sucrose gradient and centrifuged at 100,000 x g for 16h at 4°C. Identical amounts of proteins concentrations were sized on SDS-PAGE and relevant proteins revealed by Western blotting and enhanced chemiluminescence. A) Lck and its status of phosphorylation (pLck) were determined in immunoprecipitates of pooled

lipid raft fractions revealed with mAbs directed against Lck or phosphotyrosine (left panel). Band intensities were semi-quantitated by densitometric analysis (arbitrary units). Levels of basal Lck phosphorylation are shown (right panel) in the case of lymphocytes from young (empty columns) and elderly donors (filled columns). B) Results of Western blot analysis (chemiluminescence) of basal LAT and its phosphorylation status (pLAT) in T cell lysates (left panel). GM₁-positive lipid raft fractions were identified by indirect immunofluorescence using an anti-CbTx mAb. The presence of pLAT in the sucrose gradient fractions was done in immunoprecipitates probed with anti-phosphotyrosine mAb and chemiluminescence. Experiments were done for 10 donors of each group. Significant difference is indicated by one asterisk (*) for $p < 0.05$ and two asterisks (**) for $p < 0.01$.

Figure 2. Lipid rafts distribution in T cells from young and elderly subjects. T cells were isolated and lysed as described in the *Materials and Methods* section. A) The cholesterol content was analyzed by HPLC in lipid raft fractions, as indicated. Results are shown in the case of young (empty columns) and elderly donors (filled columns). Data were obtained from 10 independent donors. Statistical difference ($p < 0.01$) is indicated by one asterisk (*). B) Confocal microscopy of Alexa 594-labelled CbTx T lymphocytes from young and elderly donors. The cells were allowed to adhere to poly-L-lysine-coated coverslips and images were captured after 10 min. The bar scale is indicated at the bottom right corner of each image. The images are representative of 5 independent experiments conducted with 5 different donors from each group.

Acknowledgments

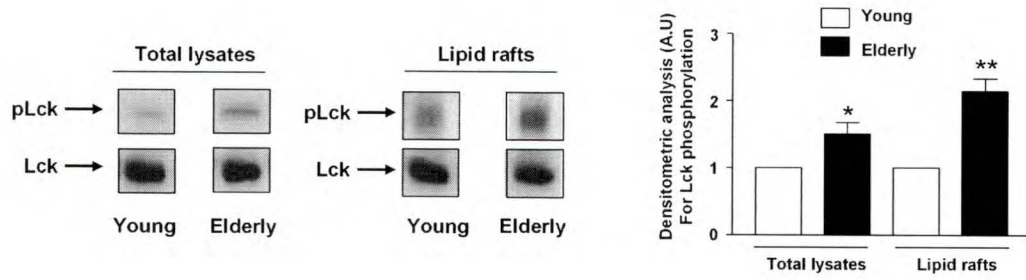
This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and by the Center of Aging research.

References

1. Grubeck-Loebenstein, B. and G. Wick. 2002. The ageing of the immune system. *Adv Immunol* 80:243-284.
2. Fülöp Jr., T., K. Hirokawa, K., A. Larbi, et al. 2003. Alteration of signal transduction changes with aging in lymphocytes and neutrophils. In. Pawelec: *Basic Biology and Clinical Impact of Immunosensecence*; Elsevier, Ireland, pp.93-121.
3. Kane, L.P., J. Lin, and A. Weiss, 2000. Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12:242-249.
4. Larbi, A., N. Douziech, G. Dupuis, et al. 2004. Age-associated alterations in the recruitment of signal transduction proteins to lipid rafts in human T lymphocytes *J. Leukoc. Biol.* (in press).
5. Franceschi, C., M. Bonafe, S. Valensin, et al. 2000. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908:244-254.
6. Bruunsgard, H. and B.K. Pedersen. 2003. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 23:15-39.
7. Katsanidis, E. and P.B. Addis. 1999. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Rad. Biol. Med.* 27:1137-1140.
8. Fülöp Jr. T., D. Gagné and A.C. Goulet. 1999. Age-related impairment of p56lck and ZAP70 activities in human T lymphocytes activated through the TCR/CD3 complex. *Exp. Gerontol.* 34:197-216.

9. Miller, R.A. 2000. Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine* 18:1654-1660.
10. Pedersen, B.K. and H. Bruunsgaard. 2003. Possible beneficial role of exercise in modulating low-grade inflammation in the elderly. *Scand, J. Med. Scvi. Sports* 13:56-62.
11. Harman, D., 1956. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11:298-300.

A



B

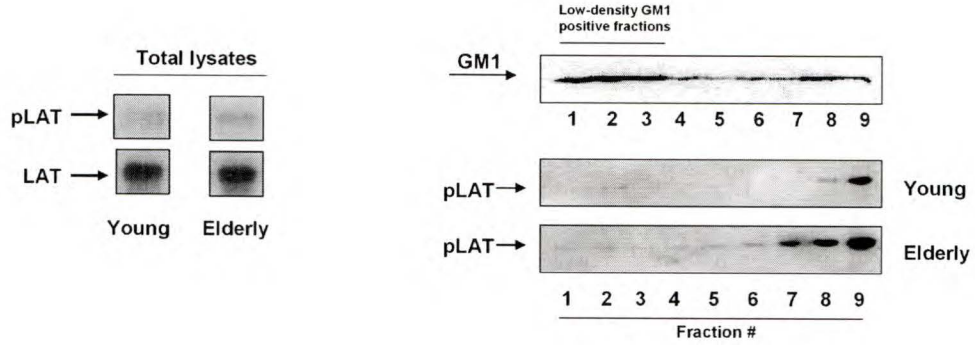
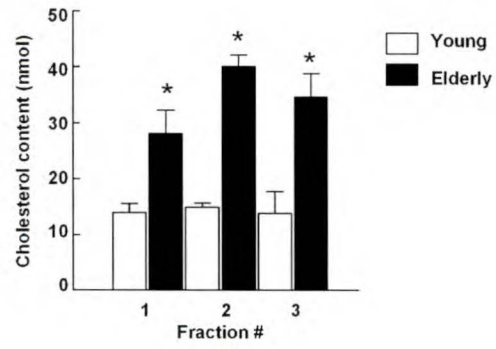


FIGURE 1

A



B

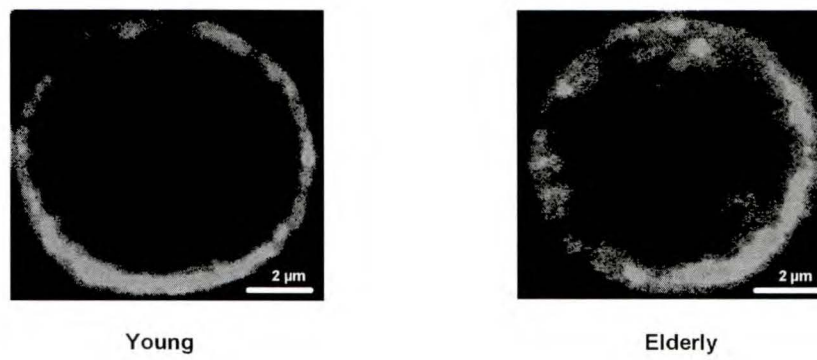


FIGURE 2

MANUSCRIT II

Larbi A., Douziech N., Dupuis G., Khalil A., Pelletier H., Guerard K-P., Fulop T. (2004) Age-associated alterations in the recruitment of signal transduction proteins to lipid rafts in human T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 75:373-381.

Préambule

Ce manuscrit démontre une diminution de la fluidité des radeaux lipidiques des lymphocytes T CD3⁺ avec le vieillissement. Cela est corrélé avec l'augmentation du cholestérol au niveau des fractions correspondant aux radeaux lipidiques. De plus, nous démontrons que la polarisation des radeaux lipidiques est diminuée chez les sujets âgés comparativement aux sujets jeunes. L'association de la molécule de signalisation p56^{Lck} est diminuée alors que l'activation de p56^{Lck} et LAT se trouvent diminuées avec le vieillissement. J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans ce manuscrit et ai participé aux expériences du tableau 1.

**AGE-ASSOCIATED ALTERATIONS IN THE RECRUITMENT OF SIGNAL TRANSDUCTION
PROTEINS TO LIPID RAFTS IN HUMAN T LYMPHOCYTES**

**Anis Larbi^{1,2}, Nadine Douziech¹, Gilles Dupuis^{2,3}, Abdelouahed Khalil¹, Hugues Pelletier¹,
Karl-Philippe Guerard¹, Tamàs Fülöp Jr.^{1,2,4}**

¹Research Center on Aging, University of Sherbrooke Geriatric Institute, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 4C4.

²Graduate Program in Immunology, Clinical Research Center and ³Department of Biochemistry Faculty of Medicine, Sherbrooke, Canada

⁴Department of Medicine (Geriatric division), University of Sherbrooke, Quebec, Canada

Running title: Signalling proteins recruitment in DRM and aging

*Correspondence to : Dr. Tamàs Fülöp Jr., Research Center on Aging, University of Sherbrooke, 1036 Belvedere St. South, Sherbrooke, QC, Canada J1H 4C4. Fax: (819) 829-7141

e-mail: tamas.fulop@usherbrooke.ca

Abstract

Aging is associated with a decline in T-cell activation and proliferation but the underlying mechanisms are not fully understood. Recent findings suggest that lipid rafts act as a platform in the initiation of T-cell activation by selectively recruiting signalling proteins associated with formation of the initial complex of signal transduction. We tested the hypothesis that lipid raft properties are altered in T lymphocytes from elderly healthy individuals in comparison with young subjects. Results showed that the cholesterol content of lipid rafts derived from these cells was consistently higher in the case of elderly donors and that membrane fluidity was decreased. In addition, lipid rafts coalescence to the site of TCR engagement was impaired in T-cells from elderly donors. The recruitment of p56^{Lck}, LAT and their tyrosine-phosphorylated forms to lipid rafts was decreased in activated T-cells from aged individuals. CD45 was not recruited to the lipid raft fractions in either group of subjects. Our data suggest that some properties of lipid rafts are altered in aging and this finding may be part of the causes for the decline in T-cell functions that is observed in elderly individuals.

Key words: T cell receptor / LAT / p56^{Lck} / aging / cholesterol

INTRODUCTION

T lymphocytes are key regulators of immune responses [reviewed in 1]. They become activated as a result of recognition of antigenic determinants presented by professional antigen presenting cell to the T cell receptor (TCR) within restriction of the major histocompatibility complex [reviewed in 2]. Adhesion molecules are involved in the formation of a stable immune synapse between the partner cells, which provides the extended contact required for T cell activation [3]. The activation of protein tyrosine kinases (PTK) [4] and the mobilization of Ca^{2+} [reviewed in 5] are the earliest biochemical events that can be detected following the engagement of the TCR. p56^{lck} (Lck), a member of the *src* family of PTK which is regulated by CD45 [reviewed in 6] is crucial to the initiation of signal transduction and targets immunoreceptor tyrosine-based activation motifs of the CD3 complex and the ζ -dimer [reviewed in 7]. ZAP-70 is recruited to the ζ -dimer and phosphorylated by Lck [8]. Activated ZAP-70 phosphorylates the linker of activated T cells (LAT) which becomes a scaffold protein for the recruitment of multiple partners [9] including the adaptor proteins Gads and Grb2 and the enzymes of phospholipid metabolism, phosphatidylinositol-3-kinase and phospholipase-C γ 1 [reviewed in 10]. LAT-associated Gads bring SLP-76 to the plasma membrane where it becomes phosphorylated, allowing its interactions with the exchange factor Vav, the adaptor proteins SLAP-130/Fyb which provide a link between T cell activation, up-regulation of integrin affinity/avidity and, reorganization of the cell cytoskeleton [reviewed in 11]. Although the engagement of the TCR provides an essential signal to T cells, commitment to proliferation and differentiation will not occur unless a secondary signal is provided by ligation of CD28 [12,13].

A number of components of the T-cell activation complex are recruited to plasma membrane microdomains that are termed lipid rafts or detergent-resistant microdomains (DRM) [reviewed in 14]. These domains are composed primarily of high-melting sphingolipids packed with cholesterol that generate a liquid-ordered phase arrangement [15,16]. DRM can act as molecular filters in which case some plasma membrane proteins having an affinity for DRM are brought into molecular contacts whereas others are excluded [16-18]. Current evidence suggests that DRM provide a platform for the recruitment of proteins involved in the formation of the initial steps of T-cell signalling [19]. For instance, proteins critical to T-cell activation such as src PTK, LAT, protein kinase C (PKC)- θ , Gads, WASP [18,20] and a host of other proteins [21] are recruited to DRM following TCR ligation. Current data support the notion that DRM are essential for T cell activation and interleukin-2 (IL-2) production [22] and that ligation of CD28 is required to enhance the coalescence of DRM [23].

A decrease in the immune response is generally associated with aging [reviewed in 24]. A host of data support the notion that T-cell functions such as proliferation and cytokine production are perturbed in aged individuals [25]. The cause of these age-related alterations in T cell functions is not fully understood. However, atrophy of the thymus, a shift in T cell subpopulation towards memory cell types, cytokine shift towards Th2 and alterations in T-cell associated signal transduction have been suggested as possible causes [reviewed in 26]. Furthermore, there is a decline in CD28 but not TCR expression [27,28]. A number of studies have reported defects in the early events of the T-cell signaling cascade with aging in humans [25,27,29] and mice [30,31]. These defects observed include altered tyrosine phosphorylation of signaling proteins, calcium mobilization, activation of the MAPKinase and JNKinase pathways, translocation of NF-ATc to the nucleus, IL-2 production and less efficient immune synapse formation due to defects in

signalling protein recruitment to DRM [reviewed in 31]. In this connection, the cholesterol content of T-cells is increased with aging in humans [32,33] and that may be related to the decrease in plasma membrane fluidity observed in aged human T cells [reviewed in 34].

We have previously reported alterations in signal transduction in T lymphocytes with aging in human T-cells [35]. In the present work we extend our studies to the cholesterol content of DRM as well as signalling molecules recruitment in DRM. We observed that the cholesterol content of DRM was significantly higher in T-cells from elderly subjects as compared to young individuals, whereas there was the opposite findings in the case of plasma membrane and DRM fluidity. Confocal microscopy analysis revealed a defect in the coalescence of DRM in T-cells of aged subjects exposed to mAb directed against CD3 or a combination of CD3 and CD28. In addition, the association of phosphorylated Lck (pLck) and phosphorylated LAT (pLAT) in DRM was significantly decreased in the case of T-cells from elderly subjects. Our data suggest that the recruitment of key signalling proteins associated with the early events of T-cell activation is impaired with age and this finding may be of importance in the decline of T-cell functions associated with aging.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

RPMI 1640 culture medium was obtained from Gibco BRL (Gaithersburg, MD) whereas Ficoll 400 and Dextran T-500 were from Amersham Biosciences (Montreal, QC). Nitrocellulose Hybond membranes and the enhanced chemiluminescence kit were purchased from Amersham Biosciences. Reagents for SDS-PAGE were from Bio-Rad (Richmond, CA) and Fisher Scientific

(Montreal, QC). The HPLC column used for cholesterol quantification was purchased from Agilent Technologies (Palo Alto, CA). Cholesterol standards were from Supelco (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). Alexa 594-labeled cholera toxin B subunit (CTxB) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Monoclonal antibodies directed against LAT (clone FL-233), phosphotyrosine (clone pY99) and Lck (clone 2102) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). An anti-CD3 mAb (UCHT-1) was purchased from Sigma-Aldrich and an anti-CD45 mAb (clone HI30) was from Becton Dickinson (Montreal, QC). The anti-pLAT (Tyr 226) mAb was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Secondary antibodies were obtained from Chemicon International (Temecula, CA). An anti-CTxB polyclonal Ab raised in the goat was purchased from Calbiochem (Mississauga, ON).

Subjects

Twenty elderly volunteers aged 65 to 78 years (mean, 73 years) participated in the study which included 17 women. The cohort of 20 young healthy subjects was aged 19 to 25 years (mean, 22 years) included 14 women. The research protocol was approved by a local institutional (Research Center on Aging) ethics committee. All subjects gave written informed consent. The lipid profile was determined by routine biochemical analysis at the clinical biochemistry laboratory of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. All the subjects were in good health, normolipidemic and satisfied the inclusion criteria of the SENIEUR protocol for immune investigations of human elderly subjects [36].

T lymphocyte preparation

Heparinized blood was obtained by veinpuncture and diluted 2-fold with RPMI 1640 medium containing 2% FBS. Lymphocytes were isolated by Ficoll–Hypaque density sedimentation [32].

The resulting mononuclear cell fraction was depleted of monocytes by adhesion to plastic tissue culture flasks coated with autologous serum (1 h, 37°C). B-lymphocytes and residual phagocytic cells were removed by absorption to pre-warmed nylon wool column (1 h, 37°C). The resulting highly enriched T cell population was phenotyped by flow cytometry and shown to contain less than 3% contaminating B or NK cells. T cell preparations used in the assays consisted of greater than 96% CD3-positive cells with less than 1.0% surface IgM (B cells)-, CD16 (NK cells)- and CD14 (monocytes)-positive contaminating cells. Cell viability was greater than 95% (Trypan blue staining). Identical numbers of T-cells from young and aged donors were used in each comparative experiment.

T-cell stimulation and isolation of DRM on sucrose gradients

Freshly prepared T-cells were kept for 1 h in RPMI medium at 37°C. The cells (20×10^6 lymphocytes) were then exposed to a combination of anti-CD3 (5 µg/ml) and anti-CD28 (5 µg/ml) mAb for various periods of time at 37°C as described [33]. Control cells (20×10^6 lymphocytes) were left untreated. The cells were lysed (4°C, for 30 min) by treatment with 300 µl of HEPES-buffered saline (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.9) containing 0.5% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 10 mM phenylmethane sulfonate (PMSF) and 200 mM orthovanadate. A 85% (w/v) solution of sucrose in HEPES-buffered saline was added to a final concentration of 42.5% and the solution transferred to 2 ml ultracentrifuge tubes. The lysate was gently overlaid with 1 ml of sucrose 35% (w/v) and 300 µl of sucrose 5% dissolved in HEPES-buffered saline [25]. Centrifugations were performed at 4°C for 16 h at 200,000 x g in a Beckman TLA-100.4 rotor (Beckman Instruments, Montreal, QC). Nine fractions of 200 µl each were collected from the top of the gradient. DRM fractions were selected on the basis of their content in GM1 which was revealed as follows. CTxB (10 µg/ml) was added to 20×10^6

lymphocytes which were lysed as above. The lysate was sized on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and Western blotted as described in the next section using indirect immunodetection with an anti-CTxB polyclonal Ab.

Western blotting

Twenty μg of proteins from total cell lysates and 25 μl from sucrose gradient fractions were diluted in Laemmli's buffer under reducing (*DL*-dithiothreitol) conditions. The samples were separated by SDS-PAGE (10% acrylamide gels) as described [33]. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes which were treated (1 h, room temperature) with Tris-buffered saline (TBS) (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.6) containing 0.1% (v/v) Tween 20 and a solution of 5% (w/v) skimmed powdered milk. They were then incubated with the relevant antibodies, anti-phosphotyrosine (1:1000), anti-CD45 (1:1000), anti-LAT (1:1000), anti-Lck (1:1000) or anti-pLAT (1:200). The membrane were placed on a rotary end-over-end mixer and incubated overnight at 4°C under constant rotary movement. The membranes were washed and the corresponding secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was added (1:2000) for 1 h. The membranes were then washed and proteins revealed by enhanced chemiluminescence. Low density fractions 1 to 3 corresponded to DRM. Densitometric analyses were performed using an image analyzer, Chemigenius2 Bio Imaging System (Syngene, Frederick, MD).

Quantification of cholesterol

Cholesterol concentrations were measured in sucrose gradient fractions of T-cell lysates using a modification of the procedure of Katsanidis *et al.* [37]. Briefly, 100 μl of each fraction from 20 x 10⁶ cells were added to a mixture of chloroform/methanol (2:1) and vigorously mixed for 2 min. The tubes were centrifuged and the organic layer was collected and analyzed by HPLC. The

chromatographic system consisted of a Shimadzu pump and a PDA detector (Shimadzu Scientific Instruments, Guelph, ON). Fifty microliter samples were applied to a silica-packed column (Zorbax RX-SIL, 5 µm particle size, 4.6 x 250 mm). The mobile phase was a mixture of hexane-isopropanol (99:1) and the flow rate was 1.3 ml/min. Effluents were monitored at a wavelength of 202 nm. The retention time of cholesterol was 4 min.

Fluorescence anisotropy measurements in T-cells and DRM derived from these cells

Cell membrane anisotropy was determined using the fluorescent probe diphenylhexatriene (DPH) dissolved in tetrahydrofuran (4 mM) [38]. The cell suspension (5×10^5 lymphocytes/ml) was incubated in the presence of 2 µM DPH for 30 minutes at 37°C, washed and resuspended in buffered saline solution (BSS; 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes and 10 mM glucose, pH 7.2). In the case of measurement of anisotropy of DRM, 100 µl of the pooled fractions (1 to 3) from 20×10^6 T-cells were diluted in 1 ml BSS and the lipid probe was added as described in the case of whole T-cells. The DRM samples were centrifuged (1 h, 100,000 x g), the supernatants discarded and the cell fractions resuspended in BSS as described [39]. Fluorescence was recorded on a HITACHI spectrofluorimeter F-4500 coupled to a Vextra polarizer (Oriental Motor Co. Ltd, Japan). The lipid probe was excited by vertically-polarized light at 360 nm, and the emitted light was recorded at 430 nm through a polarizer orientated parallel and perpendicular to the direction of polarization of the excitation beam. Steady-state fluorescence anisotropy (r) was calculated as follows,

$$r = (I_v - GI_p) / (I_v + 2GI_p)$$

where I_v and I_p are respectively the parallel and perpendicular polarized fluorescence intensities whereas G is the monochromator grating correction factor. Fluidity (f) was derived from the inverse value of anisotropy ($f = 1/r$).

Laser scanning confocal microscopy (LSCM)

Circular glass coverslips (22-mm) were coated with poly-*L*-lysine (0.1 mg/ml) for 15 min at 37°C. The coverslips were then coated with an anti-CD3 mAb (5 µg/ml) or a combination of anti-CD3 (5 µg/ml) and anti-CD28 (5 µg/ml) for 1 h at 37°C and washed. T cells (1×10^6 lymphocytes) in PBS (1 ml) were treated with Alexa 594-conjugated CTxB (10 µg) for 15 min at 4°C, washed and resuspended in the same medium. The cells were allowed to adhere to the coverslips (10 min) and fluorescence was recorded along the *z*-axis after 5 min of contact. The LSCM system was from Thermo Noran (Middleton, WI) and has been already described in details [40]. Optical sections (0.2 µm-thick) corresponding to the region of contact of the cell with the coverslip were recorded. The CTxB-labeled cells were excited at 568 nm through a 10 µm pinhole aperture and the emitted fluorescence was measured through a long-pass filter (>590 nm). Image processing and surface quantification of pixel intensities were done using the NIH Image freeware (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). Representations of fluorescence intensities according to a palette of pseudocolors were generated by means of the NIH Image freeware which was also used to quantify surface pixel intensities.

Statistical analysis

Results were analyzed using Student's *t*-test for paired data and significance was set for $p < 0.05$ or as indicated.

RESULTS

Cholesterol concentration in T-cells and DRM derived from T-cells of elderly and young subjects

Cellular cholesterol homeostasis is the result of a fine balance between cholesterol capture, biosynthetic conversion, synthesis and efflux [41]. Besides its involvement in a host of

biosynthetic transformations, cholesterol is an essential component of lipid membranes that serves to stabilize lipid raft micro-domains [14,42]. We have previously reported that the content of T-cell cholesterol increases with aging [33]. Here, we asked the question whether this was also the case in DRM from aged individuals. Results confirmed that the concentration of total cholesterol was increased 1.8-fold in T-cells from elderly subjects as compared to young donors (Table 1).

TABLE 1

Of significance, the differences were also observed in the concentrations of cholesterol of sucrose gradient fractions from T-cell lysates. For instance, data revealed that the cholesterol concentration was more than 2-fold in DRM (2.4 ± 0.4 -fold average in fractions 1 to 3) from elderly individuals as compared to young subjects (Table 1). The pattern of increased cholesterol concentration was also observed in heavy sucrose density fractions (1.7 ± 0.3 -fold average in fractions 4 to 9).

Assessment of membrane fluidity in T-cells and in DRM derived from these cells

We used the technique of determination of anisotropy to assess the fluidity of T cells and T-cell-derived DRM obtained from young and elderly donors. Our observations confirmed previous results [27,34] that membrane fluidity of T-cells decreased with aging (Fig. 1A). There was a statistical difference ($p < 0.002$) between the two groups of donors. For instance, membrane fluidity had a value of 6.26 ± 0.24 in the case of young donors but was 5.32 ± 0.16 in T-cells from elderly subjects. The alteration in membrane fluidity was also affected in DRM from T-cells of elderly individuals as compared to young subjects (Fig. 1B), In this case, the values of fluidity

were 4.29 ± 0.25 (young subjects) and 3.86 ± 0.18 (elderly subjects), with a significant differences ($p < 0.05$) between the two groups.

FIGURE 1

LSCM analysis of the coalescence of T-cell DRM from elderly and young individuals

We next investigated whether the increased cholesterol content and decreased fluidity with aging would affect DRM coalescence to a region of contact with insolubilized Ab directed against T-cell signaling molecules. The GM1 ganglioside is a useful marker of DRM and a ligand of CTxB. Fluorescent derivatives of CTxB can therefore be used to study the spatio-temporal dynamics of distribution of DRM in live cells by confocal microscopy [40]. We set up a series of experiments to simulate the encounter of a T-cell with APC by coating glass coverslips with an anti-CD3 mAb or with a mixture of anti-CD3 and anti-CD28 mAb. Enriched T-cell populations obtained from young and elderly donors were labeled with Alexa 594-conjugated CTxB, placed in contact with the coverslips and fluorescence was recorded over a 0.2 μm -thick optical slice as a function of time, at 37°C. Data are shown at a time of 5 min of contact.

FIGURE 2

Control experiments (surfaces coated with poly-*L*-lysine) revealed an absence of coalescence of fluorescence at region of contact of the cell with the coverslip in T-cells from young (Fig. 2A) or elderly donors (Fig. 2D). In marked contrast, there was a coalescence of fluorescence at the region of contact when the coverslips had been coated with the anti-CD3 mAb. The levels of pixel

intensities were 1.7-fold higher in T-cells from young (Fig. 2B) as compared to elderly donors (Fig. 2E and Fig. 2G). Coating the coverslips with a mixture of anti-CD3 and anti-CD28 significantly increased the levels of fluorescence measured at the region of contact of the cell with the substratum in the case of T-cells from young (Fig. 2C) and elderly (Fig. 2F) donors as compared to anti-CD3 coating (Fig. 2G). Although the relative fluorescence increased upon stimulation in T cells of elderly subjects it was significantly less than in cells of young subjects treated under similar conditions of stimulation (anti-CD3 or anti-CD3 and anti-CD28). In fact, the coalescence of fluorescence to the region of contact was 1.6- and 1.3-fold higher in T-cells from young as opposed to elderly donors in the case of anti-CD3 and the combination of anti-CD3 and anti-CD28, respectively (Fig. 2G).

Recruitment of Lck and pLck to DRM from T-cells of elderly and young subjects

We and others have reported that T-cell stimulation failed to significantly increase the levels of tyrosine phosphorylation of Lck and its activity in elderly humans [29,43], suggesting that an altered regulation of the TCR/CD3-associated Lck may contribute to the age-related defects of responsiveness of human T cells. To determine whether these defects could be related to an impaired recruitment of Lck in DRM, we analyzed the distribution of Lck and its tyrosine-phosphorylated form in DRM of T-cell lysates from young and elderly subjects. Western blotting experiments showed that the amount of Lck in pooled-DRM (fractions 1 to 3) of resting T cells decreased in elderly subjects as compared to young subjects (Fig. 3A).

FIGURE 3

A brief exposure (1 min) of T-cells to a mixture of anti-CD3 and anti-CD28 mAb resulted in increased association of Lck to DRM in the case of T-cells from young subjects as compared to elderly donors (Fig. 3A). Further exposure of the cells (5 min) to the mixture of mAb was associated with a decline in the association of Lck with DRM fractions in both groups of donors (data not shown). Densitometric analysis of Western blot experiments showed that the amount of Lck associated with DRM in resting T-cells significantly ($p < 0.05$) declined with aging (Fig. 3B), an observation that was also valid in the case of stimulated T-cells (Fig. 3B). Whereas Lck recruitment increased upon stimulation in the case of T-cells from young donors, it remained nearly unchanged in T-cells from elderly donors (Fig. 3B). We next investigated whether pLck would be differentially recruited to DRM in the two groups of subjects. T-cells were activated by exposure (1 min) to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAb and DRM fractions 1 to 3 were pooled, Lck was immunoprecipitated and blots revealed with an anti-phosphotyrosine mAb. The amount of Lck was unchanged with aging (data not shown). Results showed that pLck was associated with DRM of elderly donors to a higher extent than in the case of young donors in resting T-cells (Fig. 3C). However, the opposite observation was made when T-cells had been activated (Fig. 3C). Densitometric analysis of Western blot experiments showed that the activation of T-cells from elderly donors did not result in increased association of pLck with DRM but it increased 3.3-fold in the case of activated T-cells from young individuals (Fig. 3D).

Distribution of LAT and pLAT to DRM from T-cells of elderly and young subjects

The transmembrane adapter LAT is an essential downstream effector of T-cell activation that serves as an anchor for the formation of a multiprotein complex that localizes to DRM [9]. We

sought to determine whether there were differences in the recruitment of LAT in DRM of T-cells from young and elderly donors.

FIGURE 4

Western blot analysis showed that LAT was present in DRM (fractions 1-3) at the same level in resting T-cells (Fig. 4A and Fig. 4B) of young and elderly individuals. Exposing T-cells (5 min) to a combination of an anti-CD3 and anti-CD28 mAb led to a higher distribution ($p < 0.05$) of LAT in DRM in T-cell lysate from young donors as compared to elderly subjects (Fig. 4A and Fig. 4B). These results were consistent with previous works that showed an increase in association of LAT to DRM upon stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAb [20]. The levels of pLAT in DRM fractions of non-stimulated T-cells were low in both groups of subjects (Fig. 4C and Fig. 4D). However, the activation of T-cells by exposure (5 min) to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAb led to a significant increase of pLAT in the DRM fractions of T-cells from the young but not elderly subjects (Fig. 4C and Fig. 4D).

Absence of recruitment of CD45 to DRM from T-cells of elderly and young subjects

It has been generally observed that CD45 is excluded from DRM in activated human T-cells [6]. All nine sucrose density fractions from T-cell lysates of young and elderly donors were analyzed by Western blotting.

FIGURE 5

We found that CD45 was exclusively associated with the heavy density sucrose fractions in resting T-cells from young (Fig. 5A) and elderly (Fig. 5B) subjects. Exposure (5 min) of T-cells to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAb did not modify the distribution of CD45 in the T lymphocytes obtained from the young (Fig. 5C) or the elderly (Fig. 5D) subjects.

DISCUSSION

The decline in cell-mediated immune functions [24-26] makes aged people more susceptible to infections, cancer, autoimmune diseases and it may contribute to atherosclerosis and Alzheimer's disease [44-46]. However, no consensus exists to explain the age-associated alterations in cell-mediated immunity. Whereas a number of possibilities can be put forward to account for these observations, defects in the transduction of mitogenic signals following TCR stimulation remain attractive candidates. Specificity and fidelity of signal transduction are crucial for T-cells to respond efficiently to changes in their environment. We have previously reported that membranes of T-cells from elderly subjects contained twice the amounts of cholesterol in comparison with T-cell membranes of young subjects [32]. Here, we found that the higher levels of T-cell total cholesterol were reflected in DRM fractions of T-cell lysates from elderly donors which was more than 2-fold as compared to young donors (Table 1). It is of note that even if the cholesterol content in non-DRM fractions was also increased, the augmentations in the DRM fractions were significantly higher (Fig. 1). The explanation of the increased levels of cholesterol in T cell membranes from the cohort of elderly normolipidemic individuals is not known. In addition, the effect of increased cholesterol content on T-cell signalling and functions is not yet established, in contrast to the role of cholesterol in DRM [47]. Our observations suggest that the cellular regulation of cholesterol metabolism is altered with aging which could be caused by an abnormal

regulation of cellular cholesterol storage or export, or both. The enzyme acyl-cholesterol acyl-transferase (ACAT) esterifies free cholesterol to rid the cells of excess cholesterol [48]. An alteration in ACAT activity could be responsible for the high levels of cholesterol found in T-cells from elderly donors [49]. Moreover, the efficiency of HDL-dependent cholesterol transport could be altered in elderly subjects since these lipoproteins are more susceptible to oxidation with aging [50]. In addition, the proportion of memory ($CD45RO^+$), $CD8^+CD28^-$ and $CD57^+CD28^-$ T-cells increases with aging [28,51,52]. The expanded life time of memory T-cells and the increased proportion of senescent T-cells ($CD28^-$) may render these T lymphocyte populations more susceptible to alteration in lipid metabolism, explaining the increase in cholesterol content. Further experiments are needed to test this hypothesis.

Aging has been reported to be associated with a decrease in the fluidity of the T-cell plasma membrane [34]. We measured the fluidity of T-cells from young and elderly donors and DRM derived from these cells. The differences in the protocols of labelling did allow a direct comparison between T-cells and T-cell fractions. Data showed that the decreased in fluidity of T-cells observed with aging [34] was also found in DRM which are key elements of T lymphocytes activation [14,42]. These alterations in the physico-chemical properties of T-cell plasma membrane could affect the formation of DRM and their lateral mobility as a result of the high levels of plasma membrane cholesterol [42,53]. We used LSCM to obtain evidence of decreased mobility of DRM in T-cells from aged individuals. T-cells from both groups of donors were challenged with insolubilized mAb directed against the TcR and CD28 or control and the location of DRM was visualized with an Alexa 594-labeled CTxB, a marker of the GM1 ganglioside [40]. Viola et al. [23] have shown that labeled-CTxB did not induce lipid rafts coalescence in resting T-cells. We confirmed these results in resting T-cells (Fig. 2A and Fig. 2D). The levels of pixel intensities were

higher in the case of T-cells from young as opposed to elderly individuals, whether an anti-CD3 or a combination of anti-CD3 and anti-CD28 were used to activate the cells (Fig. 2G). The combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAb was more than twice as effective as the anti-CD3 mAb in triggering the coalescence of fluorescence (Fig. 2G), in agreement with the findings of Viola *et al.* [23] who showed that ligation of both the TCR complex and CD28 was needed to induce maximal coalescence of lipid rafts in human T-cells. The decrease in DRM movement in the membrane bilayer observed here may contribute to the defects in T cell proliferation seen with aging [33] since plasma membrane and especially DRM integrity is needed for T-cell activation through the immunological synapse [54].

Recent data suggest that the differential localization of signalling proteins to DRM plays a key role in T-cell activation [18,21]. Miller and his group have reported an alteration in several components of the signalling complex in memory and naïve T-cells from aged mice [30]. They observed a reduced activation of several DRM-associated proteins (LAT, PKC, and Vav) and a decline in the proportion of cells that induce a redistribution of LAT and Vav to the T cell-APC synapse upon ligation of the TCR. Studies performed here revealed that exposure of T-cells to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAb triggered an increase of Lck redistribution to DRM fractions which was higher in the case of young as compared to elderly donors (Fig. 3). These differences were not related to the levels of expression of Lck since we have reported that its expression did not change with aging [29]. There is a decline in the levels of tyrosine-phosphorylated proteins following the activation of T-cells from aged humans [27] and mice [55] and these differences could be explained by a differential distribution in DRM. This possibility was investigated and data shown here clearly indicated that the activation of T-cells resulted in increased levels of association of Lck and pLck in DRM of young but this level was lower in the case of elderly subjects (Fig. 3).

The low levels of activation of Lck in T-cells have been already observed at the whole cell level by our group and others [29,43]. Here we show for the first time that this decline also occurs in specific membrane microdomains. The decline in Lck association to lipid rafts may also be explained by an altered interaction with LAT since it has been shown that LAT regulates Lck in T cells [56].

LAT is an essential component of the assembly of the machinery of signal transduction in T lymphocytes [9,57]. We found that LAT was distributed approximately to the same extent in DRM derived from T-cell lysate of young and elderly subjects (Fig. 4). However, the activation of the T lymphocytes resulted in lower association of LAT with DRM in T-cells from elderly donors as compared with young donors. There were no changes in the total expression of the protein. Data were even more striking when the distribution of pLAT in DRM was analyzed. Results showed more than a 10-fold increase in DRM-associated pLAT in the case of activated T-cells from young subjects (Fig. 4). In contrast, this increase in DRM associated pLAT was significantly less in T cells from elderly subjects. These findings are in agreement with those observed in the case of T-cells from aged mice [30,58] and may be part of the defects in downstream pathways of T-cell activation and the chronic inflammatory process associated with aging [24, 44-46,59].

CD45 relieves the self-inhibition of Lck by dephosphorylating a single tyrosine residue located in the C-terminal of the kinase [60]. The regulation of Lck activity may be provided by transient localization of CD45 in DRM or by sequestering these interacting proteins into distinct compartments [61]. However, most reports have concluded that CD45 is excluded from DRM in various experimental models [6]. Here, we found that CD45 was exclusively located in the heavy density sucrose fractions in resting and activated T-cells from young and elderly individuals, independently of the state of activation of the T-cells (Fig. 5). This lack of differences between the

two groups of donors suggest that CD45 may not play a major role in the defects in T-cell signalling that is observed with aging.

Defects in the transduction of mitogenic signals following TCR stimulation are attractive candidates to explain the decrease in IL-2 production that has been observed with aging. DRM are involved in several processes leading to T cell activation and IL-2 production via communication with the immunological synapse [62]. The bulk of our data reveal alterations in the properties of DRM with aging which include an increase in cholesterol content, impaired DRM coalescence and selective differences in the recruitment and activation of key proteins involved in T-cell signalling. This could affect the formation of the immune synapse which seems to be linked to lipid rafts coalescence [63]. These alterations could explain, in part, the downstream defects in T-cell signalling in aged humans. Further studies on the regulation of cholesterol metabolism in aged T-cells may help to understand these alterations and to better define the role of DRM in aging and age-related diseases [reviewed in 63]. Hence, studies in T-cell subsets taking into account the specific senescence markers (CD57, CD28, etc.) will help to determine whether their responsiveness is selectively affected in aged humans. Current investigations are addressing these questions in our laboratories.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Leonid Volkov for his assistance with the LSCM experiments. This work was supported by a grant-in-aid from the National Science and Engineering Research Council of Canada, the Research Center on Aging of Sherbrooke, the ImAginE consortium and the Canadian Institutes of Health Research.

REFERENCES

1. Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000) Dynamics of T lymphocyte responses: Intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290, 92-97.
2. Margulies, D.H. (1997) Interactions of TCRs with MHC-peptide complexes - A quantitative basis for mechanistic models. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 390-395.
3. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L. (1999) The immunological synapse: A molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
4. June, C.H., Fletcher, M.C., Ledbetter, J.A., Samelson, L.E. (1990) Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J. Immunol.* 144,1591-1599.
5. Guse, A.H. (1998) Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes. *Crit. Rev. Immunol.* 18, 419-448.
6. Sasaki, T., Sasaki-Irie, J., Penninger, J.M. (2001) New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Intern. J. Biochem. Cell Biol.* 11, 1041-1046.
7. Billadeau, D.D., Leibson, P.J. (2002) ITAMs versus ITIMs: Striking a balance during cell regulation. *J. Clin. Invest.* 109, 161-168.
8. Walk, S.F., March, M.E., Ravichandran, K.S. (1998) Roles of Lck, Syk and ZAP-70 tyrosine kinases in TCR-mediated phosphorylation of the adapter protein Shc. *Eur. J. Immunol.* 28, 2265-2275.
9. Bosselut, R., Zhang, W.G., Ashe, J.M., Kopacz, J.L., Samelson, L.E., Singer, A. (1999) Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J. Exp. Med.* 190, 1517-1526.

10. Kane, L.P., Lin, J., Weiss, A. (2000) Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 242-249.
11. Penninger, J.M., Crabtree, G.R. (1999) The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* 96, 9-12.
12. Wells, A.D., Gudmundsdottir, H., Turka, L.A. (1997) Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion - signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J. Clin. Invest.* 100, 3173-3183.
13. Frauwirth, K.A., Thompson, C.B. (2002) Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 109, 295-299.
14. Simons, K., Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
15. Wang, T.Y., Leventis, R., Silvius, J.R. (2000) Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: a model for molecular partitioning into "lipid rafts". *Biophys. J.* 79, 919-933.
16. Janes, P.W., Ley, S.C., Magee, A.I. (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell. Biol.* 147, 447-461.
17. Von Haller, P.D., Donohoe, S., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Watts, J.D. (2001) Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics* 1, 1010-1021.
18. Bini, L., Pacini, S., Liberatore, S., Valensin, S., Pellegrini, M., Raggiaschi, R., Pallini, V., Baldari, C.T. (2003) Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T cell antigen receptor triggering. *Biochem. J.* 369, 301-309.

19. Alonso, M.A., Millan, J. (2001) The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes. *J. Cell Sci.* 114, 3957-3965.
20. Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M.J.B., Altman A. (2001) Antigen-induced translocation of PKC- θ to membrane rafts is required for T cell activation. *Nature Immunol.* 2, 556-563.
21. Drevot, P., Langlet, C., Guo, X.J., Bernard, A.M., Colard, O., Chauvin, J.P., Laserre, R., He, H.T. (2002) TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* 21, 1899-1909.
22. Marmor, M.D., Julius, M. (2001) Role of lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood* 98, 1489-1497.
23. Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., Lanzavecchia, A. (1999) T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283, 680-682.
24. Makinodan, T., Kay, M.M.B. (1980) Age influence on the immune system. *Adv. Immunol.* 29, 287-330.
25. Hirokawa, K., Utsuyama, M., Katura, Y., Sado, T. (1988) Influence of age on the proliferation and peripheralization of thymic T cells. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112, 13-21.
26. Wick, G., Grubeck-Loebenstien, B. (1997) The aging immune system: primary and secondary alterations of immune reactivity in the elderly. *Exp. Gerontol.* 32, 401-413.
27. Pawelec, G., Hirokawa, K., Fülöp Jr., T. (2001) Altered T cell signalling in ageing. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1613-1637.
28. Boucher, N., Dufeu-Duchesne, T., Vicaut, E., Farge, D., Effros, R.B., Schächter, F. (1998) CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Exp. Gerontol.* 33, 267-282.

29. Fülöp Jr., T., Gagné, D., Goulet, A.C., Desgeorges, S., Lacombe, G., Arcand, M., Dupuis, G. (1999) Age-related impairment of p56lck and ZAP-70 activities in human T lymphocytes activated through the TcR/CD3 complex. *Exp. Gerontol.* 34, 197-216.
30. Tamir, A., Eisenbraun, M.D., Garcia, G.G., Miller, R.A. (2000) Age-dependent alterations in the assembly of signal transduction complexes at the site of T cell/APC interaction. *J. Immunol.* 165, 1243-1251.
31. Miller, R.A., Garcia, G., Kirk, C.J., Witkowski, J.M. (1997) Early activation defects in T lymphocytes from aged mice. *Immunol. Rev.* 150, 79-90.
32. Fülöp Jr., T., Douziech, N., Goulet, A.C., Desgeorges, S., Linteau, A., Lacombe, G., Dupuis, G. (2001) Cyclodextrin modulation of T lymphocyte signal transduction with aging. *Mech. Ageing Dev.* 122, 1413-1430.
33. Douziech, N., Seres, L., Larbi, A., Szikszay, E., Roy, P.M., Arcand, M., Dupuis, G., Fülöp Jr., T. (2002) Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. *Exp. Gerontol.* 37, 369-387.
34. Kitani, K. (1999) Lateral mobility of proteins and lipids of cell surface membranes during aging: Do the data support "The membrane hypothesis of aging"? *Mech. Ageing Dev.* 107, 299-322.
35. Fülöp Jr., T., Douziech, N., Larbi, A., Dupuis, G. (2002) The role of lipid rafts in T lymphocyte signal transduction with aging. *Ann. NY Acad. Sci.* 973, 302-304.
36. Ligthart, G.H. (2001) The SENIEUR protocol after 16 years: the next step is to study the interaction of ageing and disease. *Mech. Ageing Dev.* 122, 136-140.
37. Katsanidis, E., Addis, P.B. (1999) Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 1137-1140.

38. Beck, R., Bertolino, S., Abbot, S.E., Aaronson, P.I., Smirnov, S.V. (1998) Modulation of arachidonic acid release and membrane fluidity by albumin in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Circ. Res.* 83, 923-931.
39. Gidwani, A., Holowka, D., Baird, B., 2001. Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells. *Biochemistry* 40, 12422-12429.
40. Holleran, B.J., Barbar, É., Payet, M.D., Dupuis, G. (2003) Differential recruitment of $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ integrins to lipid rafts in Jurkat T lymphocytes exposed to collagen type IV and fibronectin. *J. Leukoc. Biol.* 73, 243-252.
41. Simons, K., Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science* 290, 1721-1726.
42. Silvius, J.R. (2003) Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 174-183.
43. Whisler, R.L., Bagenstose, S.E., Newhouse, Y.G., Carle, K.W. (1997) Expression and catalytic activities of protein tyrosine kinases (PTK) Fyn and Lck in peripheral blood T cells from elderly humans stimulated through the T cell receptor (TcR)/CD3 complex. *Mech. Ageing Dev.* 98, 57-73.
44. Globerson, A., Effros, R.B. (2000) Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol. Today* 21, 515-521.
45. Ben-Yehuda, A., Weksler, M.E. (1992) Host resistance and the immune system. *Clin. Geriatr. Med.* 8, 701-711.
46. Ershler, W.B. (1993) The influence of an aging immune system on cancer incidence and progression. *J. Gerontol.* 48, B3-B7.

47. Incardona, J.P., Eaton, S. (2000) Cholesterol in signal transduction. *Cur. Opin. Cell Biol.* 12, 193-203.
48. Khelef, N., Soe, T.T., Quehenberger, O., Beatini, N., Tabas, I., Maxfield, F.R. (2000) Enrichment of acyl coenzyme A: cholesterol *O*-acyltransferase near trans-Golgi network and endocytic recycling compartment. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1769-1776.
49. Li, L., Pownall, H.J. (2000) Regulation of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) synthesis, degradation, and translocation by high-density lipoprotein (2) at a low concentration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2636-2642.
50. Khalil A., Jay-Gerin, J.P., Lacombe, G., Fülöp Jr., T. (1998) Increased susceptibility of HDL to oxidation with aging. *FEBS Letters* 435, 153-158.
51. Cossarizza A., Ortolani C., Paganelli R., Barbieri D., Monti D., Sansoni P., Fagiolo U., Castellani G., Bersani F., Londei M., Franceschi, C. (1996) CD45 isoforms expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mech. Ageing Dev.* 86, 173-195.
52. Brenchley, J.M., Karandikar, N.J., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hil, B.J., Crotty, L.E., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Migueles, S.A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D.C., Koup, R.A. (2003) Expression of CD57 defines senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* 101, 2711-2720.
53. Zs-Nagy, I., Kitani, K., Ohta, M., Zs-Nagy, V., Imahori, K. (1986) Age-dependent decrease of the lateral diffusion constant of proteins in the plasma membrane of hepatocytes as revealed by fluorescent recovery after photobleaching in tissue smears. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 5, 131-146.
54. Burack, W.R., Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Shaw, A.S. (2002) Quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J. Immunol.* 169, 2837-2841.

55. Miller, R.A. (2000) Effect of aging on T lymphocyte activation. *Vaccine* 18, 1654-1660.
56. Kabouridis, P.S. (2003) Selective interaction of LAT with the open-active form of Lck in lipid rafts reveals a new mechanism for the regulation of Lck in T cells. *Biochem. J.* 371, 907-915.
57. Harder, T., Kuhn, M. (2000) Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. *J. Cell Biol.* 151, 199-208.
58. Utsuyama, M., Wakikawa, A., Tamura, T., Nariuchi, H., Kirokawa, K. (1997) Impairment of signal transduction in T cells from old mice. *Mech. Ageing Dev.* 93, 131-144.
59. Franceschi, C., Bonafe, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 244-254.
60. D'Oro, U., Ashwell, J.D. (1999) Cutting edge: the CD45 tyrosine phosphatase is an inhibitor of Lck activity in thymocytes. *J. Immunol.* 162, 1879-1883.
61. Edmonds, S.D., Ostergaard, H.L. (2002) Dynamic association of CD45 with detergent-insoluble microdomains in T lymphocytes. *J. Immunol.* 169, 5036-5042.
62. Dustin, M.L. (2002) Membrane domains and the immunological synapse: keeping T cells resting and ready. *J. Clin. Invest.* 109, 155-160.
63. Simons, K., Ehehalt, R., (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597-603.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Membrane fluidity of T-cells and DRM derived from T-cells of young and elderly donors. (A) T cells (5×10^5 lymphocytes) were labelled with the fluorescent probe DPH. Fluorescence was measured by excitation at 360 nm and emission at 430 nm through a polarizer. The star (*) indicates significant differences ($p < 0.05$, $n = 5$) between the fluidity (f) of T-cells from young (filled columns) and elderly (empty columns). (B) Similar analysis performed using DRM isolated from 20×10^6 T-cells. The star (*) indicates significant differences ($p < 0.05$, $n = 4$) between DRM from T-cells of young (filled columns) and elderly (empty columns) donors.

Figure 2. LSCM analysis of the distribution of GM1-associated fluorescence in T-cells from young and elderly subjects. T lymphocytes were labelled with an Alexa 594-CTxB conjugate and exposed to coverslips coated with poly-L-lysine (poly K) or additionally, with an anti-CD3 mAb or a mixture of anti-CD3 and anti-CD28 mAb. The cells were maintained at 37°C, in PBS. The black rectangles shown under each figure correspond to a scale of 2 μm . The palette of pseudocolor intensities is indicated on the figure, on a scale of 0 to 32 arbitrary units. Pixel intensities were recorded in 0.2 μm -thick sections along the z -axis corresponding to contact of the cell with the coverslip. Representations in pseudocolors of pixel intensities recorded in the case of a T-cell from a young (A) and an elderly (D) individual in contact with a poly K-coated coverslip. The next series of images are representations in pseudocolors of pixel intensities recorded in the case of a T-cell from a young (B) and an elderly (E) individual in contact for 5 min with a poly K- and anti-CD3-coated coverslip. The intensities of pixel intensities in pseudocolors in the case of a T-cell from a young (C) and an elderly (F) individual in contact with a coverslip that had been coated with a mixture of poly K, anti-CD3 and anti-CD28 mAb. The graph shown in (G) corresponds to

pixel intensities integrated over the surface for young (filled columns) and elderly donors (empty columns). Data are shown as mean \pm SD (indicated by the error bars). The asterisks (*) indicate significant differences between the two groups ($p < 0.05$). Data are representative of 5 donors.

Figure 3. Distribution of Lck and pLck in DRM of T-cells of young and elderly subjects. A T-cell (20×10^6 lymphocytes) lysate was separated on a sucrose density gradient. Fractions corresponding to DRM (fractions 1 to 3) were collected from the top of the gradient, pooled and analyzed by Western blotting. (A) Results showing the distribution of Lck in pooled-DRM fractions of resting (unstimulated) and stimulated (α CD3/ α CD28, 5 min treatment) T-cells obtained from young and elderly donors. (B) Corresponding densitometric results of Western blots of Lck in DRM of resting and activated T-cells from young (Y, filled columns) and elderly (E, empty columns) donors. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 4$). (C) Distribution of pLck in pooled-DRM fractions in the case of resting (unstimulated) and stimulated (α CD3/ α CD28, 5 min treatment) T-cells from young and elderly donors. (D) Corresponding densitometric results of Western blots of pLck in DRM of resting (unstimulated) and activated (α CD3/ α CD28) T-cells from (Y, filled columns) and elderly (E, empty columns) donors. Data are shown as the the mean \pm SD ($n = 6$). Statistical significance between the two groups is indicated, * ($p < 0.01$), ** ($p < 0.001$). The alpha (α) prefix means anti.

Figure 4. Distribution of LAT and pLAT in T-cells of young and elderly subjects. T-cell lysates (20×10^6 T-lymphocytes) were separated on a sucrose density gradient. Fractions corresponding to DRM (fractions 1 to 3) were collected from the top of the gradient and analyzed by Western blotting. (A) Distribution of LAT in DRM fractions of resting (unstimulated) and stimulated (α CD3/ α CD28) T-cells. (B) Corresponding densitometric analysis of the Western blots of LAT in DRM from resting and activated T-cells from young (Y, filled columns) and elderly donors (E,

empty columns). (C) Distribution of pLAT in DRM fractions in the case of resting (unstimulated) and activated (α CD3/ α CD28) T-cells for both groups of donors. (D) Corresponding densitometric analysis of the Western blots of pLAT in DRM from resting and activated T-cells from young (Y, filled columns) and elderly donors (E, empty columns). The graphs are representative of 4 independent experiments shown as the mean \pm SD. Statistical significance is indicated by a star (*, $p < 0.01$).

Figure 5. Distribution of CD45 in DRM of T-cells of young and elderly subjects. The cells were left untreated (*A* and *B*) or exposed (5 min) to a mixture of anti-CD3 (α CD3) and anti-CD28 (α CD28) mAb (*C* and *D*), lysed and the lysates were separated on a sucrose density gradient. Fractions 1 to 9 were recovered and CD45 (*A* to *D*) was revealed by Western blotting using the appropriate mAb. The blots shown are representative of 5 independent experiments

TABLE 1. Cholesterol concentration in T-cells and in DRM and non-DRM fractions derived from T-cells of young and elderly subjects

Fraction #	Cholesterol concentration (nM)*		
	Elderly	Young	Ratio (Elderly/Young)
1	58 ± 6	28 ± 3	2.1
2	80 ± 4	29 ± 1	2.8
3	69 ± 6	30 ± 5	2.3
4	62 ± 6	36 ± 4	1.7
5	68 ± 2	32 ± 6	2.1
6	68 ± 3	37 ± 6	1.9
7	62 ± 1	40 ± 3	1.6
8	69 ± 1	53 ± 6	1.3
9	68 ± 8	46 ± 6	1.5
Total T-cell lysate	764 ± 64	432 ± 39	1.8

The cholesterol concentrations of unfractionated T-cell (20×10^6 lymphocytes) lysates and corresponding lysates fractionated on sucrose gradients were determined by HPLC. Data indicate the average \pm SD of triplicates and are representative of three independent experiments.

*The concentrations of cholesterol between young and elderly individuals significantly differed ($p < 0.05$) for whole T cell lysates and for DRM and non-DRM fractions.

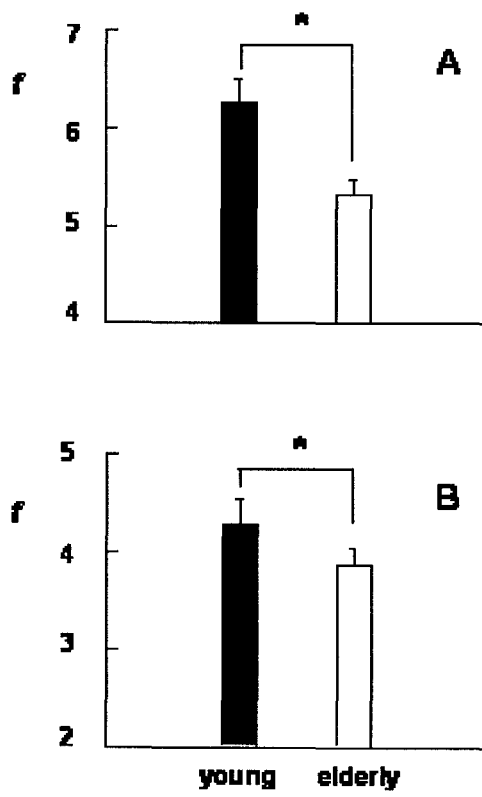


FIGURE 1

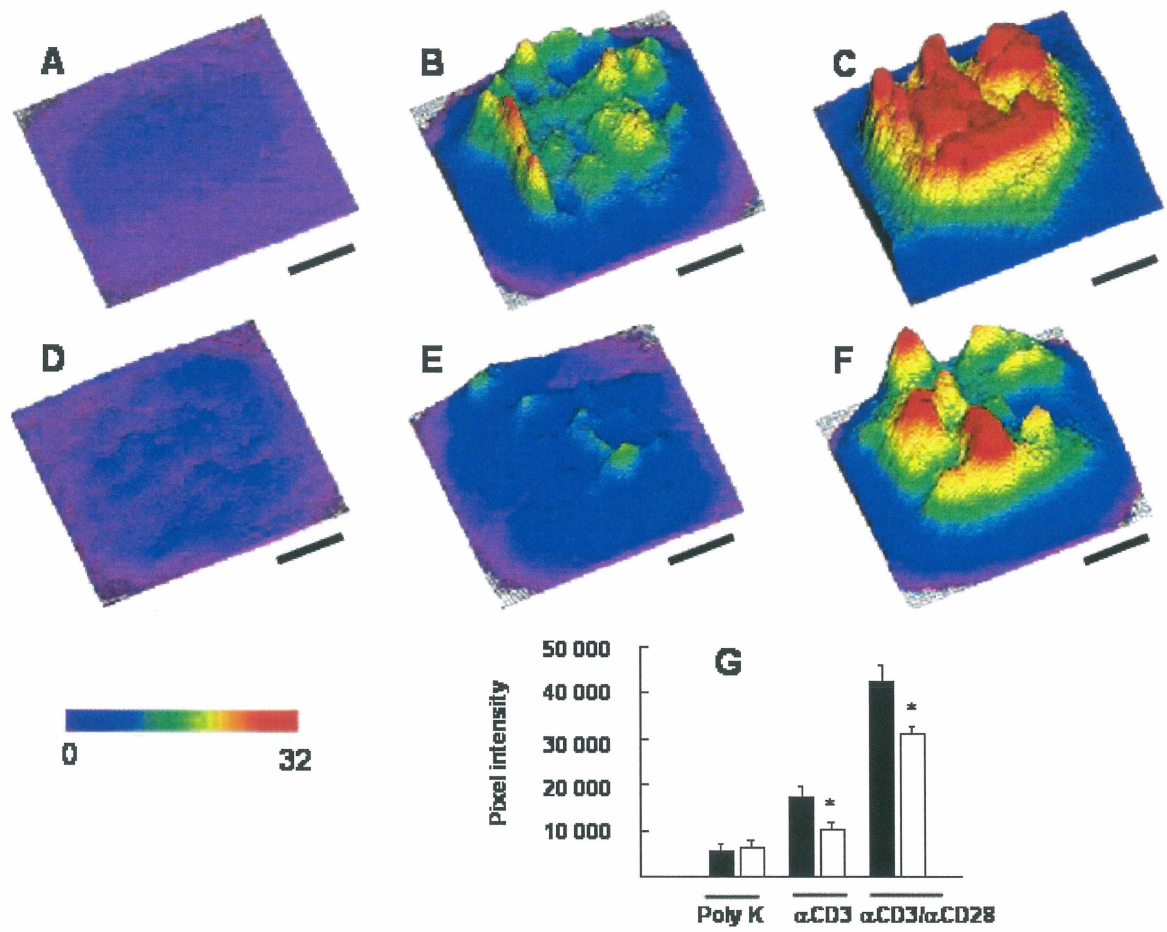


FIGURE 2

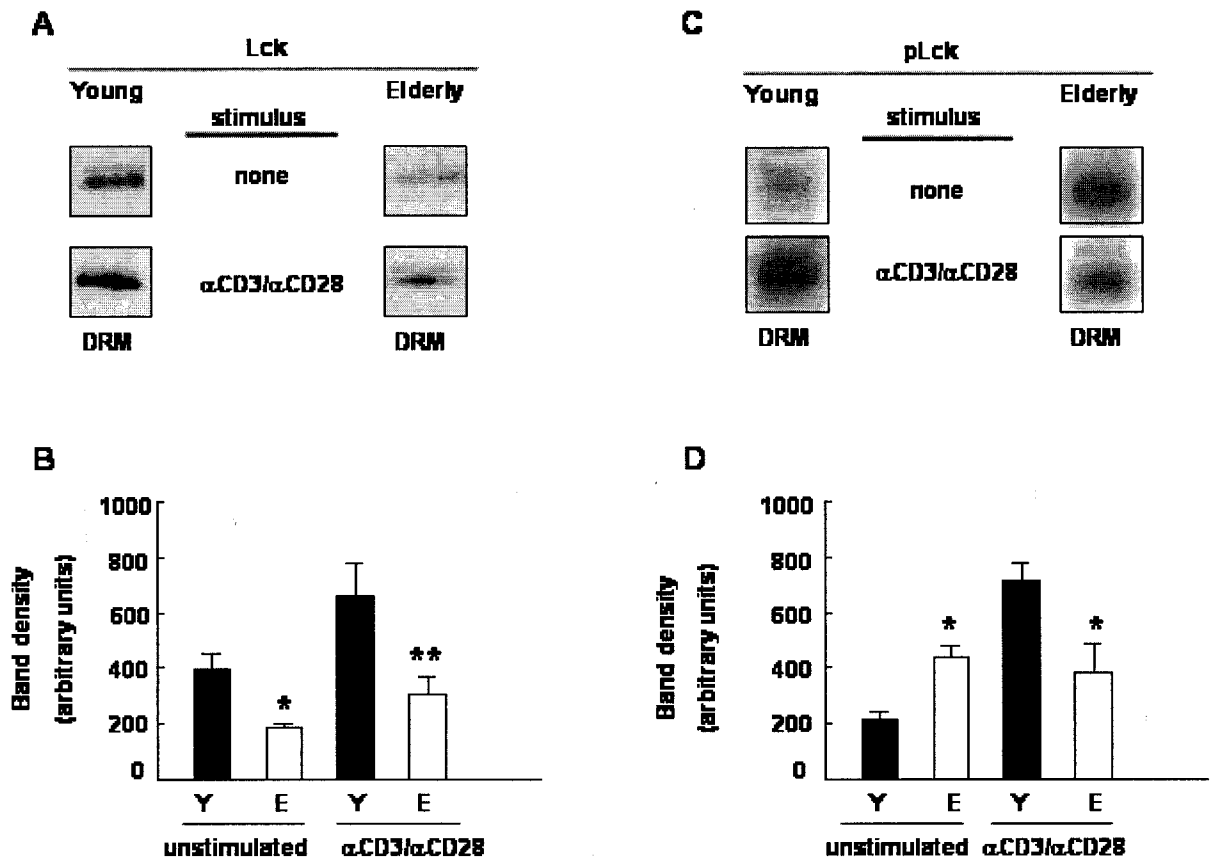


FIGURE 3

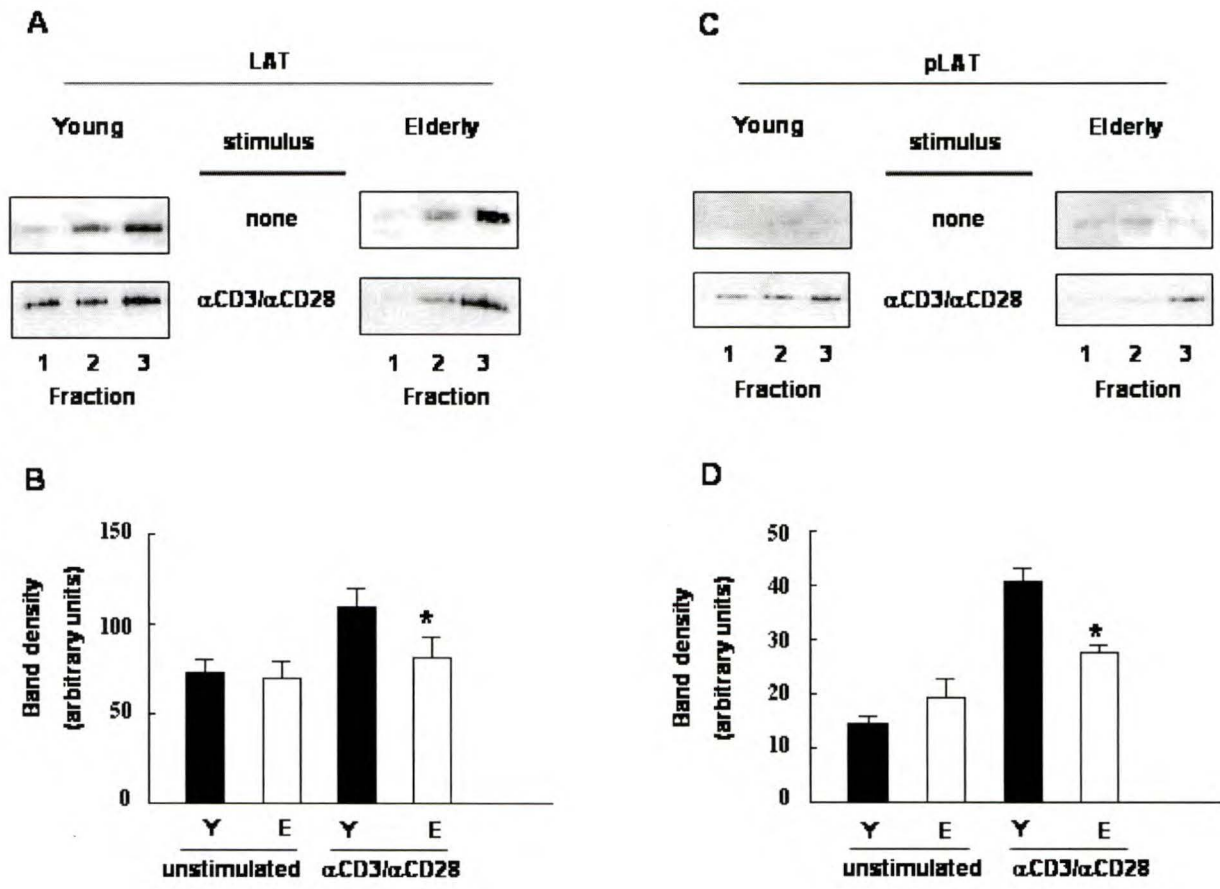


FIGURE 4

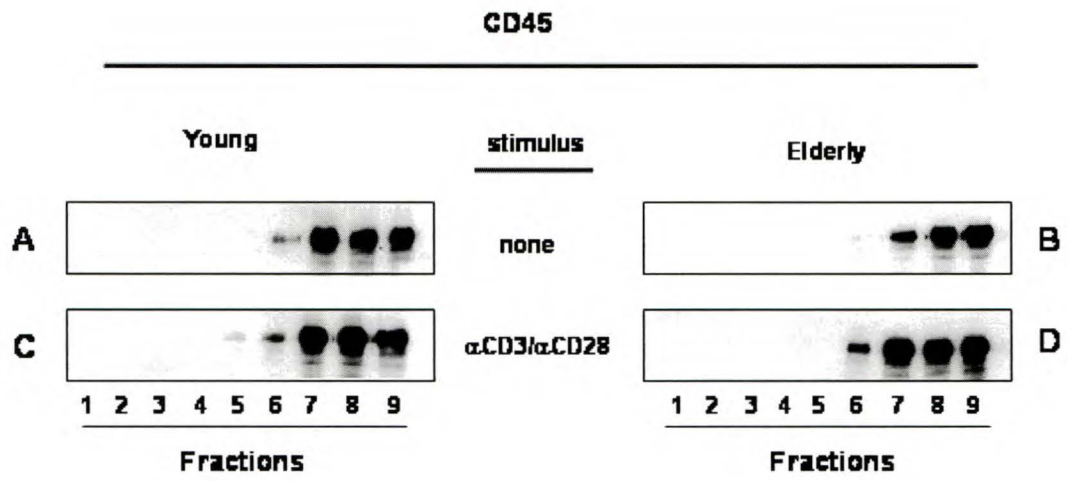


FIGURE 5

MANUSCRIT III

Larbi A., Douziech N., Khalil A., Dupuis G., Gheraïri S., Guérard K.-P., Fülöp T. Jr. (2004) Effects of Methyl- β -cyclodextrin on T lymphocytes lipid rafts with aging. *Experimental Gerontology*. 4:551-558.

Préambule

Ce manuscrit décrit la modulation du contenu en cholestérol des radeaux lipidiques en utilisant la MBCD. Cette modulation a pour but de restaurer les altérations démontrées dans le manuscrit précédent. Nous arrivons à rétablir la quantité de cholestérol membranaire identique à celle du jeune. Cependant, cette extraction du cholestérol déstabilise complètement le signalosome et il n'est pas possible de moduler l'activation lymphocytaire à la hausse en utilisant la MBCD, même à faible dose. La MBCD a d'autres effets, pas tous encore connus. Cette tentative de modulation a néanmoins fait réaliser que d'autres méthodes, plus physiologiques doivent être utilisées pour moduler le contenu en cholestérol des radeaux lipidiques. J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans ce manuscrit.

Effects of Methyl- β -cyclodextrin on T lymphocytes lipid rafts with aging.

Anis Larbi^{1,2}, Nadine Douziech¹, Abdelouahed Khalil^{1,4}, Gilles Dupuis^{2,3}, Saber Gheraïri¹, Karl-Philippe Guérard¹, Tamàs Fülöp Jr^{1,2,4}.

¹Research Center on Aging, Sherbrooke Geriatric University Institute and, ²Graduate Program in Immunology, ³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine of Sherbrooke, ⁴Geriatric Service, University of Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4.

Address correspondence to Dr. Tamàs Fülöp Jr., Research Center on Aging, University of Sherbrooke, 1036 Belvedere St. South, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 4C4. FAX, (819) 821 3141; E-mail, tamas.fulop@usherbrooke.ca

Running Title: Cholesterol in lipid rafts with aging

Key words: T cell receptors / lipid rafts / aging / cholesterol / signalling / MBCD / membrane fluidity.

Footnotes

This work was supported by a grant-in-aid from the National Science and Engineering Research Council of Canada (No. 249549), Research Center of Aging of Sherbrooke, the ImAginE consortium and the Canadian Institute of Health Research.

Nonstandard abbreviations used: CTxB, cholera toxin B-subunit; LAT, linker of activated T cells; pLAT, tyrosine-phosphorylated LAT; PTK, protein tyrosine kinase; GM1, ganglioside M₁; MBCD, Methyl- β -cyclodextrin; DPH, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene; HMG Co-A reductase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A.

Abstract

Aging is associated with a decline in immune functions. Among them, T cell activation is altered at several points of the signalling cascade following TCR engagement. Recent findings suggest that lipid rafts act as a platform in the initiation of T-cell activation. We have previously demonstrated that cholesterol content in T cells increased with aging, especially in lipid rafts. Cholesterol which is a major component of lipid rafts serves to stabilize their structure. We hypothesized that restoring T cell cholesterol content and membrane fluidity would restore, at least in part, T cell function via lipid rafts. We measured the lipid rafts coalescence, the p56^{Lck} and LAT signalling molecules recruitment and activation, the cholesterol content and fluidity in T cell membrane after different MBCD treatments. Our results show that high concentration of MBCD (10 mM) completely disorganized the lipid rafts in T cell membranes of young and elderly donors, however T cells from elderly donors were less sensitive than T cells of young donors to low concentration of MBCD (0.5 mM). p56^{Lck} and LAT recruitment and activation were affected in T cells of both aged groups. MBCD treatment did not affect the cholesterol content and fluidity of T cell membranes of young donors, while the cholesterol content was decreased and fluidity increased in lipid rafts of elderly donors. These results suggested that cholesterol extraction by MBCD increased the fluidity and disrupted lipid rafts organization. The increase in cholesterol content in lipid rafts with aging and its decrease by biochemical extraction were able to affect early signalling molecules activation. Restoring cholesterol content and fluidity may have beneficial effects, however MBCD disorganized the membrane and this might not completely restore the T cell activation via lipid rafts with aging. Altogether these results suggest that defects in cholesterol cellular homeostasis may be part of T cell immunosenescence via lipid rafts dysfunction.

Introduction

T lymphocytes are key regulators of immune responses and become activated as a result of recognition of antigenic determinants by the TCR (Lanzavecchia and Sallusto, 2000). The early events of T cell activation take place in plasma membrane microdomains that are termed lipid rafts or detergent resistant membranes (Simons and Ikonen, 1997). These domains are composed primarily of high-melting sphingolipids packed with cholesterol that generate a liquid-ordered phase arrangement (Wang et al., 2000). Current evidence suggests that lipid rafts provide a platform for the recruitment of proteins involved in the formation of the initial steps of T-cell signaling (Janes et al., 1999). For instance, proteins involved in T-cell activation such as *src* PTK, LAT, PKC θ , Gads, and others are recruited to lipid rafts following TCR ligation (Drevot et al., 2002; Harder et al., 2000; Wells et al., 1997).

It is well accepted that with aging we assist to a decrease in the immune response which mainly affects T lymphocyte functions (Pawelec et al., 2001). One explanation for this decreased immune response with human aging could be some defects in the early events of the T-cell signalling cascade (Fulop et al., 1999; Pawelec et al., 2001). These defects include tyrosine phosphorylation of signalling proteins, calcium mobilization, activation of the MAPK and JNK pathways, translocation of NF-ATc to the nucleus, IL-2 production and T-cell proliferation. Current data support the notion that lipid rafts are essential for T cell activation (Bini et al., 2003) and IL-2 production (Marmor and Julius, 2001) and that ligation of CD28 is required to enhance the coalescence of lipid rafts (Viola et al., 1999). Furthermore, cholesterol is a critical factor involved in lipid rafts formation and function (Silvius, 2003). Recently, we have shown that the cholesterol content of T-cells is increased with aging and that may be linked to a decrease in plasma

membrane fluidity observed in human T cells (Douziech et al., 2002) which confirms those obtained earlier by others (Stulnig et al., 1995; Rivney et al., 1980). This high level of cholesterol might explain, in part, the defects in T cell activation via a decrease in lipid rafts function and recruitment. It has been also shown that cholesterol extraction with high concentration of MBCD (10 mM) induced a reduced association of LAT and Lck in lipid rafts of Jurkat T cells (Kabouridis et al., 2000), but also an increased activation of several signalling molecules including Ras-ERK MAPKinase, PKC- θ and LAT. Moreover, previous works in our laboratory showed that low concentration of MBCD (0.5 mM) decreased the proliferation of T cell from young donors, whereas it was slightly improved in T cells from elderly donors (Douziech et al., 2002). Recently, we have also shown that the lipid rafts composition and coalescence is altered with aging in T cells (Larbi et al., 2003).

As cholesterol excess seems to be an important problem for lipid rafts function with aging, the aim of our present work was to investigate whether lowering the cholesterol content in T cells from elderly donors with low concentration of MBCD would improve T cell signalling by increasing signalling molecule association and activation in lipid rafts. Our results show that, the cholesterol content of T-cell lipid rafts from elderly subjects was lowered to the same level that found in young donors. Consequently, we also measured the membrane fluidity which correlated the cholesterol extraction with an increase in membrane fluidity. The confocal microscopy revealed a disruption of lipid rafts organization all over the membrane with MBCD treatment (10 mM) in both age-groups. In contrast, MBCD at low concentration (0.5 mM) induced some degree of coalescence in membrane of T cells from elderly donors, while in T cells of young donors they are already disrupted. Finally, MBCD strongly and differentially affected p56^{Lck} recruitment, while it caused a complete dissociation of LAT from lipid rafts in both age-groups. Thus, by the use of low

concentration of MBCD although we can restore the cholesterol content and membrane fluidity in T cells with aging which may ultimately have beneficial effects at the cellular level by increasing some functions (Fulop et al., 2001), this could not be translated to an increased activation of several signalling pathways.

Materials and methods

Reagents and antibodies

RPMI 1640 culture medium was obtained from Gibco BRL (Gaithersburg, MD) whereas Ficoll 400 and Dextran T-500 were from Amersham Biosciences (Montreal, QC). Nitrocellulose Hybond membranes and the enhanced chemiluminescence kit were purchased from Amersham Biosciences. Reagents for SDS-PAGE were from Bio-Rad (Richmond, CA) and Fisher Scientific (Montreal, QC). The HPLC column used for cholesterol quantification was purchased from Agilent Technologies (Palo Alto, CA). Alexa 594-labeled CTxB was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Monoclonal antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-pLAT (Tyr 226) mAb was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Secondary antibodies were obtained from Chemicon International (Temecula, CA). MBCD and 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) were purchased from Sigma.

Subjects and T lymphocytes preparation

Twenty elderly volunteers aged 65 to 78 years (mean age, 73 years) participated in the study. All the subjects were in good health and satisfied the inclusion criteria of the SENIEUR protocol for immune investigations of human elderly subjects. The cohort of 20 young healthy subjects was aged 19 to 25 years (mean age, 22 years). Heparinized blood was obtained by venipuncture and diluted 2-fold with RPMI 1640 medium containing 2% FBS. Lymphocytes were isolated by

Ficoll–Hypaque density sedimentation (Fulop et al., 1999). T cell preparations used in the assays consisted of greater than 96% CD3-positive cells. Cell viability was greater than 95%.

T cell stimulation and isolation of lipid raft fractions on sucrose gradients

T lymphocytes (20×10^6) were kept at 37°C or pretreated with different concentrations of MBCD (from 0.1 mM to 10 mM) for 1 hour at 37°C, as already described (Douziech et al., 2002). After three washings in PBS, cells were exposed to a combination of anti-CD3 (5 µg/ml) and anti-CD28 (5 µg/ml) mAb for various periods of time or left unstimulated. The cells were lysed with 300 µl of Hepes-buffered saline (25 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 6.9) containing 0.5% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 10 mM PMSF and 200 mM orthovanadate. A final concentration of 42.5% sucrose was applied and the mixture was transferred to ultracentrifuge tubes. The lysate was overlaid with 1 ml of sucrose 35% (w/v) and 300 µl of sucrose 5%. Centrifugations were performed at 4°C for 16 h at 200,000 x g. Fractions of 200 µl were collected from the top of the gradient. Fractions 1 to 3 were GM1-positive (not shown) and corresponded to lipid rafts.

Western blotting

Equal volume (25 µl) of separated lipid rafts from sucrose gradients as well as control loading from total lysates were separated by SDS-PAGE (10% acrylamide gels) as already described (Fulop et al, 1999). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with a buffer containing 5% (w/v) dry skimmed milk, Tris-Buffered Saline (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.6) and 0.1% (v/v) Tween 20 for 1 hour at room temperature. Membranes were then incubated with primary antibody to either Lck (1:200), LAT (1:1000) overnight at 4°C. The membranes were washed with TBS-tween before incubation with HRP-linked secondary

antibody (1:1000) for 1 hour at room temperature. Membranes were washed and anti-sera were detected using chemiluminescence detection reagents.

Measurement of cell membrane fluidity

Cell membrane fluidity was measured using the fluorescent probe DPH dissolved in tetrahydrofuran (Beck et al., 1998). Cell suspension (5×10^5 per mL) was incubated in the presence of 2 μ M DPH for 30 minutes at 37°C, then washed and resuspended in buffered saline solution (BSS: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes and 10 mM glucose, pH 7.2). In the case of measurement of fluidity in lipid rafts, 100 μ l of the pooled fractions were diluted in 1 ml BSS and the lipid probe was incorporated as described for whole T cells. The fluorescence spectrophotometer is a HITACHI (F-4500) with an adapted polarizer). DPH was excited by vertically polarized light at 360 nm, and its emission intensities were detected at 430 nm through a polarizer orientated parallel and perpendicular to the direction of polarization of the excitation beam. Fluidity represents the inverse value of anisotropy and is expressed as $1/r$. Steady-state fluorescence anisotropy, r , was calculated as $(I_v - GI_p) / (I_v + 2GI_p)$ where I_v and I_p are the parallel and perpendicular polarized fluorescence intensities and G is the monochromator grating correction factor.

Quantification of cholesterol

Cholesterol concentrations were measured using a modified procedure as described by Katsanidis et al., 1999. Briefly, lipid rafts fractions were pooled and added to a mixture of chloroform/methanol (2:1) and vigorously mixed for 2 min. The tubes were centrifuged and the organic layer was collected and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). The chromatographic system consisted of a Shimadzu pump and a PDA detector (Shimadzu

Scientific Instruments, Guelph, ON). Fifty microliter samples were applied to a silica-packed column (Zorbax RX-SIL, 5 μm particle size, 4.6 x 250 mm). Effluents were monitored at a wavelength of 202 nm.

Confocal microscopy analysis

T cells (1×10^6 lymphocytes) in PBS were treated with Alexa 594-conjugated CTxB (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min at 4°C. The cells were washed and resuspended in the same medium. Circular glass coverslips (22-mm) were coated with poly-*L*-lysine (0.1 mg/ml) for 15 min at 37°C. The cells were allowed to adhere to the coverslips and fluorescence was recorded. The laser scanning confocal microscopy system was from Thermo Noran (Middleton, WI) and has been described in details (Holleran et al., 2003). Optical sections (0.2 μm -thick) were recorded. The CTxB-labeled cells were excited at 568 nm through a 10 μm pinhole aperture and the emitted fluorescence was measured through a long-pass filter (>590 nm) (Holleran et al. 2003; Larbi et al., 2003).

Results

Cholesterol concentration in T-cell lipid rafts

Cholesterol is an essential component of lipid membranes that serves to stabilize lipid rafts (Silvius, 2003). We have previously reported that the content of T-cell cholesterol increases with aging (Fulop et al., 2001). Different conditions were tested and a final concentration of 0.5 mM MBCD for 1h was used for cholesterol extraction from the membrane bilayer as already used in our earlier experiments (Douziech et al., 2002). Here we measured the cholesterol content by the high sensitive HPLC method, in pooled lipid rafts as well as in non-rafts. In Table 1, we showed that the treatment of T cells with 0.5 mM MBCD resulted in similar cholesterol content in lipid rafts of both age-groups. This signifies that this concentration of MBCD is able to decrease the

higher cholesterol level in lipid rafts of T cells from elderly subjects (from 8209 ± 494 to 4712 ± 454) which corresponds to the level of T cells from young subjects existing already at basal level (4536 ± 245). Thus, MBCD can normalize the cholesterol content in lipid rafts of T cells to the level of T cells of young subjects.

TABLE 1

We show also that the cholesterol content in non rafts-fractions follow the same trend than in lipid rafts and this confirms our previous findings (Fulop et al., 2001).

Modulation of membrane fluidity with MBCD

Membrane fluidity was measured by anisotropy using the fluorescent probe DPH (Gidwani et al., 2001). Lipid rafts fractions were pooled and fluidity was assessed for the different experimental conditions. First, at basal state, fluidity is lower in T cells whole membrane from elderly donors (Figure 1A), compared to T cells of young subjects which is consistent with previous works (Kitani, 1999). Similarly we show that fluidity is lower at the lipid rafts level in T cells from elderly donors (Figure 1B). This is in direct correlation with increased cholesterol level in these microdomains with aging. MBCD treatment (0.5 mM, 1 hour at 37°C) was applied on T cells and a significant increase of the fluidity is observed.

FIGURE 1

When T cell receptor was costimulated by CD28 receptor, fluidity decreased in lipid rafts of both age-groups due to an increase of signalling molecules and cholesterol in these domains (Fulop et al., 2001). When we pretreated these cells with increased concentrations of MBCD (from 0.1 to 2 mM) and stimulated them, we observed an increase in fluidity due to selective cholesterol extraction, however this occurred to a much less extent with aging. Moreover, we observed that cholesterol extraction with 0.5 mM of MBCD restored lipid rafts fluidity of activated T cell from elderly donors to the same level as in activated T cells from young donors. However, with the same treatment we increased lipid rafts fluidity of activated T cells from young donors to the same level than that of untreated and inactivated T cells from the same age-group (Figure 1B). Thus, the treatment of T cells with identical MBCD concentrations had differential effects on membrane fluidity depending on the age of the donors.

Confocal microscopy analysis of T-cell lipid rafts

The GM₁ ganglioside is a useful marker of lipid rafts and fluorescent derivatives of CTxB can be used to study the distribution of lipid rafts in live cells by confocal microscopy (Holleran et al., 2003). We observed that lipid rafts organization is disrupted with low concentration of MBCD (0.5 mM) in the case of T cell from young donors, however, in T cells from elderly donors the disruption is much less pronounced (Figure 2, middle panel), with even a tendency for lipid rafts to be distributed more homogenously.

FIGURE 2

The high amount of cholesterol in T cells from elderly donors may explain the differential effects of MBCD treatment on T cells from the two age-groups. Further treatment with MBCD in high concentration (10 mM) led to lipid rafts disruption in both age-groups of donors (Figure 2, right panel).

Lipid rafts association of Lck and LAT modulated by MBCD

An altered activation of the TCR/CD3-associated Lck may contribute to the age-related defects of responsiveness of human T cells (Pawelec et al., 2001). When cells were pre-treated with 0.5 mM of MBCD and then activated with a combination of anti-CD3 and anti-CD28, Lck recruitment was severely affected in both age-groups, however this effect was more pronounced in the case of T cells from young donors (Figure 3A). Moreover, Lck activation in lipid rafts was found to be disrupted with MBCD treatment (data not shown). The role of Lck in the activation of several signalling pathways by short treatment (15 min) with MBCD (Kabouridis et al., 2001) is found here to be reduced when the stimulation is for a longer period (60 min).

FIGURE 3

The activation of T-cells induced an increase of LAT (Bi et al., 2001) and p-LAT in lipid rafts. In Figure 3 B, we show that aging is associated with a decline in the association of LAT to lipid rafts under stimulation. MBCD treatment led to a dramatic disruption of LAT association and activation in lipid rafts in both age-groups. Nevertheless, LAT and Lck remained activable in non-raft domains of both groups (data not shown) which is consistent with previous findings (Kabouridis et al., 2000).

Discussion

Cholesterol is a major and essential component of the plasma membrane as well as of lipid rafts contributing to the normal functioning of the cells. The cells regulate very tightly the efficient content of lipid rafts in the membrane. We have previously found that membranes of T-cells from elderly subjects contained almost twice as much cholesterol as T-cell membranes from young subjects (Fulop et al., 2001) confirming earlier findings (Stulnig et al., 1995). The explanation for this increased level of cholesterol in lipid rafts from normolipidemic elderly individuals is not known. It could be hypothesized that the cellular regulation of cholesterol metabolism may be altered with aging. This could involve abnormal regulation of cellular cholesterol storage and export, or both (Khelef et al., 2000). In addition, the efficiency of HDL-dependent cholesterol transport could be altered since these lipoproteins are more susceptible to oxidation with aging (Khalil et al., 1998).

Aging is known to be associated with a decrease in the fluidity of the T-cell plasma membrane (Makinodan and Kay, 1980; Fraeyman et al., 1993). We have recently shown that there is a decline in Lck and LAT association in lipid rafts of activated T cells with aging that may be explained by the excess of cholesterol in the plasma membrane. Plasma membrane integrity and fluidity is essential for T-cell stimulation (Douziech et al., 2002), and the age-related diminished fluidity has been shown to correlate with a decline in the levels of tyrosine-phosphorylated proteins following the activation of T-cells from aged humans (Fulop et al., 1999). This alteration in membrane properties could affect the lateral mobility of lipid rafts as a result of the high levels of plasma membrane cholesterol (Fulop et al., 2001). In the present study, we modulated T cell membrane lipid rafts cholesterol content and measured fluidity in lipid rafts after cholesterol extraction by

MBCD. It is of note that fluidity is a complex parameter which represents the amount of lipids including cholesterol and also molecules such as signalling molecules.

The MBCD concentration (0.5 mM) which was found to lower cholesterol content and to restore membrane fluidity in T cells with aging was in contrast found to disrupt the organization of the T cell membrane of young subjects. Our previous studies (Douziech et al., 2002) demonstrated that cholesterol extraction by MBCD decreased T cell proliferation of young donors, while it increased the proliferation of T cells from elderly donors. These functional alterations in T cells of young subject are occurring besides the fact that at this concentration of MBCD the cholesterol content did not change. It is of note that at this concentration (Fulop et al., 2001), MBCD could not extract cholesterol from the membrane, but was able to disrupt lipid rafts. The cholesterol extracting effect was observed at much higher concentrations (Kabouridis et al., 2000). Confocal microscopy studies shown here are consistent with those findings since lipid rafts organization in T cells from elderly subjects is not altered with 0.5 mM MBCD as it is in T cells from young donors where a severe lipid rafts disruption is observed. These experiments even suggested that the MBCD treatment induced to some extent a more homogenous lipid raft distribution with aging compared to the untreated state. Hence, our results indicate that MBCD at low concentration is able to restore the cholesterol content in lipid rafts of T cells from elderly to the same level than in T cells of young subjects. This decrease correlates with the restoration of membrane fluidity leading to better lipid rafts membrane distribution.

Next, we studied whether these physical and biochemical changes observed in T cells with MBCD treatment could influence the recruitment and activation of the signalling molecules, Lck and LAT. MBCD treatments have been shown to modulate signalling molecules activation (Kabouridis et al., 2000) and we have already observed a potential benefit effect of cholesterol lowering towards T

cell proliferation with aging (Douziech et al., 2002). We hypothesized that by this way, we could have beneficial effects at the cellular level by increasing the activation of several pathways. However, lipid rafts are strictly regulated domains that may be targeted by other pathways than cholesterol extraction. Our data show that signalling molecules recruitment and activation in lipid rafts are altered by cholesterol extraction under treatment with low concentration of MBCD. However, Lck and LAT recruitment are similarly decreased by the disruption of lipid rafts in T cells of young subjects. In contrast, Lck and LAT recruitment is differentially affected in T cells of elderly subjects indicating a possible differential physical association with aging for these two signaling molecules. Kabouridis et al. showed that MBCD (10 mM) transiently induced tyrosine phosphorylation of multiple proteins at the cellular level, including LAT. Here we show that the activations do not localize to lipid rafts, but instead to non-rafts domains. The explanation for our findings may be due to the MBCD concentration used and also, to the time period used for cholesterol extraction which differed from their experimental conditions. We used MBCD longer than the 15 minutes cholesterol extraction to avoid the activation of any pathway by MBCD. Thus, MBCD even at low concentrations, alters LAT and Lck association to the membrane and furthermore, their association to membrane microdomains. Our data altogether suggest that even with the lowering of cholesterol level manifested by increased fluidity by low concentration of MBCD treatment, in the mean time the overall protein structure of the lipid rafts is disrupted and this could not be translated into efficacious signal transduction in T cells of elderly individuals.

Lipid rafts are critical in the early events of T cell activation, MBCD affected essentially lipid rafts structure since signalling molecules remained in the other domains. Restoring membrane fluidity in this case, may not correlate with the restoration of a well-defined membrane organization and this may account for the defects observed here. MBCD should not be used to modulate T cell

function without serious consequences on membrane functions and organization (Ikonen, 2001) since rafts associated and recruited proteins are also affected by cholesterol extraction by MBCD. The pathways of cellular cholesterol homeostasis (Fielding and Fielding, 2001) should be investigated for their ability to restore physiological cholesterol content in T cell membrane without the disruptive side effects on signalling molecules in lipid rafts. The statins, which are involved in cholesterol homeostasis that target the enzyme HMG CoA reductase may have beneficial effects (Gubina et al., 2002). Further studies on the regulation of cholesterol metabolism in aged T-cells may help to understand these alterations and to better define the role of lipid rafts in aging and age-related diseases (Simons and Ehehalt, 2002). Current investigations in our laboratory are addressing these questions.

References

- Beck, R., Bertolino, S., Abott, S.E., Aaronson, P.I., Smirnov, S.V., 1998. Modulation of arachidonic acid release and membrane fluidity by albumin in vascular smooth muscle and endothelial cells. *Circ. Research*. 83, pp. 923-931.
- Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M.J.B., Altman A., 2001. Antigen-induced translocation of PKC- θ to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, pp. 556-563.
- Bini, L., Pacini, S., Liberatori, S., Valensin, S., Pellegrini, M., Raggiaschi, R., Pallini, V., and Baldari, C.T., 2003. Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *Biochem. J.* 369, pp. 301-309.
- Douziech, N., Seres, I., Larbi, A., Szikszay, E., Roy, P.M., Arcand, M., Dupuis, G., and Fülöp, T.Jr., 2002. Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. *Exp. Gerontol.* 37, pp. 369-387.
- Drevot, P., Langlet, C., Guo, X.J., Bernard, A. M., Colard, O., Chauvin, J.P., Lasserre, R., and He, H.T., 2002. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J.* 21, pp. 1899-1908.
- Fielding, C.J., Fielding, P.E., 2001. Cellular cholesterol efflux. *Bioch. Bioph. Acta.* 1533, pp. 175-189.
- Fraeyman, N., Vanscheeuwijck, P., De Wolf, M., and Quatacker, J., 1993. Influence of aging on fluidity and coupling between beta-receptors and G-proteins in rat lung membranes. *Life Sci.* 53, pp. 153-160.
- Fülöp, T.Jr., Douziech, N., Goulet, A.C., Desgeorges, S., Linteau, A., Lacombe, G., and Dupuis, G., 2001. Cyclodextrin modulation of T lymphocyte signal transduction with aging. *Mech. Ageing*

Dev. 122, pp. 1413-1430.

Fülöp, T.Jr., Douziech, N., Larbi, A., and Dupuis, G., 2002. The role of lipid rafts in T lymphocyte signal transduction with aging. *Ann. NY Acad. Sci.* 973, pp. 302-304.

Fülöp, T.Jr., Gagné, D., Goulet, A.C., Desgeorges, S., Lacombe, G., Arcand, M., and Dupuis, G., 1999. Age-related impairment of p56lck and ZAP-70 activities in human T lymphocytes activated through the TcR/CD3 complex. *Exp. Gerontol.* 34, pp. 197-216.

Gidwani, A., Holowka, D., Baird, B., 2001. Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells. *Biochem.* 40, pp. 12422-12429.

Gubina, E., Chen, T., Zhang, L., Lizzio, E.F., Kozlowski, S., 2002. CD43 polarization in unprimed T cells can be dissociated from rafts coalescence by inhibition of HMG CoA reductase. *Blood* 99, pp. 2518-2525.

Harder, T., and Kuhn, M., 2000. Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. *J. Cell Biol.* 151, pp. 199-208.

Holleran, B.J., Barbar, É., Payet, M.D., Dupuis, G., 2003. Differential recruitment of $\alpha_2\beta_1$ and $\alpha_4\beta_1$ integrins to lipid rafts in Jurkat T lymphocytes exposed to collagen type IV and fibronectin. *J. Leukoc. Biol.* 73, pp. 243-252.

Ikonen, E., 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, pp. 470-477.

Janes, P.W., Ley, S.C., Magee, A.I., 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147, pp. 447-461.

Kabouridis, P.S., Janzen, J., Magee, A.L., Ley, S.C., 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 30, pp. 954-963.

- Katsanidis, E., and Addis, P.B., 1999. Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Radic. Biol. Med.* 27, pp.1137-1140.
- Khalil, A., Jay-Gerin, J.P., and Fülöp, T.Jr., 1998. Age-related increased susceptibility of high-density lipoproteins (HDL) to in vitro oxidation induced by gamma-radiolysis of water. *FEBS Lett.* 435, pp. 153-158.
- Khelef, N., Soe, T.T., Quehenberger, O., Beatini, N., Tabas, I., Maxfield, F.R., 2000. Enrichment of acyl coenzyme A: cholesterol O-acyltransferase near trans-Golgi network and endocytic recycling compartment. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, pp. 1769-1776.
- Kitani, K., 1999. Lateral mobility of proteins and lipids of cell surface membranes during aging: do the data support 'The Membrane Hypothesis of Aging'? *Mech. Ageing Dev.* 107, pp. 299-322.
- Lanzavecchia, A., and Sallusto, F., 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: Intermediates, effectors, and memory Cells. *Science* 290, pp. 92-97.
- Makinodan, T., and Kay, M.M., 1980. Age influence on the immune system. *Adv. Immunol.* 29, pp. 287-330.
- Marmor, M.D., Julius, M., 2001. Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood* 98, pp. 1489-1497.
- Pawelec, G., Hirokawa, K., and Fülöp, T. Jr., 2001. Altered T cell signalling in ageing. *Mech. Ageing Dev.* 122, pp. 1613-1637.
- Rivney, B., Bergman S., Shinitzky, M., Globerson, A. 1980. Correlation between membrane viscosity, serum cholesterol, lymphocyte activation and aging in men. *Mech. Age. Dev.* 12, pp 119-126.
- Silvius, J.R., 2003. Role of cholesterol in lipid raft formation : lessons from lipid model systems. *Bioch. Bioph. Acta.* 78431, pp. 1-10.

- Simons, K., Ehehalt, R., 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, pp. 597-603.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387, pp. 569-572.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., Lanzavecchia, A., 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283, pp. 680-682.
- Stulnig, T.M., Buhler, E., Beck, G., Kirchebner, G., Cshonitzer, D., Wick, G. 1995 Altered switch in lipid composition during T cell blast transformation in the healthy elderly. *J. Gerontol.* 50, pp.B383-390.
- Wells, A.D., Gudmundsdottir, H., Turka, L.A., 1997. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J. Clin. Invest.* 100, pp. 3173-3183.
- Wang, T.Y., Leventis, R., Silvius, J.R., 2000. Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: a model for molecular partitioning into "lipid rafts". *Biophys. J.* 79, pp. 919-933.

Legend to figures

Figure 1

Modulation of T cells and lipid rafts fluidity with MBCD. The values are expressed as $1/r$ and represent the relative fluidity. (A) T cells were probed with the fluorescent DPH and washed three times and resuspended in the appropriated buffer. Anisotropy (r) was measured by fluorescence as described in *Materials and Methods*. The fluidity declines in T cells with aging. Data (mean and SD) represent results from 4 donors of each group where * indicates significative difference between the two groups ($p < 0.05$). (B) After their isolation, lipid rafts were probed with the fluorescence probe DPH. At basal state (1), fluidity in lipid rafts is lower in T cells from elderly donors compared to young donors. Membrane disorganization by MBCD treatment at 0.5 mM led to an increase of the fluidity in both groups of donors (2). Activation of the cells induced protein recruitment which is reflected by a decline in the fluidity of lipid rafts (3). Treatment with MBCD (from 0.1 to 2 mM) led to an increase of the fluidity in a concentration-dependant manner (4-6). Data (mean \pm SD) were obtained from samples of 3 different donors of each group where * indicate significant differences between the groups.

Figure 2

Confocal microscopy analysis of lipid rafts organization in T cell membrane. Separated T cells were stained with cholera toxin B subunit coupled to Alexa 564 which target ganglioside M1, a specific marker of lipid rafts. The membrane organization was analyzed on T cells which were left untreated (left panel) or treated with 0.5 mM MBCD (middle panel) or 10 mM MBCD (right panel). Cells were then washed three times and left in the same medium. Then, they were allowed

to adhere to coverslips coated with poly-L-lysine. Images shown represent fluorescence according to a palette of 255 colors. GM1-associated domains are distributed through the membrane. When MBCD treatment was applied, a severe disorganization of lipid rafts was observed at 0.5 mM for T cells from young (Fig. 2A, middle panel) compared to elderly donors (Fig. 2B, middle panel) when lipid rafts even showed a slight coalescence. An increase in the concentration of MBCD (10 mM) led to a complete disorganization of lipid rafts through the membrane in both groups (right panel). Images shown are representative of 5 independent experiments.

Figure 3

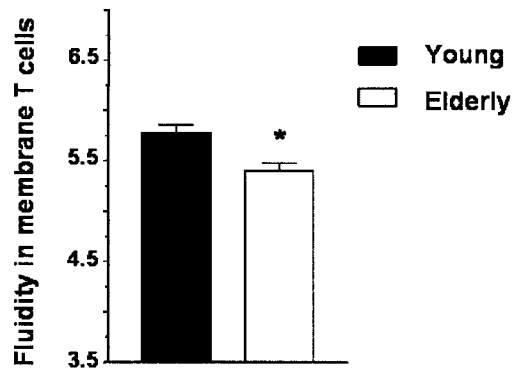
Effects of MBCD on signalling molecule recruitment and activation to lipid rafts. Lck and LAT were assessed for their localization in lipid rafts after treatment with 0.5 mM MBCD and upon activation. (A) Lipid rafts content (fractions 1 to 3) was analyzed by western blotting experiments using anti-Lck Abs (1:200). The amount of Lck in whole cells lysates represented by (T) did not change with aging. The blots shown here are representative of 5 independent experiments with young (left) and elderly donors (right). Identical studies were done concerning LAT (anti-LAT, 1:1000) as shown in (B). Cholesterol extraction by treatment with 0.5 mM MBCD (represented by T) caused complete dissociation of LAT from lipid rafts in both groups compared to untreated T cells (NT). When cells were stimulated (represented by S), an increase of lipid rafts-associated LAT is observed in the case on young donors, however this is not observed in the case on T cells from elderly donors. Lowering membrane fluidity did not allow an increase in lipid rafts-associated LAT upon stimulation of T cells from elderly donors (T/S). The blots presented here are representative for 3 donors of each group.

MBCD	Young subjects		Elderly subjects	
	-	+	-	+
Lipid rafts (fractions 1-3)	4536 ± 245	5185 ± 546	8209 ± 494*	4712 ± 454#
Non-rafts (fractions 6-9)	4499 ± 351	5137 ± 329	7696 ± 521*	4367 ± 527#

Lymphocytes were left untreated or treated with 0.5 mM MBCD for 1h at 37°C. Values represent the relative cholesterol concentrations determined by HPLC in membrane domains derived from 20×10^6 T lymphocytes isolated by sucrose gradient centrifugation. Data indicate the mean \pm SD of three independent experiments made in triplicates. * indicates a significant difference between the samples from elderly donors compared to the sample of T cells from young donors without any treatment (Student's test, $p < 0.01$). # shows significant difference between the cholesterol content values of elderly subjects before and after treatment ($p < 0.05$).

Table 1. Cholesterol content in lipid rafts from T-cells treated with 0.5 mM MBCD

A



B

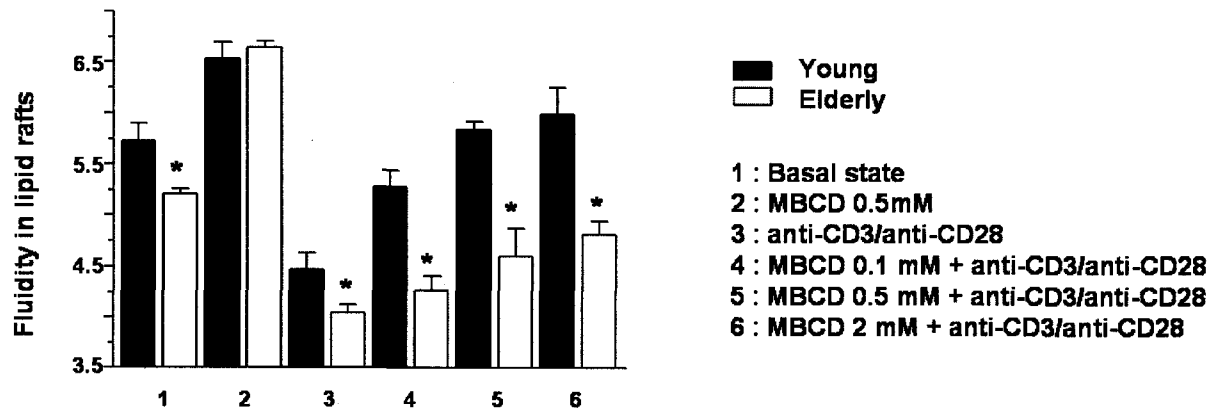
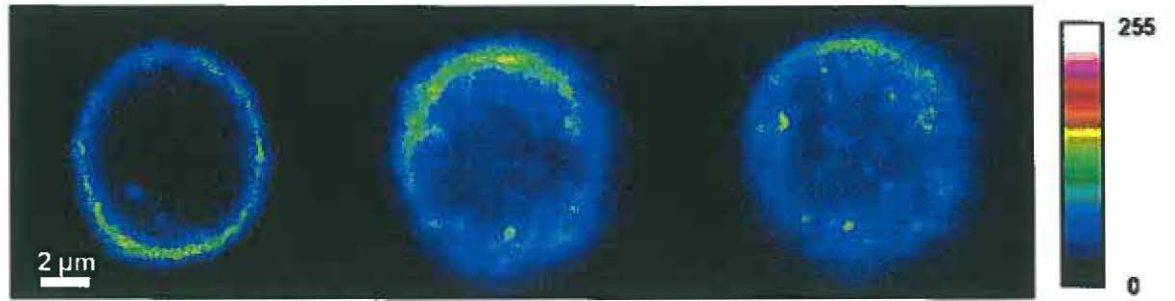


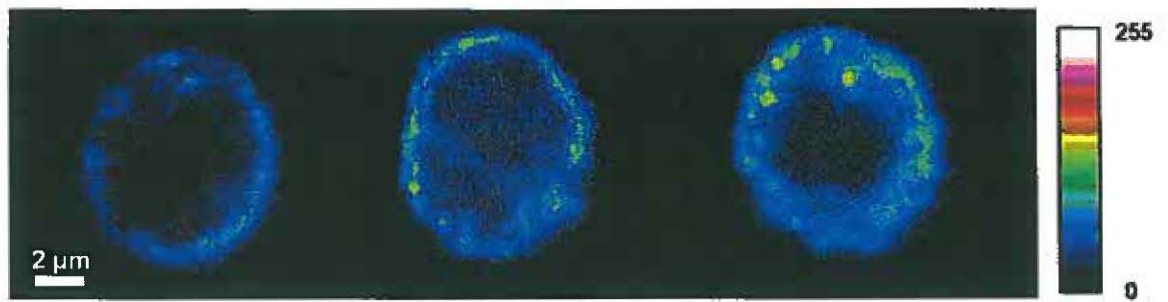
FIGURE 1

A



Young 0 MBCD 0.5 mM MBCD 10 mM

B



Elderly 0 MBCD 0.5 mM MBCD 10 mM

FIGURE 2

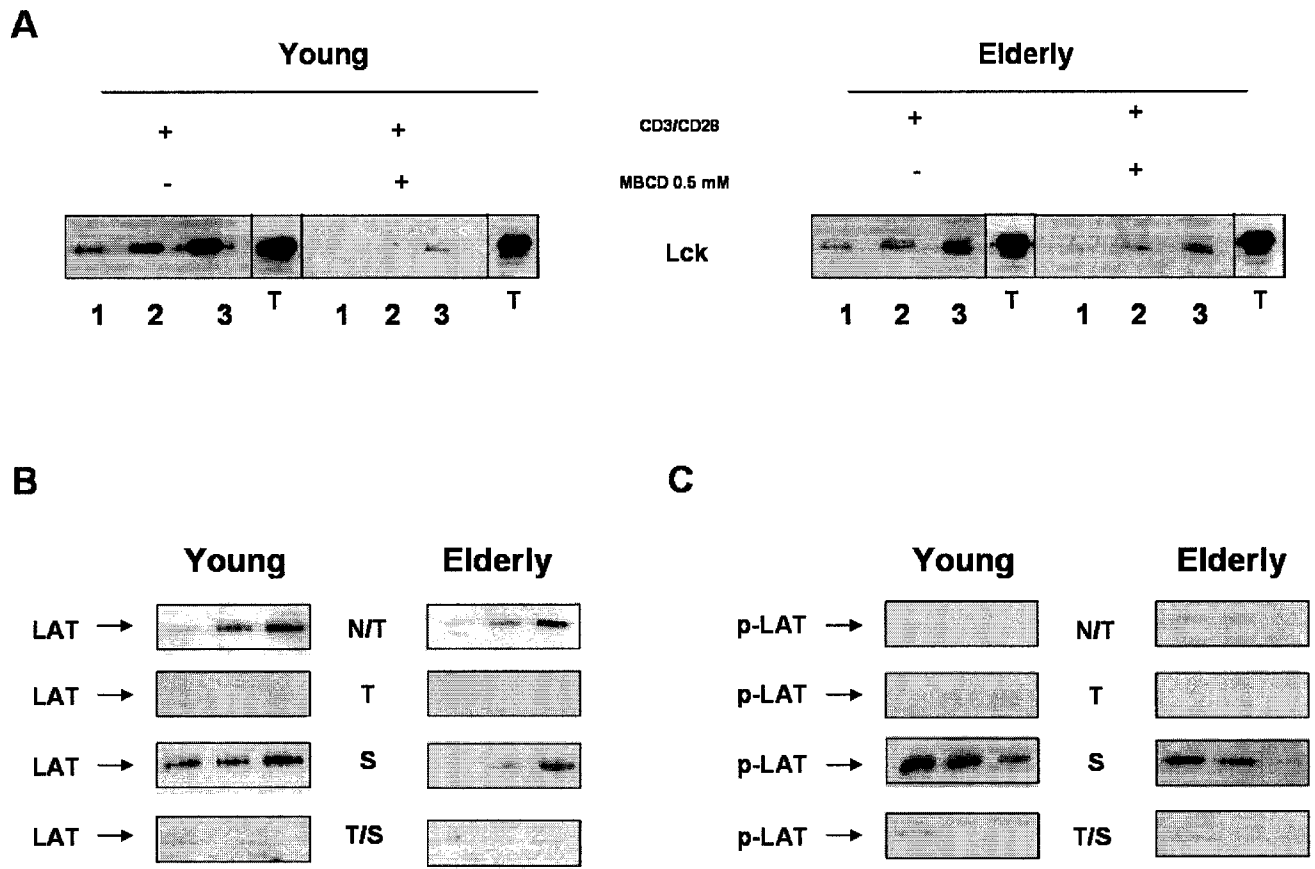


FIGURE 3

MANUSCRIT IV

Larbi A, Dupuis G, Khalil A, Douziech N, Fortin C, Fülöp T. Jr. Differential Role of lipid rafts in the age-related decrease of CD4⁺ and CD8⁺ human T-lymphocytes functions. *Journal of Biological Chemistry*. Version corrigée soumise.

Préambule

Ce manuscrit décrit le mode de signalisation des lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺. Nous démontrons ici que les lymphocytes CD4⁺ dépendent complètement des radeaux lipidiques pour être activés alors que les lymphocytes CD8⁺ ne nécessitent pas la polarisation des radeaux lipidiques pour être activés. Nous montrons que ces différences expliquent pourquoi ce sont les cellules CD4⁺ qui sont le plus affectées par l'immunosénescence. Nous montrons aussi le rôle du CD28 dans l'immunosénescence de part son rôle dans l'activation lymphocytaire via les radeaux lipidiques. J'ai réalisé toutes les expériences décrites dans ce manuscrit.

**DIFFERENTIAL ROLE OF LIPID RAFTS IN THE FUNCTIONS OF CD4⁺
AND CD8⁺ HUMAN T-LYMPHOCYTES WITH AGING**

**Anis Larbi^{*,†}, Gilles Dupuis[†], Abdelouahed Khalil^{*,§}, Nadine Douziech^{*}, Carl Fortin^{*,†},
Tamas Fülöp Jr^{*,†,§}**

***Research Center on Aging, Sherbrooke Geriatric University Institute, †Graduate Program
in Immunology, Clinical Research Center, Faculty of Medicine, and §Department of
Medicine, Geriatric Division, University of Sherbrooke, J1H 4C4, Sherbrooke, Qc, Canada**

Running title: Lipid rafts and age-related T-cell signaling

Address correspondence to: Dr. Tamas Fülöp Jr., Research Center on Aging, 1036 Belvedere
Street South, J1H 4C4, Sherbrooke, Quebec, CANADA. Fax: (819) 829-7141.

E-mail: tamas.fulop@usherbrooke.ca

Abstract

Lipid rafts are critical to assembly of the T-cell receptor (TCR) signaling machinery. It is not known whether lipid raft properties differ in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and whether there are age-related differences that may account in part for immune senescence. Data presented here showed that time-dependent interleukin-2 (IL-2) production was different between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. The defect in IL-2 production by CD4⁺ T-cells was not due to lower levels of expression of the TCR or CD28. There was a direct correlation between the activation of p56^{Lck} and LAT and their association/recruitment with the lipid raft fractions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. p56^{Lck}, LAT and Akt/PKB were weakly phosphorylated in lipid rafts of stimulated CD4⁺ T-cells of elderly as compared to young donors. Lipid rafts undergo changes in their lipids composition (ganglioside M1, cholesterol) in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of elderly individuals. This study emphasizes the differential role of lipid rafts in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell activation in aging and suggests that the differential localization of CD28 may explain disparities in response to stimulation in human aging.

Introduction

Antigenic recognition by the T-cell receptor (TCR) triggers a series of biochemical events that results in the expression of a range of genes that are essential to T-cell responses, expansion and effector functions (1). The activation of protein tyrosine kinases (PTK) of the *Src* and *Syk* families (2) and the mobilization of Ca^{2+} (3) are the earliest biochemical events that follow engagement of the TCR. The *Src* family member p56^{Lck} phosphorylates ZAP-70 which in turn phosphorylates the LAT (linker of activated T cells) adaptor protein which becomes a scaffold for the recruitment of multiple partners including other adaptor proteins and enzymes involved in phospholipid metabolism such as phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and phospholipase-C γ 1 (PLC- γ 1) (4-6).

A host of experimental data support the view that many proteins involved in T-cell signaling such as p56^{Lck} , LAT, SLP-76, protein kinase-C θ and Gads are recruited to microdomains called lipid rafts (7-10), whereas others such as CD45 are excluded (11) or transiently associated as in the case of CD4 (12). These microdomains are composed primarily of high-melting sphingolipids packed with cholesterol that generate a liquid-ordered phase (lo) arrangement (13).

Lipid rafts are dynamic structures and the time-dependent recruitment or exclusion of signaling proteins in lipid rafts controls T-cells activation and immune responses (14). In addition, ligation of co-stimulatory CD28 that is required for interleukin-2 production and commitment to proliferation (15) enhances lipid raft polarization (16,17). Thus, CD28 triggering is essential for sustained T-cell activation (15). Moreover, lipid rafts are dynamic structures whose composition and function may vary according to cell types and cell subsets, especially in the case of T-lymphocytes (18). Heterogeneity in lipid rafts composition and function may explain disparities in lymphocyte subset functions (19).

One characteristic of aging is that T-lymphocyte functions such as proliferation and IL-2 production are impaired (20,21). One hypothesis to explain this age-related immune senescence is impairment of signal delivery from the TCR (22). In this connection, we and other groups have reported defects in the early events of the T-cell signaling following TCR ligation in aged humans and rodents (23, 24). We have recently reported that lipid raft fluidity of CD3⁺ T-cells from healthy elderly donors was decreased, probably as a result of plasma membrane cholesterol overload (25). Moreover, we have also shown that p56^{Lck} association to lipid rafts declined with aging along with defects in lipid raft polarization, suggesting that lipid raft properties may undergo significant changes with aging (25).

Recently, several functional changes were found among T-cell subsets in aging. For example, the susceptibility to apoptosis was different among CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets (26). Very scarce data exist concerning the most important T-cell functions including IL-2 production and proliferation in relation to T-cell subsets (27). Furthermore, no data are available concerning CD4⁺ and CD8⁺ T-cell signalling/behaviour and lipid raft properties with human aging. However, recently de Mello Coelho et al (28) have demonstrated a heterogeneity of lipid raft components between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in young and aged mice. The differences that they observed in lipid raft composition could contribute to the differential CD4⁺ and CD8⁺ T-cell signalling in aged mice. We know however that the immune alterations occurring with aging in mice are not the same than in humans. Thus, our aim in the present paper was to investigate whether CD4⁺ and CD8⁺ T-cells subpopulations via lipid rafts signalling contribute differentially to the previously described T-cell signalling and functional alterations with aging. Thus, we have investigated the role of lipid rafts in TCR- and CD28-dependent signaling of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from healthy elderly donors in comparison with young subjects. Our results showed that IL-2 production differed in

time between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and that the lower production of IL-2 by CD4⁺ T-cells with aging was not due to lower levels of expression of the CD4 or CD28. Data also revealed that in both groups, CD4⁺ T-cell proliferation was abolished by methyl- β -cyclodextrin (MBCD) treatment (29) whereas CD8⁺ T-cells were more resistant to this cholesterol-depleting agent. We found that following TCR and CD28 ligation, lipid raft polarization did not occur in CD8⁺ T-cells independently of aging. In contrast, there was an impairment of lipid raft polarization concomitantly with a marked alteration in activation of p56^{Lck}, LAT, Akt/PKB in CD4⁺ T-cells of elderly subjects as compared to CD4⁺ T-cells of young subjects and to the CD8⁺ T-cells. It is suggested that lipid rafts play an important role in the differential signal transduction alteration in T-cell subsets with aging resulting in decreased IL-2 production and proliferation, primarily in CD4⁺ T-cells. The differential distribution of CD28 in lipid rafts between these subsets may explain these age-related CD4⁺ T-cell alterations.

Materials and Methods

Antibodies and reagents - Reagents for SDS-PAGE were from Bio-Rad (Richmond, CA) and Fisher Scientific (Montreal, QC). The HPLC column used for cholesterol quantification was obtained from Agilent Technologies (Palo Alto, CA). Alexa 594-labelled cholera toxin B subunit (CTxB) was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Monoclonal antibodies directed against LAT (clone FL-233), phosphotyrosine (clone pY99), Lck (clone 2102) and anti-CTLA-4 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). An anti-CD3 mAb (UCHT-1) was purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). The anti-CD28 (clone 28.2) and anti-CD45 mAbs (clone HI30) were from Becton Dickinson (Montreal, QC). The anti-pLAT mAb (Tyr-226) was bought from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Secondary antibodies were obtained from

Chemicon International (Temecula, CA). An anti-CTxB polyclonal Ab raised in the goat was from Calbiochem (Mississauga, ON) and FITC-conjugated anti-CTxB antibody from List Biological Laboratories (Epsom, UK). Dynabeads were purchased from Dynal Biotech LLC (Brown Deer, WI).

Subjects - Twenty elderly volunteers aged 65 to 78 years (mean, 73 years) participated in the study. The cohort of 20 young healthy subjects was aged 19 to 25 years (mean, 22 years). The research protocol was approved by the local institutional ethics committee of the Research Center on Aging. All subjects gave written informed consent. The lipid profile was determined by routine biochemical analysis at the clinical biochemistry laboratory of the Medical Center of the University of Sherbrooke. All the subjects were in good health, normolipidemic and satisfied the inclusion criteria of the SENIEUR protocol for immune investigations of human elderly subjects (30).

CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte purification - Blood was obtained by veinipuncture and lymphocytes were isolated by Ficoll-Hypaque density sedimentation, as described (23). PBL were subjected to separation into CD4⁺ and CD8⁺ populations by MACS positive selection using magnetic beads (Myltenyi Biotec, Auburn, USA), following the manufacturer's protocol. The resulting highly enriched T cell populations of CD4⁺ and CD8⁺ cells were phenotyped by flow cytometry and shown to contain less than 1% contaminating B or NK cells. Cell viability was greater than 97% (Trypan blue exclusion). Identical numbers of T-cells from young and aged donors were used in each comparative experiment.

Proliferation - T-cells (2×10^5) were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$) for 72h and then ³H-thymidine was added the last 4 hours before cells harvesting (23). A scintillation counter was used to estimate cell proliferation.

Flow cytometry analysis - Freshly separated T-cells (1×10^6 lymphocytes) were resuspended in PBS and labelled with FITC-conjugated anti-CD4, PE-conjugated anti-CD8 or FITC-conjugated GM1 (List Biological Laboratories) for 30 min at 4°C or with anti-CD28, anti-CD3 then with the corresponding secondary FITC-conjugated antibody for 30 min at 4°C. IL-2 production was measured by intracellular staining using an anti-IL-2 FITC-conjugated antibody with stimulated and permeabilized (paraformaldehyde 1%) cells. Brefeldin A was used to inhibit leaking of the produced IL-2 as described (31). After three washes, the cells were analyzed by flow cytometry using a FACScalibur (Becton Dickinson) instrument.

Isolation of lipid rafts - Freshly isolated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were kept for 1 h in RPMI medium at 37°C. The cells (20×10^6 lymphocytes) were then exposed to a combination of anti-CD3 (5 µg/ml) and anti-CD28 (5 µg/ml) mAb for various periods of time at 37°C which was found to be the most efficient, as already described (25). Control cells (20×10^6 lymphocytes) were left untreated. Lipid raft isolation on sucrose gradients was done as described (25).

Western blotting - Proteins to be analyzed were isolated from total cell lysates or pooled lipid raft fractions by immunoprecipitation, sized by SDS-PAGE under reducing (DL-dithiothreitol) conditions, transferred to nitrocellulose membranes and detected by Western blotting, as described (23). Densitometric analyses were performed using an image analyzer, Chemigenius2 Bio Imaging System (Syngene, Frederick, MD).

Quantification of cell cholesterol and fluorescence anisotropy measurements - Cholesterol concentrations were determined after extraction of sucrose gradient fractions by HPLC analysis using a modification of the procedure of Katsanidis et al. (28, 32), as described (25). Cell membrane anisotropy (r) of was determined using the fluorescent probe diphenylhexatriene

(DPH), as described (25,29,33). Fluidity (f) was calculated using the inverse value of anisotropy ($f = 1/r$).

Lipid raft polarization was assessed by fluorescence microscopy - CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were incubated with anti-CD3 and anti-CD28 coated beads (Dynabeads) for 20 min at 37°C as performed by Viola et al. (16) and as already described by us (25). The cells were then fixed in 1% paraformaldehyde for 15 min and, after three washes, CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (1 x 10⁶ lymphocytes/ml) were resuspended in PBS before being treated with an Alexa 594-conjugated CTxB (10 µg) for 15 min at 4°C. The cells were washed (PBS) and the cell/bead mix was allowed to adhere to glass coverslips pre-coated with poly-L-lysine (0.1 mg/ml) for 15 min at 37°C. The fluorescence was recorded along the z-axis after 5 min of contact using a LSCM system from Thermo Noran (Middleton, WI). Optical sections (0.2 µm-thick) corresponding to the region of contact of the cells with the coverslips were recorded. Fluorescence analysis and distribution of pixel intensities were done as previously described (25).

Determination of the association of CD28 with lipid rafts in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells – Cell extraction with Triton X-100 was performed as described by Filatov et al. (34). Briefly, 1 x 10⁷ cells were suspended in 1ml ice-cold 1% TX-100/phosphate buffered saline supplemented with 1 mM PMSF and incubated with 10 ml ice-cold 1% formaldehyde in PBS and incubated for an additional 30 min. TX-100 extracted cells were collected by centrifugation at 1700 x g for 10 min. For staining, cell pellets containing 5 x 10⁵ cells were mixed with 20 µl of anti-CD28 mAbs at 4°C for 30 min. After being washed, the cells were incubated with FITC-labeled secondary antibodies. Cells were analyzed on FACScan flow cytometer as described above. Resistance of membrane antigens to solubilization with TX-100 was calculated as described (34) and expressed as percentage.

Statistical analysis - Results were analyzed using Student's *t*-test for paired data and significance was set at the 95% confidence limit ($p < 0.05$).

Results

IL-2 production by CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes of young and elderly donors - In a first series of experiments, we asked the question whether the reported decreased production of IL-2 by lymphocytes of elderly individuals (20) discriminately involved CD4⁺ or CD8⁺ T-cells. The protocol used to isolate CD4⁺ and CD8⁺ T-cells did not induce their activation (data not shown). Once isolated the cells were challenged with a combination of anti-TCR and anti-CD28 mAbs as widely used surrogate for APCs stimulation and the extent of the cellular content of IL-2 was assessed by flow cytometry, as a function of time. Brefeldin A was used to inhibit IL-2 release from cells. IL-2 could not be measured in the absence of Brefeldin A after 6h of culture (data not shown). Results showed that the intracellular concentration of IL-2 steadily increased in CD4⁺ T-cells from young donors over 24 h of stimulation (Fig. 1A). In the mean time, the production of IL-2 increased only slightly over the same period of time in CD4⁺ T-cells from elderly donors as compared to young donors (Fig. 1B). In contrast, IL-2 production by activated CD8⁺ T-cells showed similar results in the case of young (Fig. 1C, Table 1) and elderly donors (Fig. 1D, Table 1). It is of note that IL-2 production is more rapid in CD8⁺ T-cells at 6 hours when compared to CD4⁺ T-cells in both groups (Table 1). Moreover, in the case of young donors, the levels after 24 hours in CD4⁺ T-cells were higher when compared to CD8⁺ T-cells. The data on the quantification of IL-2-positive cells are summarized in Table 1.

Surface expression of CD28 coreceptor in T-lymphocytes from young and elderly individuals - The co-ligation of CD28 is an essential step in the activation of T-cells and IL-2 production (15). We therefore measured the surface expression (MFI) of CD3 and CD28 in CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from young and elderly subjects. Results showed that the mean level of expression of CD3 was the same in both populations of donors (Fig. 2A) whereas the MFI values of CD28 was significantly decreased ($p < 0.01$) in T-cells from elderly donors (73 ± 8) as compared to young subjects (117 ± 12 , Fig. 2B). Similar analyses were done in purified CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. The levels of expression of CD28 were nearly similar in CD4⁺ T-cells of young and elderly subjects (respectively, Fig. 3C and Fig. 3E). In contrast to CD4⁺ T-cells, the CD8⁺ T-cells from elderly donors contained a larger and significant CD28^{low} population ($6 \pm 2\%$ vs $23 \pm 6\%$, respectively; Fig. 2E and 2F; $p < 0.01$). These results could not be linked to any changes in the percentage of cells expressing the CD4 or CD8 coreceptor with aging nor in the mean fluorescence intensities for CD4 and CD8 within these two subsets (data not shown).

Activation of p56^{Lck} and LAT in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of young and elderly individuals - In a first set of experiments, we studied the state of activation of p56^{Lck} in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells that were activated by concomitant ligation of CD3 and CD28. Results revealed significant increases in the levels of tyrosine-phosphorylated p56^{Lck} in CD4⁺ (12-fold) and CD8⁺ (10-fold) T-cells from young donors (Fig. 3A and Fig. 3B). In marked contrast, CD4⁺ (4-fold) and CD8⁺ (6-fold) T-cells from elderly donors responded poorly to stimulation (Fig. 3A and Fig. 3B). In a second set of experiments, we investigated the phosphorylation of LAT (p-LAT). Results showed that the levels of p-LAT increased 13-fold in CD4⁺ and in CD8⁺ T-cells from young subjects (Fig. 3C and Fig. 3D). In contrast, the levels of p-LAT increased only slightly in co-stimulated CD4⁺ T-lymphocytes

from elderly individuals (Fig. 3C). Unexpectedly, CD8⁺ T-cells from elderly donors responded well in terms of LAT phosphorylation (12-fold, Fig. 3D)

Proliferation of stimulated T-lymphocytes of young and elderly donors and effect of lipid raft disruption - We asked the question whether the diminution in T-lymphocytes proliferation with aging (23) selectively affected the CD4⁺ or CD8⁺ population and what would be the effect of lipid raft disorganization in these cells in response to stimulation. Untreated or MBCD-treated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were exposed to an anti-CD3 mAb (5 µg/ml) alone or combined to anti-CD28 mAbs (5 µg/ml). As expected, the co-stimulation of CD4⁺ (Fig. 4A) and CD8⁺ T-cells (Fig. 4B) of young donors resulted in a 69-fold and 66-fold increase respectively in uptake of label as compared to the untreated cells. The increases were only 26-fold and 33-fold respectively in the case of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of elderly donors (Fig. 4A and Fig. 4B). We also investigated the effects of modulation of plasma membrane cholesterol content by treating the cells with MBCD. Results showed that CD4⁺ T-cell response of young and elderly donors was completely abolished when concentrations of 0.5 and 10 mM were used (Fig. 4A). Of interest, there were differential effects of MBCD in CD8⁺ T-cells as compared to CD4⁺ T-cells. A 0.5 mM concentration of the drug did not completely abolish lymphocyte proliferation but it was reduced by 3-fold in cells of young and elderly donors. These observations suggested that CD8⁺ T-lymphocytes are less sensitive to the plasma membrane cholesterol depletion than CD4⁺ lymphocytes. As expected, high concentrations of the drug (10 mM) completely disrupt cellular function and proliferation in both age groups (Fig. 4B).

Changes in lipid raft properties of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells with aging - Here, we investigated whether the changes in membrane properties with aging (25, 2629) could contribute to the age-related differentially impaired CD4⁺ and CD8⁺ T-cells functions. The cholesterol concentration of GM1-positive plasma membrane fractions corresponding to lipid rafts (fractions 1-3) was measured by HPLC (25). We found that the cholesterol content in whole lysates as well as in lipid rafts fractions was 1.6-fold higher in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from elderly donors as compared to young subjects (Table 2). The higher concentration of cholesterol was not due to abnormal levels of plasma cholesterol in elderly donors since these individuals were normolipemics (data not shown).

Cholesterol is an important modulator of membrane fluidity. To estimate the extent of the fluidity, we measured its inverse value, i.e. anisotropy, in lipid raft fractions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of young and elderly individuals. Results showed that fluorescence anisotropy was significantly increased ($p < 0.001$) in GM1-positive fractions in CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from elderly individuals as compared to young subjects (Table 2), suggesting that a decrease in lipid rafts fluidity is associated with aging in all subsets.

GM1 expression in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of young and elderly individuals - In view of the importance of lipid rafts in T-cell activation and their putative role in immune senescence, we also analyzed the expression of GM1 in CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes of young and elderly donors. GM1 is used as a marker of lipid rafts (16). It has been reported that it is overexpressed in T-cells of patients suffering from systemic lupus erythematosus (30,35). Furthermore, T-cell activation induces an increase in the production of GM1 within 24 h with a maximal response observed at 48 h (31,36). Results of fluorescence microscopy revealed low levels of GM1 distribution in resting

CD4⁺ (Fig. 5A) and CD8⁺ (Fig. 5B) T-lymphocytes from young donors. MFI analysis further showed that there are no differences in fluorescence levels in these cells (Fig. 5I). In marked contrast, the levels of fluorescence of GM1 in resting CD4⁺ (Fig. 5C) and CD8⁺ T-lymphocytes from elderly donors were significantly higher ($p < 0.01$) than in the case of young donors (Fig. 5I). Exposing CD4⁺ (Fig. 5E) and CD8⁺ (Fig. 5F) T-lymphocytes from young donors for 48 h to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAbs led to a significant increase ($p < 0.001$) in GM1 expression (Fig. 5J). A similar observation was made in the case of CD4⁺ (Fig. 5G) and CD8⁺ (Fig. 5H) T-lymphocytes from elderly donors. However, there were no differences between the two sets of donors at this stage of activation.

Lipid raft polarization measurements using fluorescent microscopy – Next, we asked the question whether there were selective differences in lipid raft reorganization in stimulated CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. Viola *et al.* (16) have shown that lipid raft reorganization requires the concomitant ligation of the TCR and CD28 by ligand-coated beads. CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from young donors and elderly individuals were labelled with Alexa 594-CTxB, mixed with anti-CD3- and anti-CD28-coated beads as described (16,25) and analyzed by fluorescence microscopy. Complexes consisting of one bead in apposition to one cell were selected. Results showed that the ligand-coated beads (white arrows) induced the reorganization of the GM1 distribution to the area of contact with the bead in CD4⁺ T-cells of young (Fig. 6B) and elderly (Fig. 6F) donors. It is of note that the polarization is not well-confined to the site of stimulation and more diffuse in the case of CD4⁺ T-cells from elderly donors. This suggests defects in lipid raft polarization following TCR and CD28 triggering. In marked contrast, the ligand-coated beads failed to induce the reorganization of fluorescent label in the case of CD8⁺ T-cells of young (Fig. 6D) and elderly (Fig.

6H) donors. These observations suggested that lipid raft reorganization is not inducible in CD8⁺ T-lymphocytes in response to co-stimulation and that the lack of polarization is not dependent on the age of the donors.

Activation and association of p56^{Lck} and LAT with lipid raft fractions in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes of young and elderly individuals - We asked the question whether the alterations in the signaling cascade (Fig. 4) were due to the differential recruitment and activation of p56^{Lck} and LAT into lipid rafts. Results showed that the levels of p56^{Lck} in lipid rafts of resting CD4⁺ T-cells from elderly donors were lower than in young donors (Fig. 7A). Activation of CD4⁺ T-cells results in a higher association of p56^{Lck} with the lipid raft fractions in the case of young but not elderly subjects (Fig. 7A). In marked contrast, the levels of association of p56^{Lck} in lipid raft fractions were identical in resting and stimulated CD8⁺ T-cells of young and elderly donors (Fig. 7B). It is of note that these levels were similar to those found in activated CD4⁺ T-cells ($p < 0.01$). The association of the LAT adaptor protein in resting CD4⁺ T-cell lipid raft fractions was similar in aging but activation of these cells did not allow further recruitment in the case of elderly compared to young donors (Fig. 7C). This was not the case in CD8⁺ T-cells (Fig. 7D). These data suggest differences in signaling molecule content of lipid rafts between CD4⁺ T-cells and CD8⁺ T-cells and a lack of recruitment with aging (p56^{Lck}) in the only subset requiring it, i.e. CD4⁺ T-cells.

We also determined the levels of association of phosphorylated p56^{Lck} and LAT in the lipid raft fractions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of young and elderly individuals. Results showed that activation of T-cells resulted in increased levels of association of p-p56^{Lck} with the lipid raft fractions of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes of young donors (Fig. 7E). However, when compared to young donors, p56^{Lck} phosphorylation in lipid rafts was 5.5-fold lower in CD4⁺ T-cells from

elderly donors. This was reduced by only 2.1-fold in the case of CD8⁺ T-cells of elderly donors. Similar experiments were performed in the case of the association of p-LAT with the lipid raft fractions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (Fig. 7F). In these cases, the increases observed in cells from young donors were respectively 1.9-fold and 1.8-fold higher than measured in cells of elderly donors.

CD28-dependent Akt activation in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in aging

In the last set of experiments we performed a time-course analysis of tyrosine-phosphorylated Akt/PKB (p-Akt) in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from young and elderly subjects. Results showed that the levels of p-Akt reached a maximum after 5 – 10 min of co-stimulation in CD4⁺ T lymphocytes from young subjects (Fig. 8A). A similar activation of Akt was observed in the CD8⁺ compartment of young subjects (Fig. 8C). In marked contrast, Akt was poorly activated in CD4⁺ T-cells from elderly subjects (Fig. 8B), with a slight and transient increase of p-Akt at 5 min. Such a lack of Akt activation was not seen in the case of CD8⁺ T-cells (Fig. 8D) from elderly donors.

CD28 association with lipid rafts in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells – We assessed CD28 association to lipid rafts to explain the Akt activation changes with aging. To quantify the amount in lipid rafts in each T-cell subsets we tested CD28 resistance to Triton X-100 permeabilization (34). We present in Figure 9 that CD28 is not associated with lipid rafts in resting CD4⁺ T-cells since Triton X-100 treatment did not induce a change in CD28 fluorescence (Figure 9A, left panel). Activation of these T-cells induced a redistribution of CD28 to lipid rafts as shown by sensitivity to Triton X-100 treatment (Figure 9A, right panel). In case of young donors 71 % of CD28 was relocalized to lipid rafts following CD4⁺ T-cells stimulation (Figure 9A), while only 34 % of CD28 was

associated with lipid rafts in the case of elderly subjects (Figure 9C). Concerning resting CD8⁺ T cells, CD28 has been found already associated with lipid rafts in both age-groups (Figure 9C and 9D). Activation of CD8⁺ T-cells did not make any significant change in this association. Contrary to CD4⁺ T-cells, CD8⁺ T-cells from elderly donors can preserve association of CD28 to lipid rafts (Figure 9D). These data indicate a major disturbance of CD28 localization and signaling in CD4⁺ T-cells with aging.

Discussion

A tight regulation of the immune system will guarantee the resolution of any aggression. Impairments in innate (37) and adaptive immunity (38) have been demonstrated with aging, leading to a higher susceptibility to infections and other diseases. One hypothesis to explain this observation suggests alterations in TCR-dependent signaling. We and others have shown that several steps of the signaling cascade following T-cell receptor ligation are altered with aging (reviewed in 22). However, much effort has focussed on downstream events of T-cell signaling and less attention has been given to possible alterations in upstream events (39,40), including the assembly of signaling molecules in lipid rafts of the plasma membrane. Recently, we have presented evidence that the age-related alterations in T-cell activation (immune senescence) are linked to changes in lipid raft composition and function (25). Immune senescence studies have addressed the question in human CD3⁺ T-cells, but there are no individual data concerning responses of helper and cytotoxic T-cells. Recently, data were obtained in the field of lipid rafts that indicated a specific role for these lipid rafts in each cell type and/or cell subset. Thus, the aim of this study was to further investigate whether lipid rafts are differentially involved in CD4⁺ and CD8⁺ T-cell signaling and thus contribute to explain T-cell functional alterations found during

immune senescence. The main findings of this study indicate that the observed functional defects in T-cells functions (IL-2 production and proliferation) are mostly related to a decreased signaling via lipid rafts in CD4⁺ T-cells. The function and signalling molecule composition of lipid rafts were different in CD4⁺ T-cells when compared to CD8⁺ T-cells, the former exhibiting a higher dependence for their activation on lipid rafts. This difference was due to an alteration in the CD28 signalling, described for the first time, which explained why a similar decrease in membrane fluidity in both T-cells subsets has relatively fewer effects on CD8⁺ T-cell activation.

First, we investigated IL-2 production by CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Results obtained in this paper show a differential response of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells with respect to the production of IL-2. CD4⁺ T-cells of young donors produced significantly higher amounts of IL-2 than CD4⁺ T-cells of elderly subjects. In contrast, there were no significant differences between the CD8⁺ T-cells from young and elderly donors (Table 1) suggesting that the drop of CD28 expression observed in CD8⁺ T-cells of elderly donors (Fig. 2) has no consequences for IL-2 production (Fig. 1). On the contrary, IL-2 production was severely impaired in CD4⁺ T-cells of elderly donors in spite the preservation of CD28 expression. When we looked at proliferative capability, CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from elderly both exhibited lower proliferation when compared to young donors. The discrepancy between the proliferative capability and IL-2 production changes with aging, in CD8⁺ T-cells, may arise from the fact that an *in vivo* co-operation is needed among the two subsets for the full expansion of CD8⁺ T-cells. As demonstrated, the CD4⁺ T-cells which are the main IL-2 producers are much less efficient with aging. This decreased IL-2 production with aging points to an alteration in the signal transduction in CD4⁺ T-cells and was consequently investigated.

The discovery of this differential IL-2 production has raised the question whether the TCR/CD28-dependent early events associated with T-cell activation were differentially altered in CD4⁺ and

CD8⁺ T-cells in aging. p56^{Lck} is a *src* kinase that is a key regulator of the proximal events of T-cell signaling (2) that include the participation of the LAT adaptor protein (signal 1) to assemble the signalosome (41). We found that CD4⁺ T-cells from elderly donors failed to recruit and activate p56^{Lck} to lipid rafts, suggesting an age-related alteration in the early steps of activation in CD4⁺ T-cells. In contrast, p56^{Lck} was associated to the same levels in the lipid raft fraction of resting and activated CD8⁺ T-cells of young and elderly subjects (Fig. 7). It is of note that in resting CD8⁺ T-cells the levels of lipid raft-associated p56^{Lck} is significantly higher than in resting CD4⁺ T-cells. This was observed independently of the age of the donors, suggesting intrinsic differences between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. Concerning the association of LAT to lipid rafts, we found that CD4⁺ T-cells from elderly donors were unable to recruit LAT after stimulation in comparison to young subjects. In contrast, in CD8⁺ T-cells LAT was highly associated to lipid rafts as was the case of p56^{Lck}. However, these differences seen in LAT association were not translated for LAT activation between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of elderly donors (Fig. 7). Altogether these results indicate that ligation of TCR and CD28 induces the recruitment of early signaling molecules (p56^{Lck}, LAT) to lipid rafts in CD4⁺ T-cells. This phenomenon is shown to be severely impaired in aging. In contrast, similar receptor triggering did not induce further signaling molecule recruitment in CD8⁺ T-cells due to the pre-existing association of the early signaling molecules (p56^{Lck}, LAT) to lipid rafts. It is of note, that this phenomenon in CD8⁺ T-cells was not affected in aging. These data clearly indicate that alterations in the early signaling events in lipid rafts affect more the CD4⁺ T-cells than CD8⁺ T-cells in aging.

Could all these functional changes be related to the differential composition and/or function of lipid rafts?

To support the hypothesis that the properties of the signalosome in CD8⁺ T-cells differ from that of CD4⁺ T-cells we assessed the effect of lipid raft disruption on T-cell proliferation. Data revealed that CD8⁺ T-cells were less sensitive to a low concentration (0.5 mM) of β -methyl cyclodextrin, a lipid raft disrupting agent, as compared to CD4⁺ T-cells (Fig. 4). Whereas the proliferative response of CD4⁺ T-cells of young and elderly donors was completely abolished, there still remained a partial response of CD8⁺ T-cells to TCR/CD28 stimulation. These observations suggested differential intrinsic properties of lipid rafts in CD4⁺ T-cells as compared to CD8⁺ T-cells which may result in a differential mode of signaling. These data may also explain the differential kinetic of IL-2 production by CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (Fig. 1).

One key component of lipid rafts is cholesterol which serves to stabilize their structure and to modulate their fluidity (42). The concentration of cholesterol was 1.6-fold higher in lipid raft fractions prepared from CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in the case of elderly subjects as compared to young individuals (Table 2). The anisotropy of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells and lipid rafts fractions prepared from these cells was increased by approximately 10 % in the case of elderly donors (Table 3), suggesting an inverse correlation between lipid raft cholesterol content and plasma membrane fluidity. The cause of the increase in the concentration of cholesterol in resting T-cells with aging is not known but may be the result of an imbalance in cellular cholesterol metabolism (43,44). Preliminary data from our laboratories indicate that significant changes occur with aging in the HDL-mediated reverse cholesterol transport (manuscript in preparation). This mechanism is lipid raft-dependent (45) and suggests that its deregulation may contribute to the elevated plasma membrane cholesterol content in T-lymphocytes from normolipemic elderly humans. Altogether, the increased cholesterol content and decreased fluidity of the membrane found here in both T-cell subsets reinforce our previous data in T-cells (25), contributing to a functional decrease, however

can not give an explanation for the differential functional behaviour between these T-cells subsets. In this context, another question arises concerning the properties of the lipids which make up the lipid rafts. We showed a quantitative increase in raft cholesterol with aging but changes in oxidative status should alter lipid rafts properties and function. Since CD8⁺ T-cells possess a cytotoxic activity via their granules, they may be gifted with a higher protection against oxidation and other aggressions than CD4⁺ T-cells, also explaining why they were less affected by immune senescence. Moreover, unsaturated fatty acids were shown to inhibit T-cell activation and functions by selectively displacing signaling molecules from lipid rafts. Thus, changes in fatty acid composition may also explain discrepancies between young and elderly donors as well as between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from the same donor. We are currently addressing these questions.

In view of the alterations in plasma membrane cholesterol concentration in lipid rafts, we also analyzed the distribution of the ganglioside M1. The GM1 fluorescence intensity in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of elderly individuals was more than two-fold higher than that measured in the corresponding T-cells of young donors (Fig. 6). The increase in GM1 may have critical effects on T-cell functions that depend on lipid rafts, namely the recruitment of proteins involved in the early events of signaling. In this context, it has been reported that over-expression of membrane microdomains constituents (46) such as GM1 in PC12 cells can suppress nerve growth factor signals by modulating signal-transducing molecule localization and plasma membrane fluidity (47). As a corollary, high level of GM1 in lipid rafts of resting CD4⁺ T-cells of elderly individuals may interfere with GM1 turnover (36), resulting in defects in early T-cell signaling as well as in IL-2 production (Fig. 1).

Moreover, lipid rafts of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells behave differently in polarization experiments induced by anti-TCR/CD28-coated beads. While the beads induced lipid raft polarization to the

region of contact in CD4⁺ T-cells of young and elderly individuals, the beads failed to induce coalescence in CD8⁺ T-cells of both groups of donors (Fig. 6). Recently, it was suggested that the expression of CD8 gives the cell a “dominant-negative” phenotype towards lipid rafts polarization (18) as it occurred in immature CD4⁺CD8⁺ T-cells (48). Thus, lipid raft functions may be determined during T-cell selection by an unknown mechanism. Altogether, these data suggest that CD4⁺ T-cells rely profoundly on lipid rafts to reach a full state of activation, while CD8⁺ T-cells, due to their pre-existing signalosome, could circumvent “lipid rafting”. This raised the possibility that similar age-related changes in lipid raft cholesterol composition may affect differentially CD4⁺ and CD8⁺ T cells, the former being much more affected.

The end-point of lipid raft function is to induce the formation of the immunological synapse via supramolecular activation clusters (SMAC) (49,50). The data of O’Keefe et al. (51) showed that the formation of SMAC is not required for activation of naïve CD8⁺ T-cells, giving support to data presented here on the differential sensitivity of activation between CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes. This reinforces our hypothesis that CD4⁺ T-cells do not behave in the same manner as CD8⁺ T-cells in aging due to their differential mode of signaling. The triggering of CD28 is a critical step for lipid raft polarization which results in SMAC formation leading ultimately to IL-2 production (52). In this context, we investigated and present here for the first time, the CD28 signalling in CD4⁺ and CD8⁺ T cells by assessing Akt activation in aging. PKB/Akt is a tyrosine kinase which is recruited to the plasma membrane, in a CD28- and PI3K- dependent event (signal 2), where it is phosphorylated and activated (37,38). Akt was weakly activated in CD4⁺ T-cells of elderly subjects but not affected in the case of CD8⁺ T-cells (Fig. 8). These data indicate a critical alteration in CD28 signaling in CD4⁺ T-cells of elderly subjects, which can not be explained by the slight change in CD28 expression. Paradoxically, the marked increase in CD28^{low} CD8⁺ T-cells did

not affect Akt activation. Moreover, in view of the pleiotropic effects of Akt, its decreased activation also suggested that in CD4⁺ T-cells, downstream signaling events including the up-regulation of the transcription factors, NF- κ B and NF-AT, would be impaired which would result in defects in cytoskeletal rearrangements, cell cycling and ultimately in a decreased production of IL-2 in T-cells (53,54). Thus the differential alterations in CD28 signalling between CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets explained the functional alterations of lipid rafts with aging leading to modified signalling and function mainly in CD4⁺ T-cells.

These results explain one very important finding in immunosenescence which is the differential sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells towards activation induced cell death (AICD). CD4⁺ T cells are more susceptible to AICD than CD8⁺ T cells (26). This can be explained by the differential signaling of CD28 towards Akt activation as this pathway mediates the survival/apoptosis of T cells. Moreover, our published data show that the level of expression of receptors is not the best marker for cellular function but the differential localization of receptors, such as Toll-like receptors and/or signaling molecules would influence cell signaling and ultimately immune function. In this context, we demonstrate here that CD28 is more weakly associated with lipid rafts after stimulation in CD4⁺ T-cells with aging contrary to CD8⁺ T-cells (Fig. 9). Altogether these data suggest that the expression of CD28 is not the determinant for T-cell activation, but its localization to lipid rafts would determine the fate of the activation.

Recently, it has been shown that changes in lipid raft machinery also occur in autoimmune diseases such as in systemic lupus erythematosus (SLE). Jury *et al.* demonstrated in their paper that p56^{Lck} was over-associated in lipid rafts of CD3⁺ T-cells, explaining the hyperactivity of these cells in SLE patients (35). Based on the data presented here, we suggest that the changes in lipid raft composition and functions lead to impaired p56^{Lck} activation and may be a main cause of the

alterations in CD4⁺ T-cell functions and consequently in immune senescence. In contrast, lipid rafts behave differently in CD8⁺ T-cells where the changes in plasma membrane properties in aging have fewer consequences on their activation. These alterations results partly from the differential signalling impairment of CD28 co-stimulatory molecules with aging, between CD4⁺ and CD8⁺ T-cells.

In summary, our results suggest an essential role for lipid rafts in T-cell function alterations in aging, affecting mainly CD4⁺ T-cells. Further studies in this field will help for a better understanding of the role of lipid rafts in immune senescence as well as the role of each T-cell subset in age-related immune deficiency.

Footnotes

This work was supported by a grant-in-aid from the Canadian Institute of Health Research (No. 63149) and the Research Center on Aging of Sherbrooke. We thank the Clinical Research Center for assistance and access to microscopes.

Figures legends

Fig. 1. Intracellular measurement of interleukin-2 production in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of young and elderly individuals. Freshly isolated CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes were exposed for the indicated periods of time to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, in the presence of Brefeldin A (1 μ M). The cells were collected and fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde for 10 min. Membrane permeabilization was achieved using saponin 1%. Flow cytometry analysis was performed using a FITC-conjugated anti-IL-2 antibody. Fluorescence data are shown for IL-2 synthesis in (A) CD4⁺ and (B) CD8⁺ T-cells from young donors. Results are also shown in the case of (C) CD4⁺ and (D) CD8⁺ T-cells from elderly donors. Control (c) corresponds to the fluorescence measured using the FITC-conjugated secondary antibody. Histograms from 1 representative experiment are shown. Experiments were performed in duplicate from 3 different donors in each age-group.

Fig. 2. TCR and CD28 expression in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from young and elderly donors. T-lymphocytes were labelled with a FITC-conjugated anti-CD3 mAb or with a combination of an anti-CD28 mAb and a FITC-conjugated secondary Ab. After washings,

the cells were analyzed by flow cytometry analysis. (A) Expression of CD3⁺ cells in PBL from young and elderly donors. (B) Expression of CD28 on CD3⁺ cells from young and elderly donors. Bold lines correspond to young donors, dotted lines to elderly donors and, thin continuous line to the isotype Ab. (C) Expression of CD28 on CD3⁺ and CD4⁺ purified T-cells from young donors. (D) Expression of CD28 on CD3⁺ and CD8⁺ purified T-cells from young donors. (E) Expression of CD28 on CD3⁺ and CD4⁺ purified T-cells from elderly donors. (F) Expression of CD28 on CD3⁺ and CD8⁺ purified T-cells from elderly donors. The arrows indicate the levels of the CD28^{low} population. Bold lines correspond to the relevant Ab and dotted cells to irrelevant isotypic Ab. Histograms from 1 representative experiment are shown. Experiments were performed in duplicate from 8 different donors in each age-group with similar results.

Fig. 3. Activation of p56^{Lck} and LAT in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from young and elderly subjects. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were exposed to a combination of an anti-CD3 (5 µg/ml) and an anti-CD28 (5 µg/ml) mAb. Tyrosine-phosphorylated p56^{Lck}, LAT and Akt were detected by Western blotting using an anti-phosphorylated p56^{Lck} mAb (p-p56^{Lck}, dilution 1:500), an anti-phosphorylated LAT mAb (p-LAT, 1:1000). In each case, protein detection was done using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The cells were exposed to the stimuli for 1 min (p56^{Lck}) and 5 min (LAT). The levels of protein expression were determined using anti-p56^{Lck} (1:1000) and anti-LAT (1:2000) mAbs. Results show the levels of p-p56^{Lck} and p56^{Lck} in resting and activated CD4⁺ (A) and CD8⁺ T-cells (B) of young and elderly donors, as indicated. The same experiments were performed for p-LAT

and LAT in resting and activated CD4⁺ (C) and CD8⁺ T-cells (D). Experiments were performed on cells from 5 different donors of each age-group with similar results.

Fig. 4. Incorporation of [³H] thymidine in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells of young and elderly subjects. Purified CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (2×10^5 lymphocytes/well) were cultured in the presence of an anti-CD3 mAb or with a combination of an anti-CD3 mAb and an anti-CD28 mAb for 72 h in 96-well culture plates. In some experiments, the cells were treated with MBCD (0.5 mM or 10 mM) for 1 h at 37°C and washed prior to stimulation. Data are shown as the mean cpm \pm SD in the case of (A) CD4⁺ and (B) CD8⁺ T-cells from 4 different young (empty columns) and 4 different elderly donors (filled columns). Significant differences between young and elderly donors are indicated by asterisks (*, $p < 0.01$; **, $p < 0.05$) and between CD4⁺ and CD8⁺ by *** ($p < 0.001$).

Fig. 5. GM1 expression in resting and activated T-cells of young and elderly subjects. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were left untreated or were exposed (48 h) to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. The cells were fixed with paraformaldehyde and labelled with Alexa 594-conjugated cholera toxin B subunit for microscopy analysis. After washing, the cells were resuspended in PBS and mounted in coverslips. Data show images in pseudo-color of the distribution of fluorescence in resting (A) and activated (C) CD4⁺ T-cells and resting (B) and activated (D) CD8⁺ T-cells of young donors. Similar images in pseudo-color are shown in the case of resting (E) and activated (G) CD4⁺ T-cells and resting (F) and activated (H) CD8⁺ T-cells of elderly donors. Mean fluorescence intensities (MFI) of resting (I) and activated (J) T-cells of young (empty columns) and elderly

individuals (filled columns) labelled with FITC-conjugated CTxB. Data are shown as the mean \pm SD of 5 different donors in each age-group and, significance, as an asterisk ($p < 0.01$). The scale bars correspond to 4 μm .

Fig. 6. Lipid raft polarization in CD4^+ and CD8^+ T-lymphocytes induced by CD3/CD28-coated beads: effects of aging. CD4^+ and CD8^+ T-cells were incubated for 20 min with anti-CD3- and anti-CD28-coated beads at 37°C. Cell/bead complexes were allowed to adhere to poly-L-lysine coated coverslips and fixed in paraformaldehyde (1%). The cells were labelled with Alexa 594-conjugated CTxB for 15 min at 4°C. Images captured by fluorescence microscopy represent, in pseudo-color, lipid raft distribution of resting (A) and coated bead-exposed (B) CD4^+ T lymphocytes of young donors. Similar experimental conditions are shown in the case of resting (C) and coated bead-exposed (D) CD8^+ T-cells of young donors. Results obtained with CD4^+ T-cells from elderly donors shown in resting (E) and activated (F) cells. Data corresponding to resting (G) and coated bead-exposed (H) CD8^+ T-cells from elderly donors are also presented. The scales bars correspond to 5 μm . Images are from 1 representative experiment. Experiments were repeated with 5 different donors in each age-group with similar results.

Fig. 7. Lipid raft-associated and activated p56^{Lck} and LAT in CD4^+ and CD8^+ T-lymphocytes: effects of aging. CD4^+ and CD8^+ cells were stimulated with a combination of anti-CD3 (5 $\mu\text{g/ml}$) and anti-CD28 (5 $\mu\text{g/ml}$) mAb for 1 min in the case of p56^{Lck} studies and for 5 min in the case of LAT. The cells were lysed in a buffer containing 0.5% Triton X-100. Lipid rafts were obtained by sucrose gradient centrifugation (100,000 x g, 16 h).

GM1-positive fractions (1 to 3) were pooled, sized on SDS-PAGE and transferred to a membrane. Western-blotting experiments were done using an anti-LAT mAb (dilution 1:1000) and an anti-p56^{Lck} mAb (1:250). Western blot analysis (A) lower panels show the densitometric analysis of the association of p56^{Lck} in lipid raft fractions in the case of resting and activated CD4⁺ T-cells from young (empty columns) and elderly individuals (filled). Western blot analysis (B) semi-quantification of the association of p56^{Lck} in lipid raft fractions in the case of resting and activated CD8⁺ T-cells from young (empty columns) and elderly individuals (filled). Western blot analysis (C) semi-quantification of the association of LAT in lipid raft fractions in the case of resting and activated CD4⁺ T-cells from young (empty columns) and elderly (filled) individuals. Western blot analysis (D) semi-quantification of the association of LAT in lipid raft fractions in the case of resting and activated CD8⁺ T-cells from young (empty columns) and elderly (filled) individuals. Western blotting experiments were done using mAb directed against phospho-Tyrosine (clone PY99). The same western blot analysis (E) semi-quantification of the association of p-p56^{Lck} in lipid raft fractions in the case of resting and activated CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from young (empty columns) and elderly (filled) individuals. The data concerning LAT (p-LAT) are represented in (F). The densitometry analysis are shown as the mean \pm SD of 5 different donors for each age-group. Statistical significance is shown by asterisks (*, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.05$).

Fig. 8. Activation of Akt in CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from young and elderly subjects. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were exposed to a combination of an anti-CD3 (5 μ g/ml) and an anti-CD28 (5 μ g/ml) mAb. Phosphorylated-Akt was detected by Western blotting using anti-

phosphorylated Akt mAb (p-Akt, 1:1000). In each case, protein detection was done using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Loading controls were performed using anti-Akt (1:1000) mAbs. Results show the levels of p-Akt and Akt in resting and activated CD4⁺ from young and elderly donors (A and B, respectively) as well as for CD8⁺ T-cells from young and elderly donors (C and D, respectively), as indicated. Experiments were repeated with 5 different donors in each age-group with similar results.

Fig. 9. CD28 association with lipid rafts assessed by flow cytometry. CD4⁺ and CD8⁺ T-cells were assessed for CD28 association with lipid rafts by sensitivity towards Triton X-100 treatment. T-cells were stained with FITC-conjugated anti-CD28 mAbs and analyzed by flow cytometry. The light line corresponds to isotype control; the bold line corresponds to non-treated T-cells while the dashed line corresponds to Triton X-100-treated T-cells. A shift in fluorescence (decrease) indicates that CD28 was associated with lipid rafts while no change indicates no association of CD28 with lipid rafts. A representative graph of resting and activated CD4⁺ (A) and CD8⁺ T-cells (B) from young donors. The same graphs are shown in the case of CD4⁺ (C) and CD8⁺ T-cells (D) from elderly donors. The experiments were performed for 3 different donors of each age-group and gave similar results.

References

1. Margulies, D.H. (1997) *Curr. Opin. Immunol.* 9:390
2. Walk, S.F., March, M.E., Ravichandran, K.S. (1998) *Eur. J. Immunol.* 28:2265
3. Guse, A.H. 1998. Ca²⁺ signaling in T-lymphocytes. *Crit. Rev. Immunol.* 18:419
4. Bosselut, R., Zhang, W.G., Ashe, J.M., Kopacz, J.L., Samelson, L.E., Singer, A. (1999) *J. Exp. Med.* 190:1517
5. Kane, L.P., Lin, J., Weiss, A. (2000) *Curr. Opin. Immunol.* 12:242
6. June, C.H., Fletcher, M.C., Ledbetter, J.A., Samelson, L.E. (1990) *J. Immunol.* 144:1591
7. Simons, K., Ikonen, E. (1997) *Nature* 387:569
8. Janes, P.W., Ley, S.C., Magee, A.I. (1999) *J. Cell Biol.* 147:447
9. Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M.J.B., Altman, A. (2001) *Nature Immunol.* 2:556
10. Bini, L., Pacini, S., Liberatore, S., Valensin, S., Pellegrini, M., Raggiaschi, R., Pallini, V., Baldari, C.T. (2003) *Biochem. J.* 369:301
11. Drevot, P., Langlet, C., Guo, X.J., Bernard, A.M., Colard, O., Chauvin, J.P., Laserre, R., He, H.T. (2002) *EMBO J.* 21:1899
12. Krummel M.F., Sjaastad M.D., Wulfig C., Davis M.M. (2000) *Science* 289:1349
13. Wang, T.Y., Leventis, R., Silvius, J.R. (2000) *Biophys. J.* 79:919
14. Alonso, M.A., Millan, J. (2001) *J. Cell Sci.* 114:3957
15. Wells, A.D., Gudmundsdottir, H., Turka, L.A. (1997) *J. Clin. Invest.* 100:3173
16. Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., Lanzavecchia, A. (1999) *Science.* 283:680
17. Marmor, M.D., Julius, M. (2001) *Blood.* 98:1489

18. Kovacs, B., Maus, M.V., Riley, J.L., Derimanov, G.S., Koretzky, G.A., June, C.H., Finkel, T.H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:15006
19. Pike, L.J. (2004) *Biochem. J.* 378:281
20. Globerson, A., Effros, R.B. (2000) *Immunol. Today* 21:515
21. Wick, G., Grubeck-Loebenstien, B. (1997) *Exp. Gerontol.* 32:401
22. Pawelec, G., Hirokawa, K., Fülöp, Jr.T. (2001) *Mech. Ageing Dev.* 122:1613
23. Douziech, N., Seres, L., Larbi, A., Szikszay, E., Roy, P.M., Arcand, M., Dupuis, G., Fülöp Jr.T. (2002) *Exp. Gerontol.* 37:369
24. Tamir, A., Eisenbraun, M.D., Garcia, G.G., Miller, R.A. (2000) *J. Immunol.* 165:1243
25. Larbi, A., Douziech, N., Dupuis, G., Khalil, A., Pelletier, H., Guerard, K.P., Fülöp, Jr.T. (2004) *J. Leukoc. Biol.* 75:373
26. Gupta, S. (2005) *Immunol Rev.* 205:114
27. Schindowski, K., Frohlich, L., Maurer, K., Muller, W.E., Eckert, A. (2002) *Mech Ageing Dev.* 123:375
28. de Mello Coelho, V., Nguyen, D., Giri, B., Bunbury, A., Schaffer, E., Taub, D.D. (2004) *BMC Immunol.* 5:2
29. Larbi, A., Douziech, N., Khalil, A., Dupuis, G., Gherairi, S., Guerard, K.P., Fülöp, T.Jr. (2004) *Exp. Gerontol.* 39:551
30. Ligthart, G.H. (2001) *Mech. Ageing Dev.* 122:136
31. Qi, S., Robert, L., Burton, Kenneth, G.L. (2002) *Blood* 99: 3302
32. Katsanidis, E., Addis, P.B. (1999) *Free Rad. Biol. Med.* 27:1137
33. Gidwani, A., Holowka, D., Baird, B. (2001) *Biochemistry* 40:12422

34. Filatov, A.V., Shmigol, I.B., Kuzin, I.I., Sharonov, G.V., Feofanov, A.V. (2003) *J. Immunol. Meth.* 278:211
35. Jury, E.C., Kabouridis, P.S., Flores-Borja, F., Mageed, R.A., Isenberg, D.A. (2004) *J. Clin. Invest.* 113:1176
36. Tuosto, L., Parolini, I., Schröder, S., Sargiacomo, M., Lanzavecchia, A., Viola, A. (2001) *Eur. J. Immunol.* 31:345
37. Plackett, T.P., Boehmer, E.D., Faunce, D.E., Kovacs, E.J. (2004) *J. Leukoc. Biol.* 76:291
38. Linton, P.J., Dorshkind, K. (2004) *Nature Immunol.* 5:133
39. Grossmann, A., Ledbetter, J.A., Rabinovitch, P.S. (1989) *Exp. Cell Res.* 180:367
40. Laux, I., Khoshnan, A., Tindell, C., Bae, D., Zhu, X., June, C.H., Effros, R.B., Nel, A. (2000) *Clin. Immunol.* 96:187
41. Harder, T., Kuhn, M. (2000) *J. Cell Biol.* 151:199
42. Silvius, J.R. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* 1610:174
43. Simons, K., Ikonen, E. (2000) *Science* 290:1721
44. Simons, K., Ehehalt, R. (2002) *J. Clin. Invest.* 110:597
45. Gaus, K., Kritharides, L., Schmitz, G., Boettcher, A., Drobnik, W., Langmann, T., Quinn, C.M., Death, A., Dean, R.T., Jessup, W. (2004) *FASEB J.* 18:574
46. Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M.P., Galbiati, F. (2002) *Mol. Biol. Cell.* 13:2502
47. Nishio M., Fukumoto S., Furukawa K., Ichimura A., Miyazaki H., Kusunoki S., Urano T., Furukawa K. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:33368
48. Ebert, P.J., Baker, J.F., Punt, J.A. (2000) *J. Immunol.* 165:5435
49. Burack, W.R., Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Shaw, A.S. (2002) *J. Immunol.* 169:2837

50. Dustin, M.L. (2002) *J. Clin. Invest.* 109:155
51. O'Keefe, J.P., Blaine, K., Alegre, M.L., Gajewski, T.F. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:9351
52. Sadra, A., Cinek, T., Imboden, J.B. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:11422
53. Kane, L.P., Weiss, A. (2003) *Immunol. Rev.* 192:7
54. Bauer, B., Baier, G. (2001) *Mol. Immunol.* 38:1087

Table I**Percentage of IL-2-positive CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from young and elderly individuals**

Stimulus	IL-2-positive cells (%)					
	6 h		12 h		24 h	
	young	elderly	young	elderly	young	elderly
<u>CD4⁺ :</u>						
None	1.4 ± 0.6	0.5 ± 0.2	1.9 ± 0.6	0.9 ± 0.5	2.4 ± 0.4	1.4 ± 0.2
CD3/CD28 (MFI)	8.4 ± 1.4 (12.2)	3.9 ± 1.2* (15.7)	58.4 ± 7.8 (28.3)	18.1 ± 4.2* (13.1)	71.6 ± 6.8 (95.4)	48.3 ± 8.4* (22.1)
<u>CD8⁺ :</u>						
None	0.2 ± 0.1	1.1 ± 0.4	0.5 ± 0.2	1.4 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.7 ± 0.8
CD3/CD28 (MFI)	35.7 ± 4.2 (15.7)	24.7 ± 8.1 (13.9)	47.8 ± 11.4 (19.7)	38.4 ± 7.1 (18.1)	58.7 ± 4.5 (27.7)	49.0 ± 8.7 (25.8)

CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes were left untreated or exposed for the indicated periods of time to a combination of anti-CD3 and anti-CD28 mAbs, in the presence of brefeldin A (1 μM). The cells were collected, fixed in PBS containing 1% paraformaldehyde (10 min) and plasma membrane permeabilized by treatment with saponin (1% w/v). Flow cytometry analyses were performed using a FITC-conjugated anti-IL-2 antibody. Significant differences in percentage of IL2⁺ cells between the groups of age are indicate by * (p < 0.01). Data represent mean±SD from experiments of 3 different subjects from each age-groups.

Table II**Cholesterol content in CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from young and elderly individuals**

	Cholesterol content (nM)	
	young donors (n=3)	elderly donors (n=3)
CD4 ⁺ (cell lysate)	41.0 ± 8.1	64.7 ± 6.2 *
CD8 ⁺ (cell lysate)	45.2 ± 4.3	72.0 ± 11.6 *
CD4 ⁺ (raft fraction)	18.3 ± 2.1	28.4 ± 3.7 *
CD8 ⁺ (raft fraction)	19.0 ± 5.2	29.5 ± 5.4 *

CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes (10⁷ cells) were lysed; lipids were extracted and analyzed by HPLC. Data are shown as mean ± SD (n = 3) for cholesterol content in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte lysates and lipid raft fractions prepared from these cells. Significant differences between the groups of donors are indicated by * (p < 0.05).

Table III**Fluorescence anisotropy of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes from young and elderly individuals**

Cells and cell fraction	Anisotropy (<i>r</i>)	
	young donors (n=6)	elderly donors (n=6)
CD4 ⁺ (cell lysate)	0.219 ± 0.003	0.246 ± 0.011 *
CD8 ⁺ (cell lysate)	0.224 ± 0.004	0.251 ± 0.009 *
CD4 ⁺ (raft fraction)	0.219 ± 0.003	0.246 ± 0.011 *
CD8 ⁺ (raft fraction)	0.224 ± 0.004	0.251 ± 0.009 *

CD4⁺ and CD8⁺ cells were labelled with the fluorescent probe DPH and fluorescence anisotropy was measured using a spectrofluorimeter. Data are shown as the mean ± SD of 6 independent experiments in each age-group. Significant differences between young and elderly donors are indicated by an asterisk (*, $p < 0.001$). No differences were found within T-cell subpopulations of the same age group.

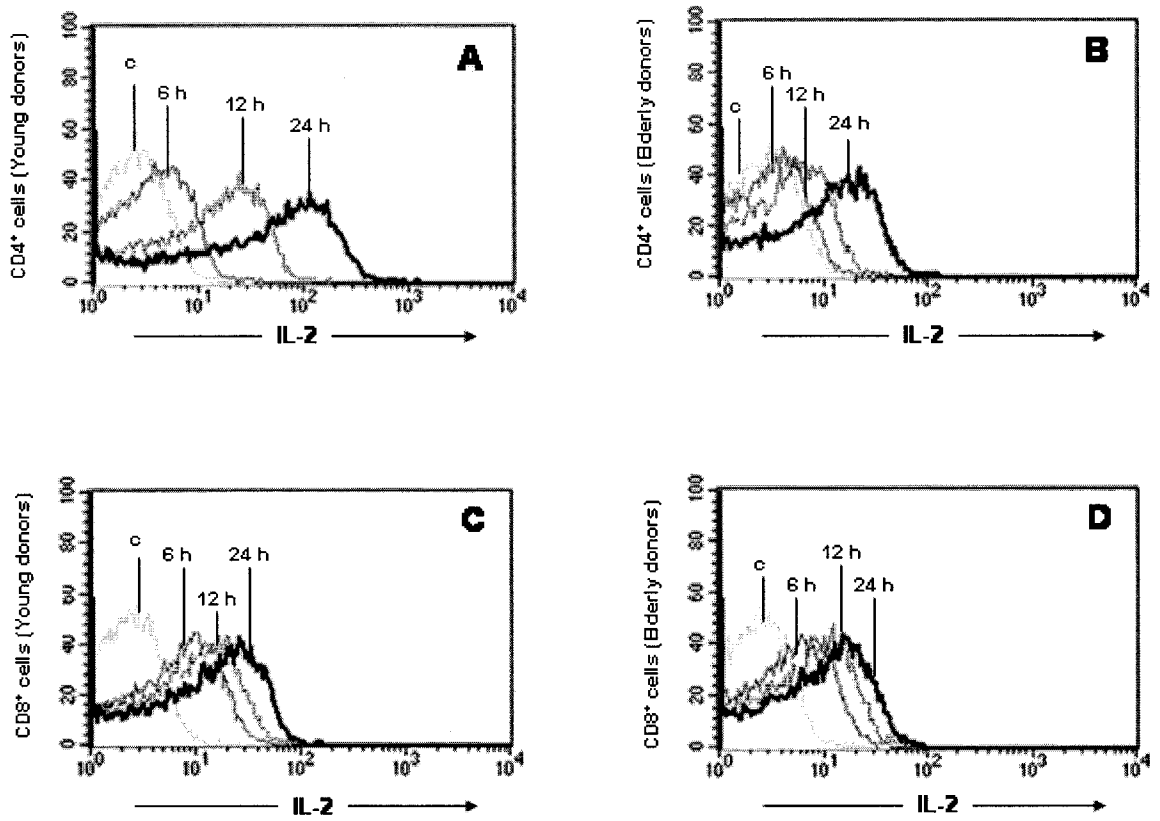


FIGURE 1

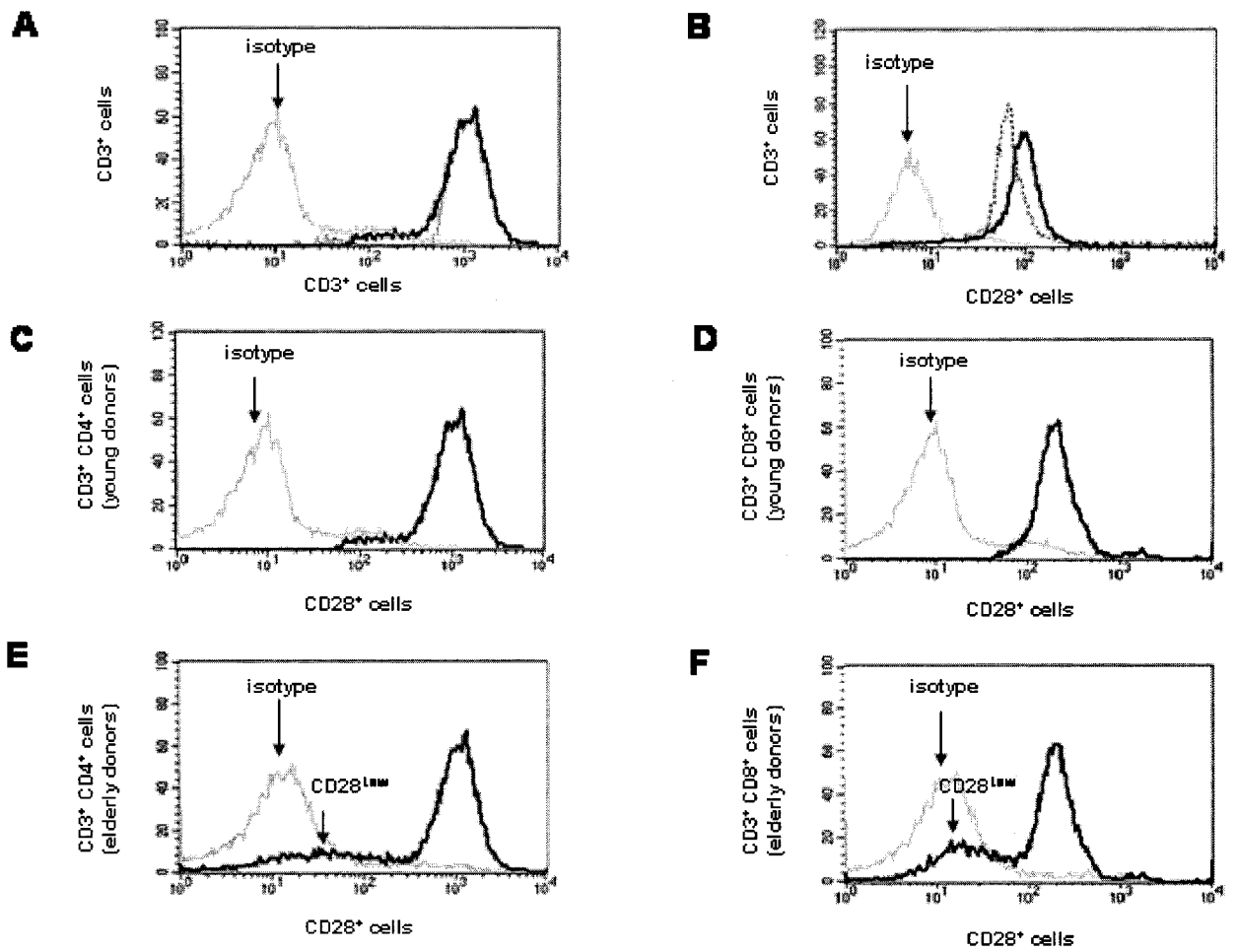


FIGURE 2

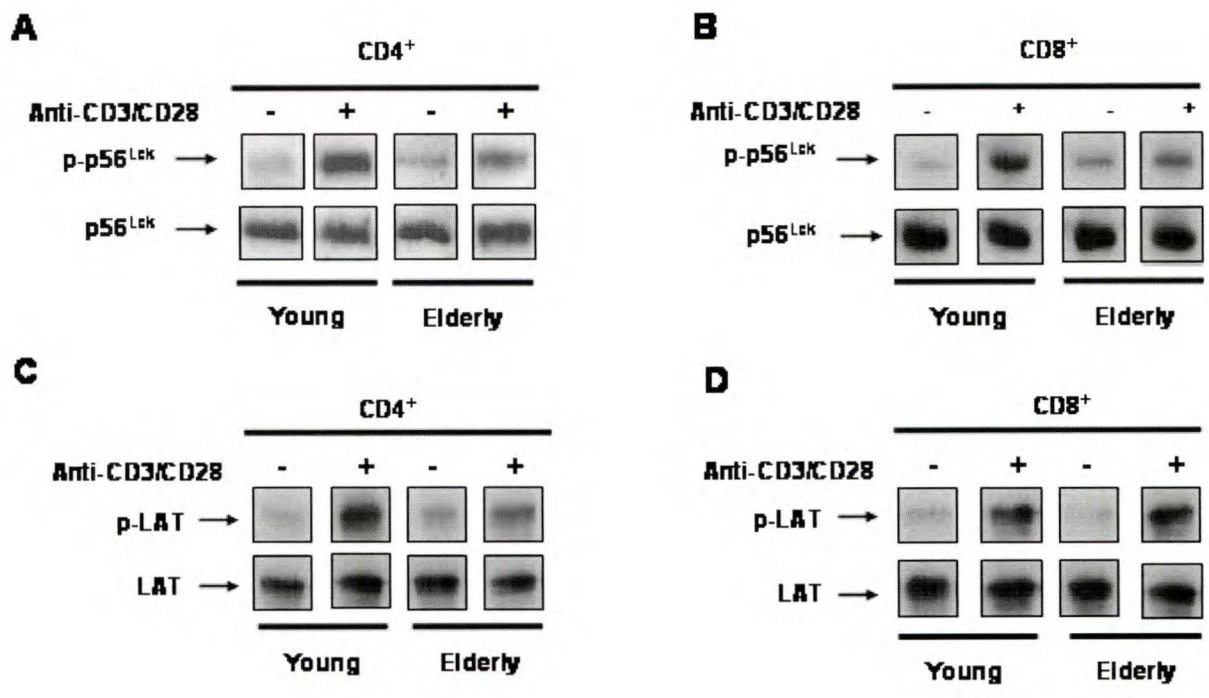


FIGURE 3

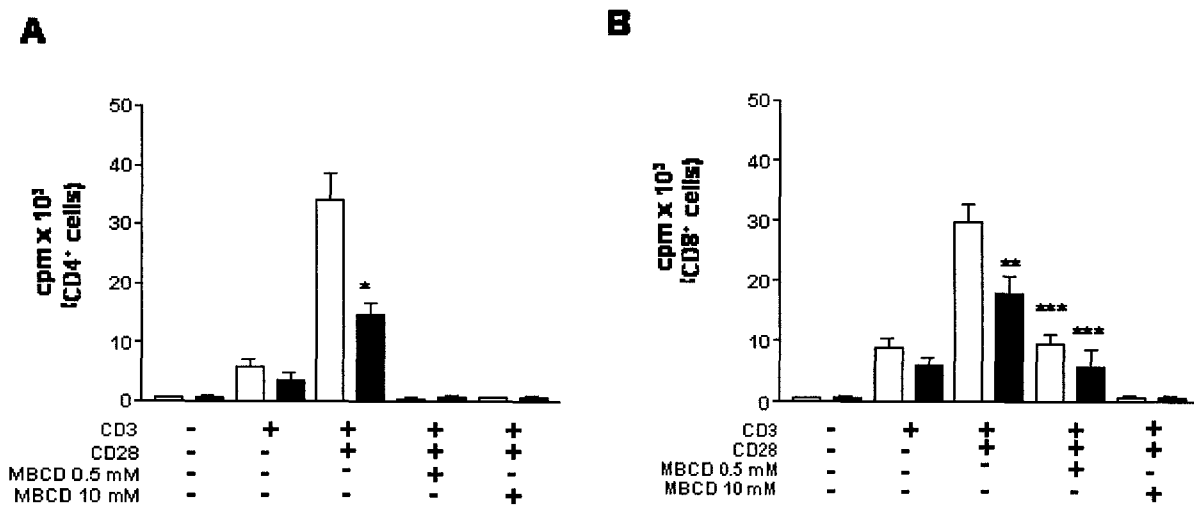


FIGURE 4

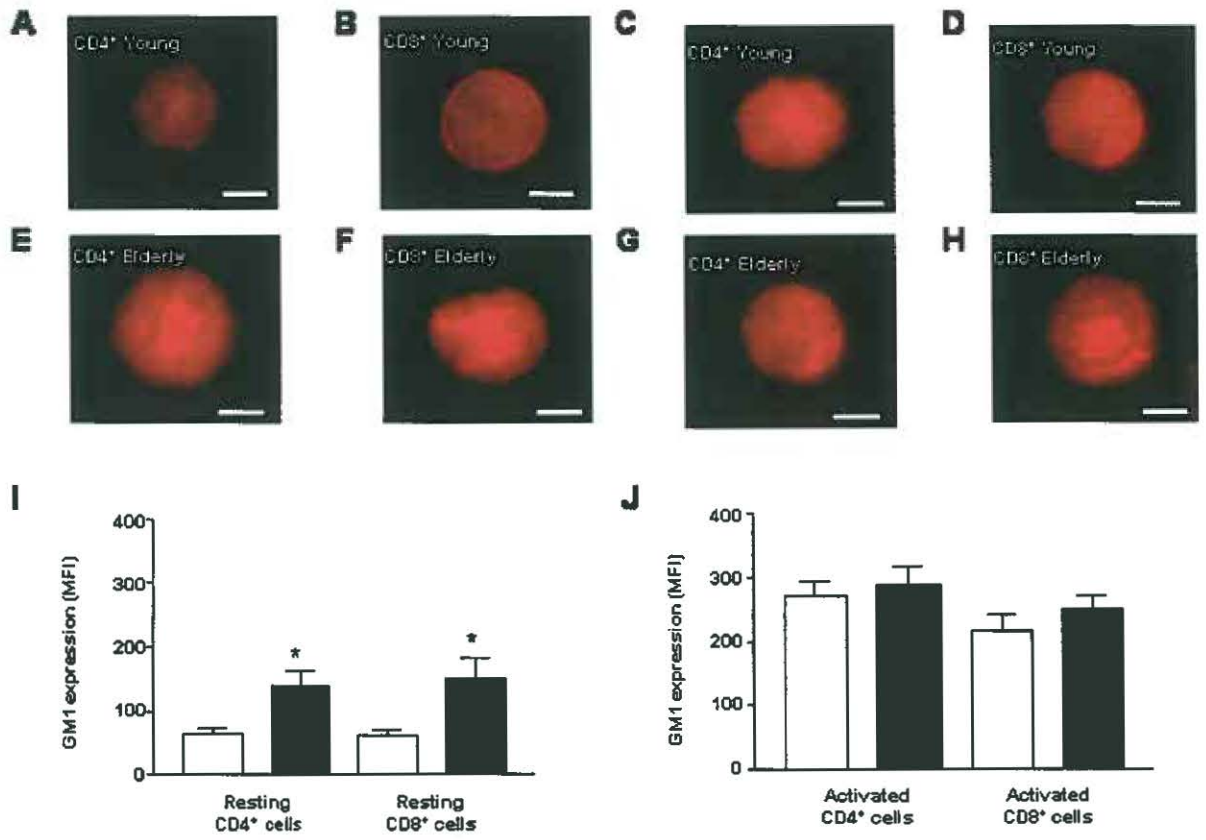


FIGURE 5

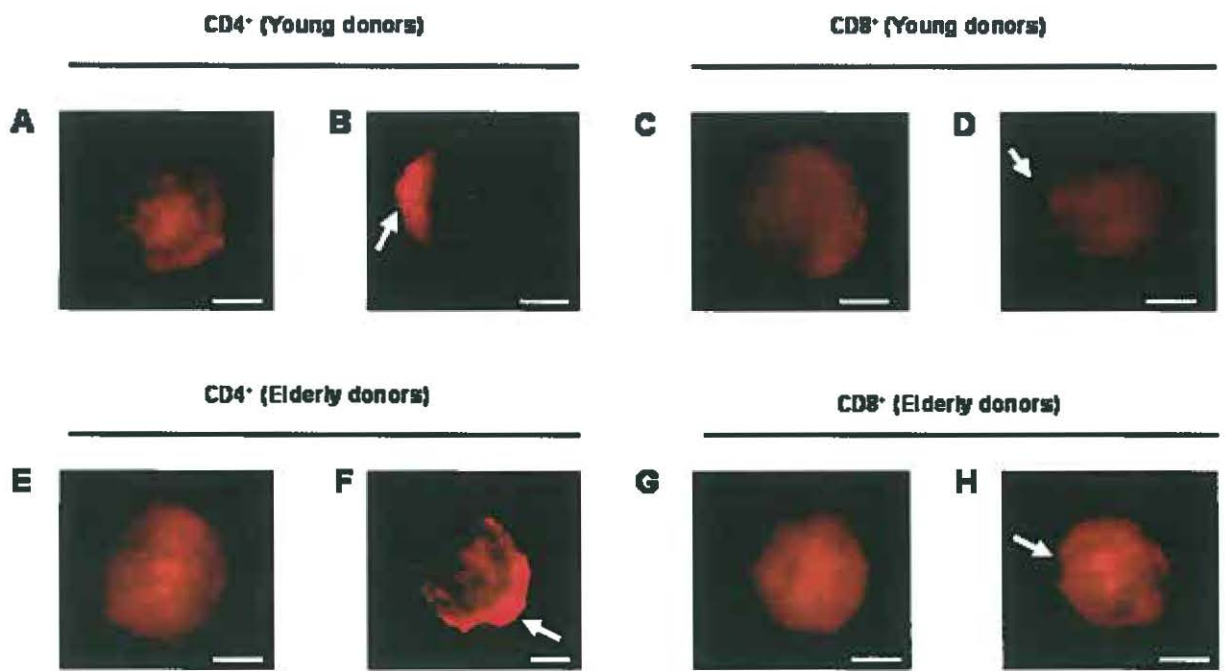


FIGURE 6

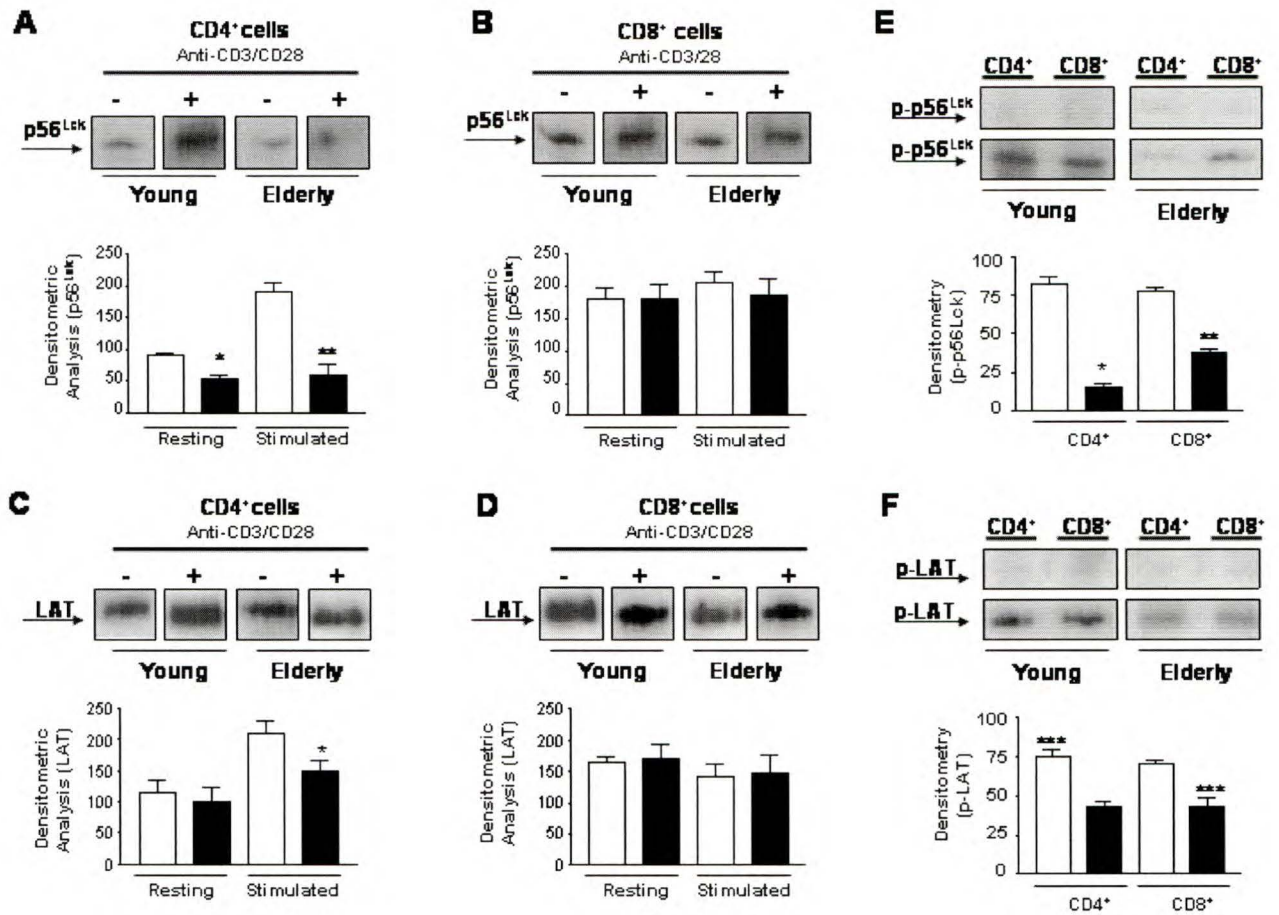
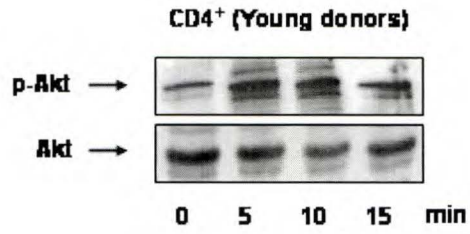
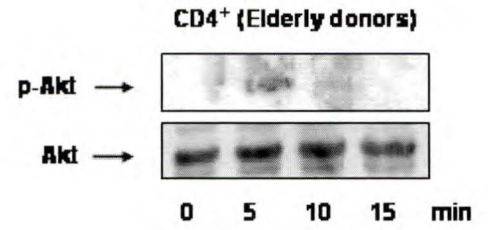
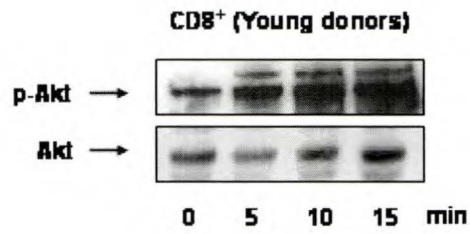
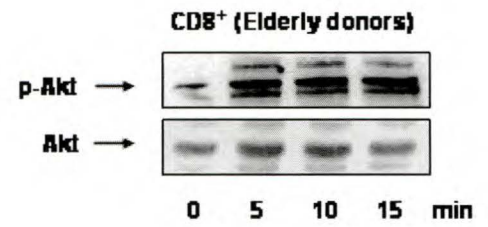


FIGURE 7

A**B****C****D****FIGURE 8**

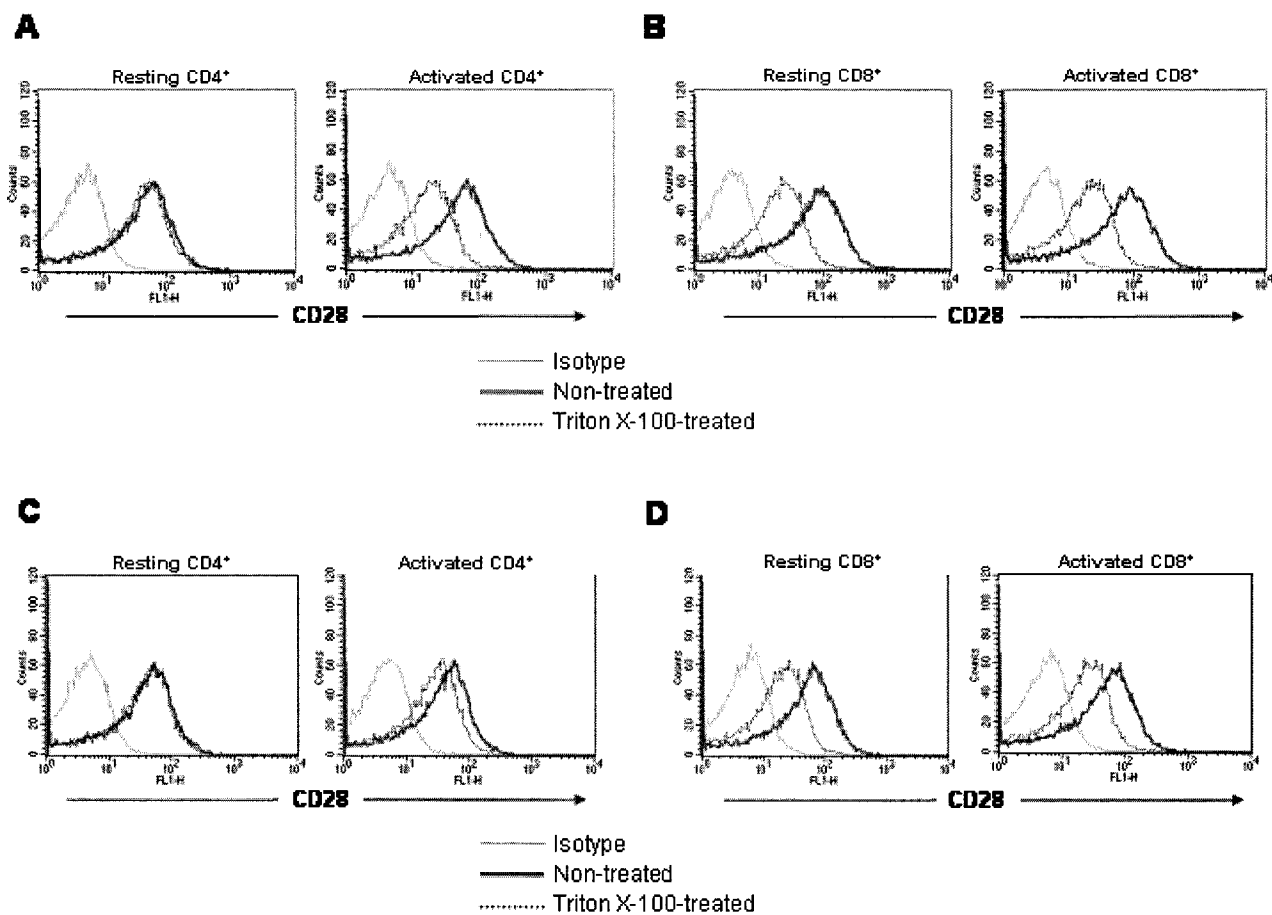


FIGURE 9

6. DISCUSSION

6.1 Inflam-Aging

La personne âgée subit des infections répétées et met plus de temps à se rétablir d'une infection, même bénigne. L'inflammation chronique des sujets âgés serait en parti responsable de ce phénomène (*Franceschi et al. 2000*). En effet, le statut pro-inflammatoire des personnes âgées même s'il est faible (« low-grade inflammation ») crée un environnement défavorable à la réponse immunitaire (*Bruunsgaard, 2002*). L'Inflam-Aging se traduit par une augmentation de la concentration circulante de TNF- α , interleukine-6. Cette dernière, responsable de la phase aiguë de la réponse immune, va perturber les interactions cellulaires (*Brod, 2000*). L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans la circulation va placer les cellules dans un environnement pro-inflammatoire. Les lymphocytes, très sensible aux changements externes, vont donc se trouver dans un état de stress chronique. La chronicité de ce stress va engendrer le « hormesis ». Dans certains cas une stimulation chronique ou répétée (« hormesis ») va rendre les cellules plus alertes à une prochaine stimulation (*Rattan, 2004; Hercus et al. 2003*). Dans d'autres cas, ces stimulations vont exaspérer la cellule et épuiser ses capacités à répondre. C'est ce qui pourrait se passer avec les lymphocytes T dans le cas du vieillissement. Les stimulations antigéniques, cytokiniques en plus des attaques radicalaires répétées vont cibler les organes et cellules de l'organisme incluant les lymphocytes T. Ce sont ces conséquences que nous observons dans les données du Manuscrit I, présentées dans cette thèse.

6.2 Immunosénescence

L'étude du vieillissement biologique a permis de mettre en évidence plusieurs changements dans l'organisme et dans le système immunitaire. Plusieurs types cellulaires sont touchés par

l'immunosénescence (*Fulop et al. 2004; Mocchegiani et al. 2004; Grewe et al. 2001*). Actuellement, il est évident que les lymphocytes T sont les cellules les plus affectées par le vieillissement (*Castle, 2000*). La plupart des études ont montrés des déficiences dans la capacité de ces lymphocytes T à proliférer ainsi qu'à produire l'interleukine-2. L'IL-2 est la cytokine de prédilection des lymphocytes T. C'est la quantité d'IL-2 qui va déterminer l'intensité et la durée de la réponse lymphocytaire. L'IL-2 à un effet paracrine et autocrine puisque les lymphocytes T expriment le récepteur à l'IL-2 (CD25) lorsqu'ils sont activés. La production d'IL-2 est donc un paramètre important et un marqueur de la capacité des lymphocytes T à répondre à un challenge antigénique. Dans le cas de l'étude des lymphocytes T avec le vieillissement, la communauté scientifique spécialisée dans l'immunosénescence est d'accord avec le fait que les lymphocytes T humains perdent la capacité à produire l'IL-2 (*Ginaldi et al. 1999*) lors de la stimulation du TCR et du CD28. Le vieillissement s'accompagnant de la diminution d'expression du CD28 (*Fagnoni et al. 1996*), de nombreux groupes pensent que c'est la perte du CD28 qui est responsable de l'immunosénescence. Cette perte va être parallèle à la perte des télomères, ce qui vient encore ajouter du crédit à cette hypothèse. Cependant, la perte des télomères est supposée survenir lors des divisions cellulaires. Or les cellules naïves de la personne âgée ne sont pas supposé subir de division donc cela laisse supposer que la perte du CD28 ne reflète pas la population lymphocytaire totale mais un sous-type de lymphocyte T, les cellules mémoires. Malgré l'impact que peut avoir l'immunosénescence, peu d'études sur le sujet sont menées. De nos jours il est accepté que ce sont les cellules CD8⁺ qui subissent la perte du CD28. Toutefois, l'immunosénescence a surtout considéré les cellules CD4⁺ comme étant les responsables des défauts immunitaires. Donc la perte du CD28 par les cellules T CD8⁺ serait un marqueur sans conséquence majeure dans leurs

fonctions, alors que l'immunosénescence cause des dommages importants dans les fonctions des cellules T CD4⁺.

7. Radeaux lipidiques et vieillissement

7.1 L'augmentation du cholestérol membranaire

Nous avons montré dans le manuscrit I que les radeaux lipidiques subissent des modifications avec le vieillissement. Ces modifications incluent une augmentation du cholestérol ainsi qu'une diminution de la fluidité des radeaux lipidiques chez les lymphocytes T CD3⁺. La rigidité membranaire est un phénomène connu, même dans le domaine du vieillissement *in vitro*, cependant c'est la première démonstration de la baisse de fluidité des radeaux lipidiques et surtout de l'augmentation de leur contenu en cholestérol *in vivo*. Il est important de préciser ici que la fluidité est diminué de l'ordre de 10 à 20 % lors du vieillissement chez les lymphocytes T. Un changement de 10 à 20 % d'un paramètre n'implique pas forcément un impact sur la fonctionnalité. Il arrive par exemple que des paramètres sanguins puissent être influencés jusqu'à 100 % sans pour autant avoir un impact sur les fonctions de l'organisme. Cependant, la fluidité est mesurée via l'anisotropie. Cette anisotropie est une valeur arbitraire qui ne peut pas évoluer au delà de 50 % auquel cas les fonctions cellulaires ne sont plus assurées et la cellule va pour mourir. C'est ce qui arrive lors de l'apoptose (*Trubiani et al., 2005*) ou lors de la nécrose où la membrane est fendue (*Rubin et al, 1982*).

Cette augmentation du cholestérol membranaire est inexplicée. En effet, les donneurs sont sélectionnés selon le protocole SENIEUR (*Lighart et al. 1984*), leur état de santé ne doit laisser couvrir aucune maladie. Ainsi les patients souffrant de démence, de troubles cardiaques, d'infections ne sont pas admis à l'étude. De même que les patients en rétablissement d'un cancer,

souvent traité par la chimiothérapie. Aussi, les donneurs ne doivent prendre aucune médication de prescription telle que les statines qui ont des effets sur le système immunitaire et notamment les lymphocytes T. Les donneurs à jeûn sont aussi contrôlés pour leur formule sanguine, le taux de cholestérol total, de HDL, de LDL et de triglycérides. Le taux de protéine C réactive est aussi mesuré afin de détecter une éventuelle inflammation ainsi que le taux de PSA chez les donneurs de sexe masculin afin de déceler une éventuelle perturbation du fonctionnement prostatique. Donc malgré la conformité de tous ces paramètres chez les donneurs ayant participé à l'étude, l'augmentation du cholestérol chez les lymphocytes T existe. De plus, elle est spécifique à ce type de cellule puisque les mêmes études ont été menées chez les neutrophiles et aucun changement significatif n'a pu être décelé (non publié). Une autre étude a démontré l'augmentation du cholestérol de la membrane des cellules nerveuses au niveau cérébrale (*Wood et al. 2002*). Cela laisse supposer que l'augmentation du cholestérol membranaire est spécifique aux cellules à longue durée de vie, comme les neurones qui durent toute une vie et les lymphocytes, comme les lymphocytes mémoires pouvant persister plusieurs décennies. Les neutrophiles sont des cellules à courte durée de vie, en 24 heures elles entrent en apoptose. Cela vient donc supporter cette hypothèse. Maintenant pourquoi le cholestérol membranaire n'est pas régulé correctement avec le vieillissement ?

7.2 Métabolisme du cholestérol cellulaire et vieillissement

Plusieurs hypothèses sont possibles en regard du métabolisme du cholestérol cellulaire. Premièrement, il peut s'agir d'une augmentation dans la production du cholestérol par les cellules via la surexpression ou l'augmentation de l'activité de la HMG-CoA réductase. Cette hypothèse n'est pas validée par les résultats de la littérature (*Stulnig et al. 1995*) qui prouvent que l'activité de

cette enzyme ne change pas au cours du vieillissement. Aussi, lorsque le cholestérol est en excès, l'enzyme ACAT va l'estérifier et le stocker dans des vésicules intracellulaires (*Chang et al. 2001*). Un défaut dans l'activité de la ACAT est possible (*Cao et al. 1996*) d'autant plus que cette estérification sert de purification pour la cellule. En effet, le cholestérol est un lipide nécessaire à la survie et au métabolisme lymphocytaire, mais un excès est toxique et donc néfaste. Une autre hypothèse crédible est la dérégulation du transport inverse du cholestérol. Ainsi l'échange du cholestérol entre les HDL et la membrane lymphocytaire (*Xu et al. 1992 a*) pourrait être défaillant. Cette défaillance peut intervenir à deux niveaux, soit c'est la membrane qui ne reconnaît pas les HDL et qui a du mal à initier cet échange, soit les HDL ont des propriétés différentes avec le vieillissement (*Barter, 2004*) qui font que même si cet échange a lieu, il se fait de manière moins intense comparativement à des sujets jeunes.

Un des points important est donc de savoir si les HDL possèdent un récepteur spécifique chez les lymphocytes (*Xu et al. 1992 b*). Si tel est le cas, on pourrait comprendre que des défauts de signalisation dans les voies du potentiel récepteur des HDL pourraient expliquer des défauts dans le métabolisme du cholestérol.

À ce jour, nous avons pu déterminer que l'échange de cholestérol entre la membrane et les transporteurs se fait via les radeaux lipidiques (non publié). En effet, les HDL et l'apolipoprotéine-A vont s'associer aux lipides des radeaux lipidiques (*Drobkin et al. 2002*). Cette association va induire un premier échange de cholestérol des radeaux lipidiques vers les transporteurs (*Fielding et al. 2001*). Seulement 15 % du cholestérol membranaire total va être extrait par les HDL, cependant ce « low pool » est extrait très rapidement, en moins de 120 minutes avec un pic à 60 min. C'est l'extraction du cholestérol des radeaux lipidiques qui va être la condition pour que le cholestérol des autres domaines de la membrane soit extrait (*Drobkin et al. 2002*). Cette deuxième extraction,

qui représente 85 % du cholestérol « high pool » va cependant nécessiter beaucoup plus de temps, de 12 à 48 heures. Elle nécessite aussi la participation de la ATP-Binding-Cassette-A1, c'est un mécanisme qui nécessite plus d'énergie de la part de la cellule. Ainsi, le « low-fast pool » va induire l'extraction du « high-slow pool » de cholestérol (*Drobkin et al. 2002*). Une modification du contenu en cholestérol des radeaux lipidiques va donc initier un mécanisme de régulation au niveau de la cellule en entier. On sait maintenant que la fluidité ainsi que l'organisation lipidique peuvent influencer les mouvements protéiques, les échanges lipidiques ainsi que les mécanismes de signalisation. On peut donc supposer que la rigidité membranaire avec le vieillissement peut aussi interférer avec ces mécanismes d'échanges du cholestérol.

7.3 Le stress oxydatif et le transport du cholestérol avec le vieillissement

Les HDL sont des transporteurs qui vont permettre de prendre le cholestérol cellulaire et plasmatique afin de le mener jusqu'au foie où il sera stocké via les chylomicrons. Des études *in vitro* ont montrés que pour un même degré d'oxydation les HDL de personnes âgées présentent plus de dommages oxydatifs que les HDL de personnes jeunes (*Khalil et al., 1998*), des études réalisées chez la souris présentent les mêmes résultats (*Aviram et al. 1998*). Ainsi, les HDL perdent de leurs capacités anti-oxydantes avec le vieillissement. On peut supposer que le stress oxydatif normal présent *in vivo* va induire une plus grande susceptibilité des HDL à l'oxydation au cours du vieillissement (*Khalil et al. 1998*). L'oxydation des lipides composants les HDL va induire un changement dans la disposition et la conformation de ces HDL. Cela peut être le cas de l'apolipoprotéine A1 (Apo-A1) qui perd alors son potentiel de transporteur (*Gardner et al. 2000*). Les HDL sont connues pour être anti-inflammatoires (le « bon » cholestérol), de part le rôle qu'elles jouent dans l'athérosclérose contrairement au LDL (le « mauvais » cholestérol).

Cependant, lors d'une inflammation chronique, les attaques radicalaires peuvent affecter la fonction des HDL qui peuvent devenir pro-inflammatoire (*Van Lenten et al. 2001*). C'est ce qui fait de l'athérosclérose un processus long et chronique. Cela nous laisse supposer que les HDL des personnes âgées sont dotées de pouvoirs anti-oxydant amoindris ce qui pourrait les fait tendre vers un phénotype pro-inflammatoire plutôt que la normale et qui expliquerait qu'ils ne peuvent exercer leur rôle de transporteur de manière adéquate.

Si maintenant on suppose que la partie extrinsèque du transport se fait de manière adéquate par les HDL mais que c'est une cause intrinsèque à la cellule, on peut penser à l'état du cholestérol dans la membrane des lymphocytes. En effet, les HDL pour garder leur phénotype anti-inflammatoire ne reconnaissant que le cholestérol tel qu'il est à l'état natif. Si le cholestérol a subi des modifications telle que l'oxydation, les HDL ne pourront possiblement pas le reconnaître et le transporter. Les lipides oxydés tel que le 25-hydroxycholesterol sont reconnus par les récepteurs dit « scavenger » qui n'ont aucune spécificité et peuvent même accepter par exemple des LDL oxydés (*Boullier et al., 2001*). Nous n'avons pas pu mesurer l'état d'oxydation du cholestérol de la membrane des lymphocytes T, nous ne pouvons donc pas valider par des résultats expérimentaux cette hypothèse. Cependant, comme les attaques radicalaires ciblent les membranes en premier lieu, on peut supposer que cette hypothèse soit vraie. D'autant plus que plusieurs preuves sont maintenant présentes pour appuyer notre hypothèse (*Christ et al. 1993; Kato et al. 1998; Nguyen et al. 2003*). L'étude de la quantité de cholestérol dans les sous-populations de lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ a permis de démontrer l'augmentation du cholestérol dans ces deux populations avec le vieillissement. Cependant, aucune différence dans ce paramètre n'a été décelé entre ces

populations (Manuscript IV). La diminution de fluidité ainsi que l'augmentation de cholestérol des radeaux lipidiques touchent donc indifféremment les cellules CD4⁺ et CD8⁺.

8. Fonctions des radeaux lipidiques avec le vieillissement

Dans le Manuscript II, nous avons démontré que la coalescence des radeaux lipidiques induite par des billes enduites d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 est significativement diminuée lors du vieillissement. Cela laisse supposer que l'activation peut en être affectée. Lors de ces expériences, la coalescence n'était pas visible pour toutes les cellules, cependant pour les cellules où un regroupement des radeaux lipidiques GM1-positif était significatif, la coalescence n'était que partielle pour les lymphocytes T de personnes âgées. Nous avons pu corrélérer la diminution de coalescence avec la quantité de molécules de signalisation dans les radeaux lipidiques lors du vieillissement.

p56^{Lck} est moins associé aux radeaux lipidiques à l'état basal. Il est connu que lors du vieillissement, l'association entre p56^{Lck} et les corécepteurs peut être défaillante (*Tinkle et al. 1998*). Cela peut expliquer pourquoi cette molécule est moins associée aux radeaux lipidiques puisque les corécepteurs sont associés aux radeaux lipidiques (*Balamuth et al. 2004; Arcaro et al. 2001; Fragoso et al. 2003*). Cela peut aussi expliquer pourquoi LAT est associé pareillement aux radeaux lipidiques des cellules quiescentes avec le vieillissement. En effet, LAT étant déjà associé à la membrane, seul l'état de palmitoylation va moduler son association aux radeaux lipidiques (*Shogomori et al. 2005*).

Nous montrons que le recrutement de p56^{Lck} et LAT au niveau des radeaux lipidiques est défaillant lors de l'activation lymphocytaire. La quantité de molécules activés dans les radeaux lipidiques s'en trouve donc diminuée. p56^{Lck} est une molécule cytosolique qui est associée au corécepteur

CD4 et CD8 et qui est recrutée dans les radeaux lipidiques lors de l'activation. Par contre, LAT est une molécule transmembranaire qui ne possède pas d'activité intrinsèque mais sert de plateforme de signalisation à d'autres molécules (*Harder et al. 2000*). De là, va partir une myriade de signaux qui va converger vers la prolifération et la production d'IL-2.

L'activation des lymphocytes T va initier un cycle des radeaux lipidiques. Ce cycle inclus des modifications post-transcriptionnelles telle que la palmitoylation des molécules de signal ce qui va induire leur association aux radeaux lipidiques. La fin de l'activation lymphocytaire se traduit par la dé-palmitoylation des molécules activatrices afin de les dissocier des radeaux lipidiques (*Fielding et al. 2004*). Ainsi, le défaut de recrutement de LAT aux radeaux lipidiques avec le vieillissement peut être dû à un défaut dans ce phénomène de palmitoylation. Des études ont clairement démontré qu'un mutant de LAT ne possédant pas de site de palmitoylation ne s'associait pas aux radeaux lipidiques (*Torgensen et al. 2001*). Cette hypothèse est donc valable, cependant nous n'avons pas pu mesurer ce paramètre au laboratoire.

Une autre hypothèse serait l'activité de phosphatases inhibitrices de l'activation lymphocytaire. Il est connu que le CD45 joue un rôle primordial dans l'activation de p56^{Lck} en libérant son site d'inhibition. L'activité de CD45 ne change pas lors du vieillissement (*Pawelec et al. 2001*), cependant nous avons cherché à déterminer si une localisation différentielle pourrait expliquer une activité déplacée vers les radeaux lipidiques de la membrane. Cependant, comme la plupart des phosphatases, le CD45 ne se localise pas dans les radeaux lipidiques. Cette hypothèse est donc réfutée. Malgré tout, si on met en relation le chapitre précédent sur l'oxydation avec ce chapitre on peut voir que l'inactivation de CD45 par oxydation à pu rendre des lymphocytes T anergiques tel que démontré par Rider et al. (*Rider et al. 2003*). Il est donc possible que dans l'immunosénescence les phosphatases jouent un rôle sous-estimé. Les phosphatases vont réguler

l'intensité ainsi que la durée de l'activation lymphocytaire (*Mustelin et al. 2003*). Leur nombre est grand et la liste ne cesse de s'allonger, pour cette raison il faut rester prudent dans le cas où une phosphatase aurait des sites de palmitoylation qui lui permettrait de s'associer aux radeaux lipidiques (*Fawcett et al. 2005*).

8.1 Fonctions des radeaux lipidiques avec le vieillissement : CD4⁺

Le défaut dans l'association des molécules de signalisation aux radeaux lipidiques a aussi été étudié dans les sous-populations lymphocytaires CD4⁺ et CD8⁺. Nous avons démontré que les cellules CD4⁺ étaient plus touchées par les altérations dans le recrutement de p56^{Lck} et LAT avec le vieillissement comparativement aux cellules CD8⁺. Aussi, la coalescence des radeaux lipidiques est déficiente pour les cellules CD4⁺ de la personne âgée. Les études immuno-gérontologiques se sont principalement intéressées aux cellules CD4⁺ (*Pawelec et al. 1996; Ginaldi et al. 1999*) pour démontrer les défaillances du système immunitaire avec le vieillissement (+ 65 ans). Ici nous apportons notre contribution à la compréhension de l'immunosénescence en montrant dans le Manuscrit IV que les défauts de signalisation des voies du TCR chez les cellules CD4⁺ peuvent être dues en partie aux changements des propriétés des radeaux lipidiques. Cela explique en partie pourquoi ces cellules ne sont pas capables de produire l'IL-2 à un niveau suffisant pour induire une prolifération semblable à celle des personnes jeunes (18-25 ans). Nous montrons également qu'outre l'augmentation du cholestérol, la quantité de ganglioside M1 est augmentée avec le vieillissement. Cette augmentation est inexplicée mais peut refléter un défaut dans le cycle des radeaux lipidiques (*Tuosto et al, 2001*). Nous avons émis l'hypothèse que lors de ce cycle, les étapes de palmitoylation (*Shogomori et al. 2005*) soient défectueuses expliquant le défaut d'association des molécules de signalisation. Il est probable que le cycle soit globalement

défectueux et que les lymphocytes régulent moins bien le « turn-over » des radeaux lipidiques avec le vieillissement. Cette accumulation de GM1 vient de paire avec celle du cholestérol et peut expliquer que certains lipides subissent des modifications telles que l'oxydation qui va déterminer leur résidence dans la membrane (*Spiteller et al. 2002*).

8.2 Fonctions des radeaux lipidiques avec le vieillissement : CD8⁺

Tout comme les lymphocytes CD4⁺, avec le vieillissement, les lymphocytes CD8⁺ subissent ces mêmes modifications au niveau de la membrane. Cependant, nos études ont montré que les conséquences de ces modifications sur les lymphocytes CD8⁺ sont significativement moins importantes. En effet, les lymphocytes CD8⁺ de personnes âgées sont capables de produire l'IL-2 pratiquement au même niveau que ceux des sujets jeunes. Un fait intéressant est que les lymphocytes CD8⁺ produisent plus rapidement l'IL-2 que les CD4⁺, cela laisse supposer que ces cellules sont plus sensibles à la même stimulation (*Grossmann et al. 1989*). Lors de l'analyse de la composition des radeaux lipidiques nous avons pu déterminer que les lymphocytes CD8⁺ possèdent, à l'état basal, une quantité de p56^{Lck} et LAT aussi importante que celle présente dans les cellules CD4⁺ activées. Lors de l'activation, il n'y a pas de recrutement significatif, ce qui laisse supposer que les lymphocytes CD8⁺ possèdent une machinerie de radeaux lipidiques pré-formée, fonctionnelle. Ceci est en accord avec une étude menée parallèlement à la notre (*Kovacs et al. 2002*). Cela peut expliquer pourquoi les lymphocytes CD8⁺ produisent l'IL-2 plus rapidement (différence significative après 6 heures de stimulation) que les lymphocytes CD4⁺. L'analyse de la composition des radeaux lipidiques des lymphocytes CD8⁺ n'a pas décelé de diminution d'association aussi importante que celle présente chez les lymphocytes CD4⁺ (*Grossmann et al. 1989*) avec le vieillissement.

Ces résultats nous indiquent que les cellules CD4⁺ et CD8⁺ sont touchées différemment lors du vieillissement. Il est difficile d'évaluer l'impact de cette différence sur les fonctions immunitaires lors d'une réponse antigénique. Cependant, on peut supposer que le système s'adapte afin de compenser les défaillances qui peuvent intervenir.

8.3 Signalisation différentielle entre lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺

Pourquoi les lymphocytes CD8⁺ ne sont pas atteints de défaillances dans l'activation des molécules de signalisation alors qu'ils sont atteints des mêmes changements au niveau de la membrane ?

Malgré la présence de gangliosides M1, marqueur spécifique des radeaux lipidiques, les lymphocytes CD8⁺ ne nécessitent pas la coalescence des radeaux lipidiques pour être activés (*Kovacs et al. 2002*). Le fait que les radeaux lipidiques peuvent être pré-formés avant toute activation peut expliquer le fait que la coalescence ne soit pas nécessaire. Il est aussi connu que les cellules CD8⁺ sont plus sensibles à la stimulation, que leur seuil d'activation soit plus bas. Une autre étude a démontré que les cellules CD4⁺CD8⁺ immatures ne nécessitent pas non plus la coalescence des radeaux lipidiques lors de la stimulation antigénique. L'expression du corécepteur CD8 donnerait à la cellule un phénotype « dominant négatif » pour la coalescence des radeaux lipidiques puisque l'expression du corécepteur CD8 chez des cellules CD4⁺ inhibait la coalescence des radeaux lipidiques (*Ebert et al. 2000*). Les cellules CD8⁺ seraient donc dans un état prêt à l'activation alors que les cellules CD4⁺ nécessiteraient le recrutement des molécules de signalisation et la coalescence des radeaux lipidiques pour avoir un niveau d'activation semblable à celui des cellules CD8⁺ (*Kelso et al. 1991*). Sachant cela, les cellules CD4⁺ dont la membrane est plus rigide avec le vieillissement, pourront avoir des difficultés à mettre en oeuvre toute la machinerie des radeaux lipidiques. L'augmentation de la rigidité membranaire des cellules CD8⁺

aurait moins de conséquences sur leur activation puisque les phénomènes de mobilité à travers la membrane ne sont pas sollicités. Cela pourrait expliquer pourquoi les lymphocytes CD8⁺ ne subissent pas de telles altérations dans la signalisation comparativement aux lymphocytes CD4⁺, avec le vieillissement.

L'immunosénescence serait donc en partie liée aux changements dans la composition des radeaux lipidiques avec le vieillissement chez les cellules CD4⁺ alors que les cellules CD8⁺ gardent leurs fonctionnalités (*Grossmann et al. 1989*). J'avais pour objectif de tester la véracité de mon hypothèse voulant que l'altération des radeaux lipidiques soit la cause des défauts de signalisation et elle a été testée avec succès pour les lymphocytes CD4⁺. Les modifications de la membrane n'auraient pas les mêmes effets sur la signalisation des cellules CD8⁺. Le recrutement/coalescence étant absent lors de l'activation des lymphocytes CD8⁺, les modifications de la membrane ne peut les altérer, ce qui permettrait à ces cellules de bien répondre avec le vieillissement. Les lymphocytes CD4⁺ seraient donc plus sensibles à un changement dans la composition des radeaux lipidiques. Cela est conforté par le fait que l'utilisation de la MBCD inhibe complètement la prolifération des lymphocytes CD4⁺ alors que les lymphocytes CD8⁺ sont encore capables de répondre, bien qu'à moindre mesure. Des données émergent en ce sens, puisque la voie des MAPKinases est démontré pour avoir des rôles différents entre cellules CD4⁺ et CD8⁺ (*Rincon et al. 2003*).

8.4 Quelles fonctions des radeaux lipidiques chez les lymphocytes CD8⁺ ?

Le fait que les cellules CD8⁺ possèderaient une macherie de radeaux lipidiques prête à la stimulation peut expliquer la non-nécessité de coalescence. Nous n'avons en effet pas pu visualiser de coalescence des radeaux lipidiques composés de GM1. La stimulation des cellules CD8⁺ va

initier une cascade de signalisation et une activation cellulaire qui va induire la production d'IL-2 et leur prolifération (*Gulzar et al. 2004*). On peut alors supposer que lors de la présentation antigénique les cellules CD8⁺ utilisent un moyen de signalisation autre que celui de la fonction « classique » connu chez les cellules CD4⁺ (*Konig, 2002*). Ce mécanisme peut être différent simplement pour des raisons de différences de fonctions entre cellules CD4⁺ et CD8⁺. Les lymphocytes CD4⁺ ou auxiliaires (*Janeway et al. 1994*) vont avoir un rôle différent des cellules CD8⁺ ou cytotoxiques. L'absence de coalescence peut être attribuée à la fonction cytotoxique des lymphocytes CD8⁺. La sécrétion de granzyme et de perforine ainsi que d'autres composants des granules cytotoxiques nécessite probablement une composition et un rôle de la membrane différent des cellules CD4⁺. Les cellules CD8⁺, afin d'éviter les effets autocrines de l'activité cytotoxiques (attaques radicalaires) doivent posséder des mécanismes de protection puissants alors que les cellules CD4⁺ n'ont pas besoin d'un tel mécanisme (*Hoffman et al. 2002*). Cela pourrait expliquer aussi que les lipides de la membrane des lymphocytes CD4⁺ soient dans un état plus oxydé par le stress oxydatif parce qu'ils sont moins protégés. Cette hypothèse viendrait appuyer notre théorie selon laquelle la même augmentation du cholestérol peut avoir des effets différents entre lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺.

9. Rôle du CD28 dans l'immunosénescence

Nous avons démontré dans le Manuscrit IV que les cellules CD4⁺ présentent une déficience grave de l'activation de la voie du CD28, notamment via le Akt. L'expression du CD28 reste quasiment constante chez ces cellules lors du vieillissement. Or, chez les cellules CD8⁺ qui perdent l'expression du CD28 (*Effros et al. 2005*), l'activation de Akt chez les personnes âgées est similaire à celle observée chez les sujets jeunes. Cela est paradoxal. Afin de déceler le mécanisme

par lequel les cellules CD8⁺ parviennent à garder fonctionnelle la voie du CD28, nous avons déterminé et quantifié l'association du CD28 aux radeaux lipidiques (*Sadra et al. 2004*) de ces deux sous-populations lymphocytaires. Ainsi, le CD28 serait recruté seulement lors de l'activation des cellules CD4⁺ alors que c'est un élément constitutif des radeaux lipidiques des cellules CD8⁺. La quantité de CD28 dans les radeaux lipidiques diminue avec le vieillissement chez les cellules CD4⁺ ce qui expliquerait la diminution d'activation de Akt alors que la quantité de CD28 reste identique dans les radeaux lipidiques des cellules CD8⁺. Ce serait donc la localisation et non pas le niveau d'expression du CD28 qui va déterminer sa signalisation. Cette découverte est confirmée par le fait que les cellules CD8⁺CD28^{low} de personnes âgées sont activables et répondent de manière normale lors de la stimulation (non publié).

10. Modulation du cholestérol membranaire

L'utilisation des cyclodextrines est très largement propagée dans les études des radeaux lipidiques (*Yashiro-Ohtani et al. 2000; Kabouridis et al. 2000*). Afin de démontrer l'association d'une molécule de signalisation aux radeaux lipidiques, on procède à leur dissolution. Cependant, ces études ont écarté tous les effets secondaires que pouvait avoir la cyclodextrine. La cyclodextrine va s'incorporer à la membrane et va y extraire le cholestérol vers le milieu extracellulaire. C'est ce changement dans la quantité de cholestérol qui est utilisé pour désorganiser les radeaux lipidiques. Cependant, il est évident que la cyclodextrine va extraire le cholestérol de manière non spécifique, celui présent dans les radeaux lipidiques et aussi dans les autres domaines de la membrane. En fait, l'utilisation de la cyclodextrine va extraire le cholestérol de toute la membrane sans sélection. Cela laisse donc à penser que toute la membrane va subir des modifications, qui ne sont pas réellement connues dans leur ensemble. La cellule va donc avoir un comportement et une réponse différente

mais surtout une réponse non contrôlée (*Kabouridis et al. 2000*). Nous avons modulé dans le Manuscript III la quantité de cholestérol en utilisant la MBCD à très faible concentration (0.5 mM) afin de moduler les fonctions lymphocytaires. Or, ces études nous ont clairement montré que l'utilisation de la MBCD a des effets néfastes sur les fonctions lymphocytaires. Même si la fluidité membranaire est modulable de façon contrôlée en jouant sur les concentrations et les temps d'incubation avec la MBCD, il n'en reste pas moins que les fonctionnalités ne sont pas modulables dans le même sens. En effet, nous montrons que la composition des radeaux lipidiques est complètement perturbée et la signalisation s'en trouve inhibée. Dans le cas des lymphocytes T CD3⁺ de personnes âgées, nous sommes parvenus à diminuer la quantité de cholestérol membranaire ainsi que d'améliorer la fluidité au même niveau que celui des cellules T de sujets jeunes. Cependant, la signalisation ne s'en trouve pas améliorée, cela peut être attribué aux effets secondaires de la cyclodextrine. Une étude a démontré que la cyclodextrine seule va induire la phosphorylation de plusieurs molécules dont le ERK (*Kabouridis et al. 2000*). Cette activation non-spécifique peut être attribué à un changement dans la composition des radeaux lipidiques. Avec la MBCD, les phosphatases vont avoir accès à des molécules de signalisation auxquelles elles n'ont pas accès habituellement (*Lipardi et al. 2000*). Par exemple, une molécule localisée au niveau des radeaux lipidiques grâce à son état de palmitoylation va donc être protégée des activités des phosphatases. Nous n'avons pas pu vérifier l'état de palmitoylation des différentes molécules de signalisation lors du traitement avec la cyclodextrine et cela reste à prouver. De même pour l'activité des phosphatases, il est possible qu'elle soit modulée par la MBCD.

Mon hypothèse est que la modulation du cholestérol membranaire (augmentation ou diminution) peut induire une modification dans la composition des radeaux lipidiques et peut avoir

des répercussions sur la signalisation et ultimement sur la réponse lymphocytaire. Dans cette optique, il reste une voie de modulation possible des fonctions et de la signalisation lymphocytaire via un mécanisme plus physiologique que la cyclodextrine. Ce mécanisme pourrait être d'extraire le cholestérol par le mécanisme naturel impliquant les HDL (*Puff et al. 2005*). Ces études pourraient mener à une modulation de la fonction lymphocytaire via les radeaux lipidiques. C'est donc une modulation de domaines lipidiques via les lipides avec des conséquences directes sur les fonctions immunitaires. Dans ce sens, étant donné le rôle important des radeaux lipidiques dans la fonction des lymphocytes CD4⁺, les HDL pourraient avoir un effet immuno-modulateur (*Hansson et al. 1989; Khovidhunkit et al. 2004*).

11. Conclusion générale

L'immunosénescence est un phénomène complexe qui nécessite d'étudier le plus de sous-populations lymphocytaires possible. La poursuite de mon étude nécessite notamment l'étude des populations naïves vs. mémoires. Cela permettra de comprendre les changements globaux de la réponse immunitaire avec le vieillissement en identifiant les changements spécifiques à chaque sous-population. Nous avons pu déterminer que des changements apparaissent chez les cellules CD4⁺ notamment par modification de la fonction des radeaux lipidiques. L'identification d'autres marqueurs des radeaux lipidiques permettra sûrement de visualiser un mécanisme de coalescence des radeaux lipidiques chez les cellules CD8⁺. Peut être que la stimulation d'un récepteur autre que le TCR-CD28 peut initier une coalescence. Ou bien qu'un autre corécepteur que le CD28 va induire cette coalescence. De là émerge l'idée d'une hétérogénéité des radeaux lipidiques (*Kiyokawa et al. 2005*). Les radeaux lipidiques sont donc des entités diverses dans une même cellule et sont sûrement encore plus divers d'un type cellulaire à l'autre. La compréhension du rôle

des radeaux lipidiques dans les fonctions lymphocytaires permettra de mieux comprendre le vieillissement du système immunitaire et de l'immunosénescence en générale. Plusieurs maladies associées au vieillissement peuvent avoir des liens avec les radeaux lipidiques, telles que l'athérosclérose et la maladie d'Alzheimer. Il est donc important de comprendre le fonctionnement physiologique des radeaux lipidiques afin de comprendre les changements qui ont lieu dans des cas pathologiques. La modulation des radeaux lipidiques est possible en modulant la composition lipidique (*Li et al. 2005; Ma et al. 2005; Sawamura et al. 2004*). Plusieurs médicaments utilisés de nos jours modulent la réponse immune en modulant les radeaux lipidiques. C'est le cas des statines qui modifient l'association des molécules de signalisation aux radeaux lipidiques (*Hillyard et al. 2004*). Il est donc aussi important de ré-évaluer les effets de certains médicament par l'étude de leur effets sur les radeaux lipidiques.

Mon étude a permis d'apporter en partie, une réponse aux interrogations concernant l'une des trois hypothèses qui expliquent l'immunosénescence, c'est à dire les défauts de signalisation. Mon étude a pu mettre en avant le rôle que les radeaux lipidiques pourraient jouer dans l'alteration de la signalisation avec le vieillissement. Les défauts de fonction des radeaux lipidiques des cellules CD4⁺ peuvent avoir leur place dans l'explication de l'immunosénescence (FIGURE 17). Une condition serait de démontrer l'impact de ces alterations dans la réponse immunitaire *in vivo*. Cela est possible en utilisant un modèle de souris *knock-out* pour un gène encodant pour le ganglioside M1 marqueur des radeaux lipidique. Cela est aussi valable pour le cholestérol puisque récemment des souris viables produisant le desmostérol sont maintenant disponibles (*Wechsler et al., 2003*). Récemment un article de revue sur la signalisation des récepteur de cellules immunitaires (*Hasler et al. 2005*) met l'emphase sur notre hypothèse et sur les Manuscrit I, II et III inclus dans cette thèse. Nos études intègrent les radeaux lipidiques dans le champs de l'immunologie et du

vieillesse. Une récente étude s'est basé sur les résultats présentés dans ma thèse et à voulu tester les conséquences d'une augmentation du cholestérol cellulaire sur les fonctions des lymphocytes T (*Nguyen al., 2004*). Il en est ressortit qu'une augmentation du cholestérol inhibe la mobilisation du calcium intracellulaire suite à la stimulation du TCR et du récepteur de chemokine SDF-1. L'augmentation d'IL-2 ou d'expression de GM1 est ainsi inhibée. Tout récemment, R. Miller, spécialisé dans l'immunosénescence chez les souris, laisse une place importante à nos travaux dans sa revue et met en avant les altérations des radeaux lipidiques comme explication possible de l'immunosénescence (*Sadighi Akha et al., 2005*). Il reste à déterminer quelle place réelle occupent les radeaux lipidiques puisque mon étude a permis essentiellement d'observer les changements dans la fonctions des radeaux lipidiques et de les corrélés et de les intégrer avec nos connaissances actuelles sur l'immunosénescence.

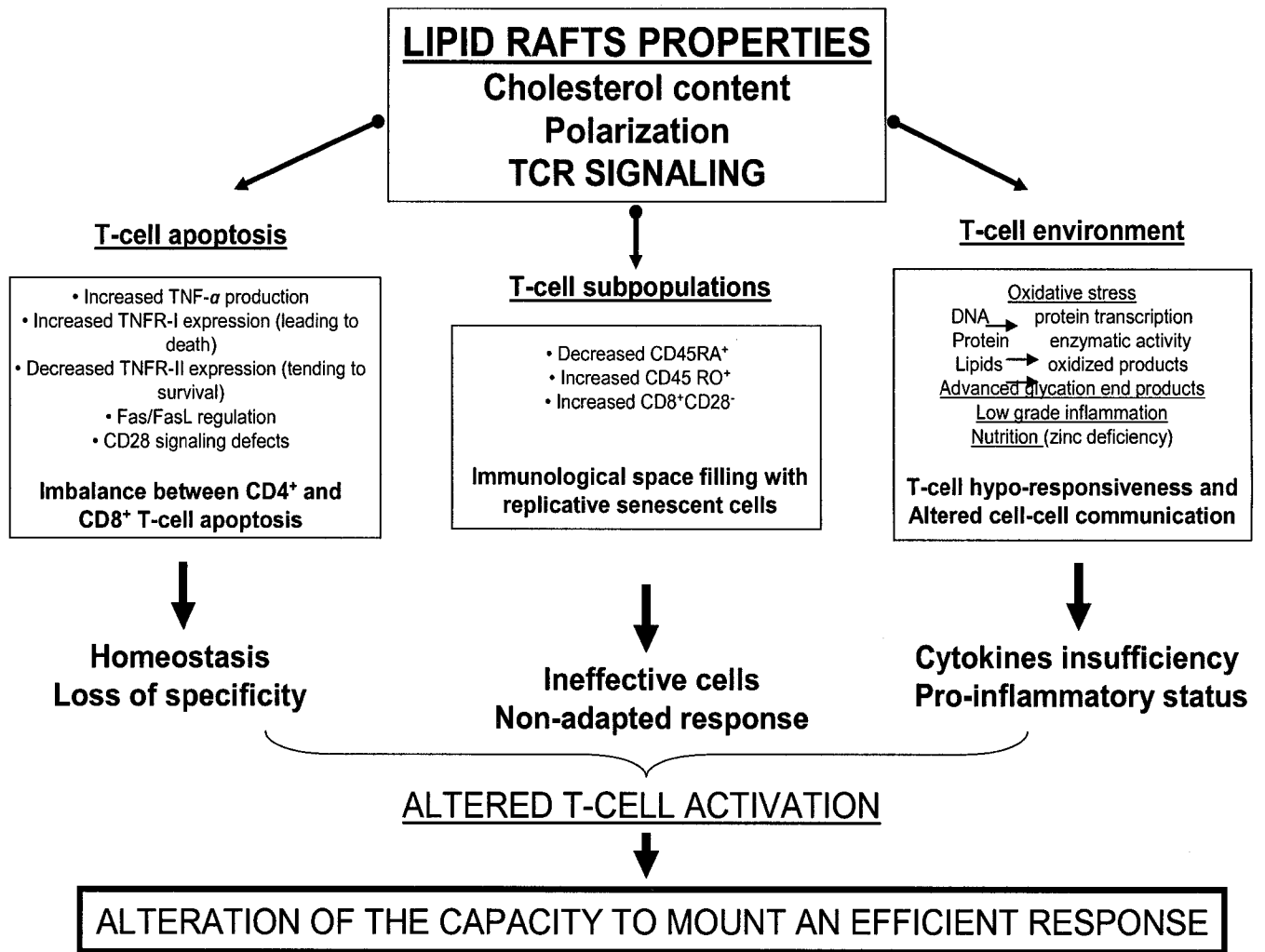


Figure 17. Les radeaux lipidiques dans l'immunosénescence.

(Fülöp et al., non publié)

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tous ceux que j'ai pu côtoyer de près ou de loin et qui ont partagé avec moi mon doctorat, la liste serait trop longue pour tous les énumérer, je vous remercie tous et en particulier :

Je voudrais tout d'abord remercier le Docteur Tamàs FÜLÖP, M.D, PhD, pour son accueil dans son laboratoire au centre de recherche sur le vieillissement. Cet accueil en 2001 m'a vraiment convaincu de la chance unique de pouvoir travailler avec un expert dans le domaine de l'immunologie et du vieillissement. Les qualités scientifiques du Dr. FÜLÖP m'ont permis d'acquérir une expérience unique, enrichissante et qui sera certainement d'une aide précieuse pour mon avenir dans la recherche. Je le remercie vivement pour l'apprentissage auquel j'ai eu droit, tant au niveau scientifique que humain. Je le remercie encore d'avoir partagé avec moi ses expériences, ses connaissances, ses idées et son savoir faire. Son ouverture d'esprit m'a permis de m'épanouir au sein de l'équipe de recherche et d'avoir une liberté rare dans le cheminement de mon doctorat. Je le remercie pour son aide dans les moments difficiles et son soutien humain que j'ai énormément apprécié.

Je voudrais remercier le Docteur Abdelouahed KHALIL, PhD, pour sa co-direction lors de mon doctorat. Je remercie son équipe de recherche avec laquelle j'ai eu de bonnes relations.

Je voudrais remercier le Docteur Gilles DUPUIS, PhD, de sa participation dans mon doctorat. Ses qualités scientifiques indiscutables m'ont permis de me perfectionner. Je le remercie pour les

discussions poussées que nous avons eu et qui m'ont permis de faire avancer et évoluer mon projet de doctorat. Je le remercie aussi pour ses qualités humaines, qui m'ont encouragé et poussé dans mon doctorat. Je remercie son équipe de recherche pour leur aide et leur soutien. Je remercie le Dr. DUPUIS pour ses qualités humaines et son contact facile qui ont contribué à lier une excellente relation.

Je souhaiterais remercier Docteure Nadine DOUZIECH, PhD, pour m'avoir initié et appris tous les rouages du laboratoire et ce, dès mon arrivée à Sherbrooke en octobre 2001. Elle m'a été d'une aide précieuse dès mon arrivée et jusqu'au bout de cette aventure. Je la remercie pour ses qualités humaines, sa bonne humeur et son attention chaleureuse envers moi.

Je voudrais remercier Carl FORTIN (Alias Shishaman), MSc, de son aide pour mes différents projets, de son implication ainsi que de ses qualités humaines. Je le remercie de sa patience envers moi et de son attitude toujours positive ainsi que de son engouement pour nos discussions.

Je voudrais remercier chaleureusement le Docteur Hicham BERROUGUI, PhD, d'avoir partagé avec moi une grande amitié et des discussions qui ont pu m'aider dans la compréhension de plusieurs aspects de mon projet.

Je remercie tous les étudiants au Centre de Recherche sur le Vieillissement ainsi qu'au Programme d'Immunologie de l'Université de Sherbrooke.

Je souhaite remercier les différentes personnes que j'ai croisé lors de mes années d'études et qui m'ont permis d'accroître mon champ de vision au niveau scientifique et humain :

Je remercie le Docteur André CARPENTIER, MD, PhD, et toute son équipe notamment Amélie, pour la valorisation de nos intérêts communs en recherche.

Je remercie aussi le Docteur Graham PAWELEC, PhD, d'avoir porté de l'intérêt à mes recherches et de m'avoir inclus dans plusieurs des projets Européens (IMAGINE, T-CIA) touchant au vieillissement et à l'immunologie.

Je remercie le Docteur Eugenio MOCCHIGIANI, PhD, de nos étroites collaborations (ZINCAGE).

Je remercie le Docteur Georges HERBEIN, MD, PhD, de nos contacts et collaborations.

Je remercie mes amis Saber Gheraïri (La ya jouz), Abdelghani Skandrani (Président VSC), Salah Bousselmi (que Dieu soit avec toi), Kamal Bouarab, pour leur soutien et écoute. Mohammed Majri (DJ Stab), je te remercie de ton soutien constant, de ta confiance, et tout ce qui nous lie, c'est à dire les moments difficiles mais surtout les moments inoubliables, frères a jamais inch'Allah. Bien sûr, je n'oublie pas toute la clique des Minguettes (liste trop longue...) ! Amadou...mon frère je te remercie de ta patience et de ta classe. Ton support durant ces années de froid et de neige nous ont forgés et ton aide a été essentielle. Je te remercie sincèrement et espère te cotoyer aussi longtemps que possible (allez l'OL !).

Je souhaiterais remercier ma grande famille à Lyon (Mounir, Walid, Bilel, ect...vous êtes trop nombreux pour tous vous citer) et bien entendu toute ma famille en Tunisie (notamment Tijani, Wanessa, Jamel, Imed, Jeddi Mizouni, Jedda Zohra, F'tema, Mohammed-Ali) que je n'ai pu voir depuis si longtemps.

Le meilleur pour la fin, je remercie ma famille pour son soutien de tous les instants. Je remercie mon père LARBI Djemaï, ma mère OURABI Akri de m'avoir indiqué la voie depuis mes premiers

pas jusqu'à maintenant et de la confiance qu'ils ont en moi. Je les remercie de leurs sacrifices, leur patience, je vous aime !!! Je remercie mes frères, Ouissam et Jalila (Daycem est né pendant la rédaction de cette thèse), Makrem et Marie, Haïkel Khemistry, Khalil (et son ordinateur) et enfin ma soeur Sandès (zaama la Reine). Je les remercie individuellement et collectivement pour leur aide morale ainsi que d'avoir grandement facilité mes études au Canada. Cette thèse est aussi la votre. Je remercie Karima de son soutien constant et précieux. Pour les moments difficiles passés ici avec moi à Sherbrooke et surtout pour le meilleur à venir inch'Allah. Ma fille Lina est née tout récemment, elle a été une grande inspiration et motivation pour avancer. Elle me remplit de bonheur, que Dieu la protège.

Je dédie cette thèse à toute ma proche famille et à mon frère Jean-Pierre LATUILERIE à qui je pense souvent, que Dieu te comble de miséricorde mon frère, j'aurais voulu que tu sois là pour voir ma Lina. Une pensée particulière pour ma grand-mère Aïcha que je n'ai pu connaître.

Je remercie Dieu de m'avoir offert tout ce que j'ai et tout ce que j'ai pu accomplir.

Sincèrement, merci à tous.

Anis

Bibliographie

- Acuto O., Michel F. (2003) CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol.*, 3:939-951.
- Alexander D.R. (2000) The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function. *Semin Immunol* 349-359.
- Allman D., Miller J.P. (2005) B cell development and receptor diversity during aging . *Curr. Opin. Immunol.* 17:463:467
- Altman A., Villalba M. (2003) Protein kinase C-theta (PKCtheta): it's all about location, location, location. *Immunol Rev.* 192:53-63.
- Anderson G., Harman B.C., Hare K.J., Jenkinson E.J. (2000) Microenvironmental regulation of T cell development in the thymus. *Semin Immunol* 5:457-464.
- Appleman LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA. (2000) CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol.* 164:144-51
- Arcaro A., Gregoire C., Bakker T.R., Baldi L., Jordan M., Goffin L., Boucheron N., Wurm F., van der Merwe P.A., Malissen B., Luescher I.F. (2001) CD8beta endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56(lck) complexes. *J Exp Med* 194:1485-1495.
- Ardail D., Privat J.P., Egret-Charlier M., Levrat C., Lerme F., Louisot P. (1990) Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem.* 265:18797-18802.
- Ardouin L., Bracke M., Mathiot A., Pagakis S.N., Norton T., Hogg N., Tybulewicz V.L. (2003) Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur J Immunol* 3:790-797.

- Arreaza G., Melkonian K.A., LaFevre-Bernt M., Brown D.A. (1994) Triton X-100 resistant membrane complexes from cultured kidney epithelial cells contain the Src family protein tyrosine kinase p62yes. *J Biol Chem* 269:19123-19127.
- Aviram M., Rosenblat M., Bisgaier C.L., Newton R.S., Primo-Parmo S.L., La Du B.N. (1998) Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101:1581-1590.
- Balamuth F., Brogdon J.L., Bottomly K. (2004) CD4 raft association and signaling regulate molecular clustering at the immunological synapse site. *J Immunol* 172:5887-5892.
- Barenholz Y. (2002) Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog Lipid Res* 41:1-5.
- Barenholz Y. (2004) Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. *Subcell Biochem* 37:167-215.
- Barter P. (2004) HDL: a recipe for longevity. *Atheroscler Suppl* 5:25-31.
- Bartosz G., Szabo G., Szollosi J., Szollosi J., Damjanovich S. (1981) Aging of the erythrocyte. IX. Fluorescence studies on changes in membrane properties. *Mech Ageing Dev* 16:265-274.
- Baumann S., Krueger A., Kirchhoff S., Krammer P.H. (2002) Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med* 2:257-272.
- Baumruker T., Prieschl E.E. (2002) Sphingolipids and the regulation of the immune response. *Semin Immunol* 14:57-63.
- Bibby D.C., Davies N.M., Tucker I.G. (2000) Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *Int J Pharm* 197:1-11.

- Boullier A., Bird D.A., Chang M.K., Dennis E.A., Friedman P., Gillotre-Taylor K., Horkko S., Palinski W., Quehenberger O., Shaw P., Steinberg D., Terpstra V., Witztum J.L. (2001) Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 947:214-222.
- Boute N., Jockers R., Issad T. (2002) The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* 23:351-354.
- Brod S.A. (2000) Unregulated inflammation shortens human functional longevity. *Inflamm Res* 49:561-570.
- Bromley S.K., Burack W.R., Johnson K.G., Somersalo K., Sims T.N., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. (2001) The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19:375-396.
- Brunsgaard H. (2002) Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in elderly populations. *Eur Cytokine Netw* 13:389-391.
- Brunsgaard H., Pedersen M., Pedersen B.K. (2001) Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* 8:131-136.
- Buhman K.F., Accad M., Farese R.V. (2000) Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 1529:142-154.
- Burack W.R., Lee K.H., Holdorf A.D., Dustin M.L., Shaw A.S. (2002) Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol* 169:2837-2841.
- Calder P.C. (2002) Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc* 61:345-358.
- Call M.E., Wucherpfennig K.W. (2004) Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol Immunol* 40:1295-1305.

- Camarota L.M., Chapman J.M., Hui D.Y., Howles P.N. (2004) Carboxyl ester lipase cofractionates with scavenger receptor BI in hepatocyte lipid rafts and enhances selective uptake and hydrolysis of cholesteryl esters from HDL3. *J Biol Chem* 279:27599-27606.
- Cancrì M.P. (2005) B cells and aging: gauging the interplay of generative, selective, and homeostatic events. *Immunological Reviews* 205:48-59.
- Cao G., Goldstein J.L., Brown M.S. (1996) Complementation of mutation in acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) fails to restore sterol regulation in ACAT-defective sterol-resistant hamster cells. *J Biol Chem* 271:14642-14648.
- Castle S.C. (2000) Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 31:578-585.
- Chang T.Y., Chang C.C., Lu X., Lin S. (2001) Catalysis of ACAT may be completed within the plane of the membrane: a working hypothesis. *J Lipid Res* 42:1933-1938.
- Cheung H.T., Twu J.S., Richardson A. (1983) (2004) Mechanism of the age-related decline in lymphocyte proliferation: role of IL-2 production and protein synthesis. *Exp Gerontol* 18:451-60. *Clin Invest* 114:1198-1208.
- Crane J.M., Tamm L.K. (2004) Role of Cholesterol in the Formation and Nature of Lipid Rafts in Planar and Spherical Model Membranes. *Biophys. J* 86: 2965-2979.
- Cross N.L. (2004) Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm. *Biol Reprod* 71:1367-1373.
- Danielian S., Fagard R., Alcover A., Acuto O., Fischer S. (1989) The lymphocyte-specific protein tyrosine kinase p56lck is hyperphosphorylated on serine and tyrosine residues within minutes after activation via T cell receptor or CD2. *Eur J Immunol* 19:2183-2189.
- Delves P.J., Roitt I.M. (2000) The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37-49.

- Di Padova C., Bosisio E., Cighetti G., Rovagnati P., Mazzocchi M., Colombo C., Tritapepe R. (1982) 3-Hydroxy-3-methylglutaric acid (HMGA) reduces dietary cholesterol induction of saturated bile in hamster. *Life Sci* 30:1907-1914.
- Dietrich C., Bagatolli L.A., Volovyk Z.N., Thompson N.L., Levi M., Jacobson K., Gratton E. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 80:1417-1428.
- Douziech N., Seres I., Larbi A., Szikszay E., Roy P.M., Arcand M., Dupuis G., Fulop T. Jr. (2002) Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. *Exp Gerontol* 37:369-387.
- Dreja K., Voldstedlund M., Vinten J., Tranum-Jensen J., Hellstrand P., Sward K. (2002) Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1267-1272.
- Drevot P., Langlet C., Guo X.J., Bernard A.M., Colard O., Chauvin J.P., Lasserre R., He H.T. (2002) TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J* 21:1899-1908.
- Drobnik W., Borsukova H., Bottcher A., Pfeiffer A., Liebisch G., Schutz G.J., Schindler H., Schmitz G. (2002) Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic* 3:268-278.
- Dubiski S., Ponnappan U., Cinader B. (1989) Strain polymorphism in progression of aging: changes in CD4, CD8 bearing subpopulations. *Immunol Lett* 23:1-7.
- Dustin M.L., Chan A.C. (2000) Signaling Takes Shape in the Immune System. *Cell* 103:283- 294.
- Dustin M.L., Shaw A.S. (1999) Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 283:649-650.

- Ebert P.J., Baker J.F., Punt J.A. (2000) Immature CD4+CD8+ thymocytes do not polarize lipid rafts in response to TCR-mediated signals. *J Immunol* 165:5435-5442.
- Effros R.B., Dagarag M., Spaulding C., Man J. (2005) The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev.* 205:147-157.
- Eehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K. (2003) Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160:113-123.
- Evans W.J. (1995) What is sarcopenia? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50 Spec No:5-8.
- Hendricks L.C., Heidrick M.L. (1988) Susceptibility to lipid peroxidation and accumulation of fluorescent products with age is greater in T-cells than B-cells. *Free Radic Biol Med* 5:145-154.
- Fagnoni F.F., Vescovini R., Mazzola M., Bologna G., Nigro E., Lavagetto G., Franceschi C., Passeri M., Sansoni P. (1996) Expansion of cytotoxic CD8+ CD28- T cells in healthy ageing people, including centenarians. *Immunology* 88:501-507.
- Fantini J., Garmy N., Mahfoud R., Yahi N (2002) Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimers and prion diseases. *Expert Rev Mol Med.* 20:1-22.
- Fawcett V.C., Lorenz U. (2005) Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus. *J Immunol* 174:2849-2859.
- Fielding C.J. et Fielding P.E. (2004) Membrane cholesterol and the regulation of signal transduction. *Biochem Soc Trans* 32:65-69.
- Fielding C.J., Fielding P.E. (2001) Cellular cholesterol efflux. *Biochim Biophys Acta* 1533:175-189.

- Fragoso R., Ren D., Zhang X., Su M.W., Burakoff S.J., Jin Y.J. (2003) Lipid raft distribution of CD4 depends on its palmitoylation and association with Lck, and evidence for CD4-induced lipid raft aggregation as an additional mechanism to enhance CD3 signaling. *J Immunol* 170:913-921.
- Franceschi C., Bonafe M., Valensin S. (2000) Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine* 18:1717-1720.
- Franceschi C., Bonafe M., Valensin S., Olivieri F., De Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci* 908:244-254.
- Franceschi C., Valensin S., Fagnoni F., Barbi C., Bonafe M. (1999) Biomarkers of immunosenescence within an evolutionary perspective: the challenge of heterogeneity and the role of antigenic load. *Exp Gerontol* 34:911-921.
- Frank S.J., Engel I., Rutledge T.M., Letourneur F. (1991) Structure/function analysis of the invariant subunits of the T cell antigen receptor. *Semin Immunol* 3:299-311.
- Friedl P., Brocker E.B. (2002) TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol Rev* 186:83-89.
- Fulop T. Jr., Douziech N., Goulet A.C., Desgeorges S., Linteau A., Lacombe G., Dupuis G. (2001) Cyclodextrin modulation of T lymphocyte signal transduction with aging. *Mech. Ageing Dev* 122:1413-1430.
- Fulop T. Jr., Larbi A., Douziech N., Fortin C., Guerard K.P., Lesur O., Khalil A., Dupuis G. (2004) Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Ageing Cell* 3:217-226.

- Fulop T. Jr., Larbi A., Dupuis G., Pawelec G. (2003) Ageing, autoimmunity and arthritis: Perturbations of TCR signal transduction pathways with ageing - a biochemical paradigm for the ageing immune system. *Arthritis Res Ther* 5:290-302.
- Fulop T. Jr., Leblanc C., Lacombe G., Dupuis G. (1995) Cellular distribution of protein kinase C isozymes in CD3-mediated stimulation of human T lymphocytes with aging. *FEBS Lett* 375:69-74.
- Fulop T. Jr., Gagne D., Goulet A.C., Desgeorges S., Lacombe G., Arcand M., Dupuis G. (1999) Age-related impairment of p56lck and ZAP-70 activities in human T lymphocytes activated through the TcR/CD3 complex. *Exp Gerontol* 34:197-216.
- Fulop T. Jr., Utsuyama M., Hirokawa K. (1991) Determination of interleukin 2 receptor number of Con A stimulated human lymphocytes with aging. *J Clin Lab Immunol* 34:31-36.
- Fulop T. Jr. (1994) Signal transduction changes in granulocytes and lymphocytes with ageing. *Immunol Lett* 40:259-268
- Fulop T., Larbi A., Wikby A., Mocchegiani E., Hirokawa K., Pawelec G. (2005) Dysregulation of T cell function in the elderly: scientific basis and clinical implications *Drugs Aging*, 22: 1-12.
- Gardner C.D., Tribble D.L., Young D.R., Ahn D., Fortmann S.P. (2000) Population frequency distributions of HDL, HDL(2), and HDL(3) cholesterol and apolipoproteins A-I and B in healthy men and women and associations with age, gender, hormonal status, and sex hormone use: the Stanford Five City Project. *Prev Med* 31:335-345.
- Gardner P. (1989) Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* 59:15-20.
- George A.J., Ritter M.A. (1996) Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 17:267-272.

- Gergely J., Pecht I., Sarmay G. (1999) Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells. *Immunol Lett* 68:3-15.
- Giacconi R., Cipriano C., Albanese F., Boccoli G., Saba V., Olivieri F., Franceschi C., Mocchegiani E. (2004) The -174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Exp Gerontol* 39:621-628.
- Gil D., Schamel W.W., Montoya M., Sanchez-Madrid F., Alarcon B. (2002) Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109:901-912.
- Ginaldi L., De Martinis M., D'Ostilio A., Marini L., Loreto M.F., Martorelli V., Quaglino D. (1999) The immune system in the elderly: II. Specific cellular immunity. *Immunol Res.* 20:109-115.
- Goldberg A.L., Cascio P., Saric T., Rock K.L. (2002) The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39:147-164.
- Gomez C.R., Boehmer E.D., Kovacs E.J. (2005) The aging innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 17:457:462
- Gonzalez P.A., Carreno L.J., Coombs D., Mora J.E., Palmieri E., Goldstein B., Nathenson S.G., Kalergis A.M. (2005) T cell receptor binding kinetics required for T cell activation depend on the density of cognate ligand on the antigen-presenting cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4824-4829.
- Gourley T.S., Wherry E.J., Masopust D., Ahmed R. (2004) Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 16:323-333.

- Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. (1999) The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221-227.
- Grewe M. (2001) Chronological ageing and photoageing of dendritic cells *Clin. Exp Dermatol* 26:608-612.
- Groves J.T., Dustin M.L. (2003) Supported planar bilayers in studies on immune cell adhesion and communication. *J Immunol Methods* 278:19-32.
- Grossmann A., Ledbetter J.A., Rabinovitch P.S. (1989) Reduced proliferation in T lymphocytes in aged humans is predominantly in the CD8+ subset, and is unrelated to defects in transmembrane signaling which are predominantly in the CD4+ subset. *Exp Cell Res.* 180:367-382.
- Gulzar N., Copeland K.F. (2004) CD8+ T-cells: function and response to HIV infection. *Curr HIV Res.* 2:23-37.
- Hansson G.K., Jonasson L., Seifert P.S., Stemme S. (1989) Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 9:567-578.
- Harder T. (2003) Formation of functional cell membrane domains: the interplay of lipid and protein-mediated interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:863-868.
- Harder T., Kuhn. (2000) Selective accumulation of raft-associated membrane protein LAT in T cell receptor signaling assemblies. *J Cell Biol* 151:199-208.
- Harman D. (1992) Free radical theory of aging: history. *EXS* 62:1-10.
- Harman, D. (1956). Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.*, 11, 298-300.

- Hasler P., Zouali M. (2005) Immune receptor signaling, aging, and autoimmunity. *Cell Immunol.* In press.
- Hayflick L. (1968) Human cells and aging. *Sci Am* 218:32-37.
- He H.T., Lellouch A., Marguet D. (2005) Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. *Semin Immunol* 17:23-33.
- Heath W.R., Belz G.T., Behrens G.M., Smith C.M., Forehan S.P., Parish I.A., Davey G.M., Wilson N.S., Carbone F.R., Villadangos J.A. (2004) Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199:9-26.
- Heaton J.P. (2001) Andropause: coming of age for an old concept? *Curr Opin Urol* 11:597-601.
- Hercus M.J., Loeschke V., Rattan S.I. (2003) Lifespan extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. *Biogerontology* 4:149-156.
- Hiltbold E.M., Poloso N.J., Roche P.A. (2003) MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol* 170:1329-13138.
- Hoessli D.C., Ilangumaran S., Soltermann A., Robinson P.J., Borisch B., Nasir-Ud-Din. (2000) Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform. *Glycoconj J* 17:191-197.
- Hoffman R.A., Mahidhara R.S., Wolf-Johnston A.S., Lu L., Thomson A.W., Simmons R.L. (2002) Differential modulation of CD4 and CD8 T-cell proliferation by induction of nitric oxide synthesis in antigen presenting cells. *Transplantation*. 74:836-845.
- Holleran B.J., Barbar E., Payet M.D., Dupuis G. (2003) Differential recruitment of alpha2beta1 and alpha4beta1 integrins to lipid rafts in Jurkat T lymphocytes exposed to collagen type IV and fibronectin. *J Leukoc Biol* 73:243-252.

- Hillyard D.Z., Cameron A.J., McDonald K.J., Thomson J., MacIntyre A., Shiels P.G., Panarelli M., Jardine A.G. (2004) Simvastatin inhibits lymphocyte function in normal subjects and patients with cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 175:305-313.
- Ilangumaran S., Hoessli D.C. (1998) Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J* 335:433-440.
- Isakov N., Altman A. (2002) Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 20:761-794.
- Ishiko N., Loewenstein W.R. (1959) Spontaneous fluctuations in generator potential in a receptor membrane. *Nature* 183:1725-1726.
- Janes P.W., Ley S.C., Magee A.I. (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 147:447-461.
- Janeway C.A. Jr., Bottomly K. (1994) Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell*. 76:275-285.
- Jiang H., Chess L. (2004) An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 114:1198-1208.
- Judd B.A., Koretzky G.A. (2000) Antigen specific T lymphocyte activation. *Rev Immunogenet* 2:164-174.
- Jury E.C., Kabouridis P.S., Flores-Borja F., Mageed R.A., Isenberg D.A. (2004) Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 113:1176-1187.
- Kabouridis P.S., Janzen J., Magee A.L., Ley S.C. (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 30:954-963.

- Kane L.P., Lin J., Weiss A. (2002) It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol* 23:413-420.
- Kaplan G.A., Haan M.N., Wallace R.B. (1999) Understanding changing risk factor associations with increasing age in adults. *Annu Rev Public Health* 20:89-108.
- Kappes D.J., He X., He X. (2005) CD4-CD8 lineage commitment: an inside view. *Nat. Immunol* 6:761-766.
- Kato H., Horino A., Taneichi M., Fukuchi N., Eto Y., Ushijima H., Komuro K., Uchida T. (1998) Macrophage inhibition of lymphocyte and tumor cell growth is mediated by 25-hydroxycholesterol in the cell membrane. *Int Arch Allergy Immunol* 117:78-84.
- Katsumata O., Hara-Yokoyama M., Sautes-Fridman C., Nagatsuka Y., Katada T., Hirabayashi Y., Shimizu K., Fujita-Yoshigaki J., Sugiya H., Furuyama S. (2001) Association of FcgammaRII with low-density detergent-resistant membranes is important for cross-linking-dependent initiation of the tyrosine phosphorylation pathway and superoxide generation. *J Immunol* 167:5814-5823.
- Kelso A., Troutt A.B., Maraskovsky E., Gough N.M., Morris L., Pech M.H., Thomson J.A. (1991) Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro. *Immunol Rev.*123:85-114.
- Khalil A., Jay-Gerin J.P., Fulop T. Jr. (1998) Age-related increased susceptibility of high-density lipoproteins (HDL) to in vitro oxidation induced by gamma-radiolysis of water. *FEBS Lett* 435:153-158.
- Khovidhunkit W., Kim M.S., Memon R.A., Shigenaga J.K., Moser A.H., Feingold K.R., Grunfeld C. (2004) Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res.* 45:1169-1179.

- Khoshnan A, Tindell C, Laux I, Bae D, Bennett B, Nel AE. The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. *J Immunol*. 2000 Aug 15;165(4):1743-54
- Kiyokawa E., Baba T., Otsuka N., Makino A., Ohno S., Kobayashi T. (2005) Spatial and Functional Heterogeneity of Sphingolipid-rich Membrane Domains. *J Biol Chem*. 280:24072-24084.
- Konig R. (2002) Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 14:75-83.
- Kovacs B., Maus M.V., Riley J.L., Derimanov G.S., Koretzky G.A., June C.H., Finkel T.H. (2002) Human CD8+ T cells do not require the polarization of lipid rafts for activation and proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15006-15011.
- Krajewska W.M., Maslowska I. (2004) Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cell Mol Biol Lett* 9:195-220.
- Krawczyk C., Penninger J.M. (2001) Molecular motors involved in T cell receptor clusterings. *J Leukoc Biol* 69:317-330.
- Kropshofer H., Spindeldreher S., Rohn T.A., Platania N., Grygar C., Daniel N., Wolpl A., Langen H., Horejsi V., Vogt A.B. (2002) Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat Immunol* 3:61-68.
- Leech S.H. (1980) Cellular immunosenescence. *Gerontology* 26:330-345.
- Li X.M., Momsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E. (2003) Sterol structure and sphingomyelin acyl chain length modulate lateral packing elasticity and detergent solubility in model membranes. *Biophys J* 85:3788-3801.

- Li Q., Wang M., Tan L., Wang C., Ma J., Li N., Li Y., Xu G., Li J. (2005) Docosahexaenoic acid changes lipid composition and IL-2 receptor signaling in membrane rafts. *J Lipid Res.* In press.
- Ligthart G.J., Corberand J.X., Fournier C., Galanaud P., Hijmans W., Kennes B., Muller-Hermelink H.K., Steinmann G.G. (1984) Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. *Mech Ageing Dev* 28:47-55.
- Lipardi C., Nitsch L., Zurzolo C. (2000) Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting. *Mol Biol Cell.* 11:531-542.
- Lloberas J., Celada A. (2002) Effect of aging on macrophage function. *Exp Gerontol* 37:1325-1331.
- London E., Brown D.A. (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* 1508:182-195.
- Lord J.M., Akbar A.N., Kipling D. (2002) Telomere-based therapy for immunosenescence. *Trends Immunol.* 23:175-176.
- Ma D.W., Seo J., Switzer K.C., Fan Y.Y., McMurray D.N., Lupton J.R., Chapkin R.S. (2004) n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J Nutr Biochem.* 15:700-706.
- Makinodan T. (1980) Nature of the decline in antigen-induced humoral immunity with age. *Mech Ageing Dev* 14:165-172.

- Marathe G.K., Harrison K.A., Murphy R.C., Prescott S.M., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. (2000) Bioactive phospholipid oxidation products. *Free Radic Biol Med* 28:1762-1770.
- Marmor M.D., Julius M. (2001) Role for lipid rafts in regulating interleukin-2 receptor signaling. *Blood* 98:1489-1497.
- Maxfield F.R. (2002) Plasma membrane microdomains. *Curr Opin Cell Biol.* 14:483-487.
- Meydani S.N., Wu D., Santos M.S., Hayek M.G. (1995) Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am J Clin Nutr* 62:1462S- 1476S.
- Millan J., Qaidi M., Alonso M.A. (2001) Segregation of co-stimulatory components into specific T cell surface lipid rafts. *Eur J Immunol* 31:467-473
- Mocchegiani E, Malavolta M NK and NKT cell functions in immunosenescence. *Aging Cell.* 2004 Aug;3(4):177-184.
- Morel P.A., Feili-Hariri M., Coates P.T., Thomson A.W. (2003) Dendritic cells, T cell tolerance and therapy of adverse immune reactions. *Clin Exp Immunol* 133:1-10.
- Mouritsen O.G., Zuckermann M.J. (2004) What's so special about cholesterol? *Lipids* 39:1101-1113.
- Munro S. (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115:377-388.
- Mustelin T., Rahmouni S., Bottini N., Alonso A. (2003) Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation. *Immunol Rev* 191:139-147.
- Naslavsky N., Stein R., Yanai A., Friedlander G., Taraboulos A. (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272:6324-6331.

- Nel A.E. (2002) T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol* 109:758-770.
- Nguyen D.H., Taub D.D. (2003) Membrane incorporation of 22-hydroxycholesterol inhibits chemokine receptor activity. *Exp Cell Res* 285:268-277.
- Nguyen D.H., Espinoza J.C., Taub D.D. (2004) Cellular cholesterol enrichment impairs T cell activation and chemotaxis. *Mech Ageing Dev.* 125:641-650.
- Nobile-Orazio E., Carpo M., Scarlato G. (1994) Gangliosides. Their role in clinical neurology. *Drugs* 47:576-585.
- Nusrat A., Parkos C.A., Verkade P., Foley C.S., Liang T.W., Innis-Whitehouse W., Eastburn K.K., Madara J.L. (2000) Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci* 113:1771-1781.
- Okkenhaug K., Bilancio A., Emery J.L., Vanhaesebroeck B. (2004) Phosphoinositide 3-kinase in T cell activation and survival. *Bioch. Soc. Trans.* 32 :332-335.
- Oram J.F., Vaughan A.M. (2000) ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 11:253-260.
- Orlandi P.A., Fishman P.H. (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 141:905-915.
- Osman N., Lucas S., Cantrell D. (1995) The role of tyrosine phosphorylation in the interaction of cellular tyrosine kinases with the T cell receptor zeta chain tyrosine- based activation motif. *Eur J Immunol* 25:2863-2869.
- Ostrom R.S., Bunday R.A., Insel P.A. (2004) Nitric oxide inhibition of adenylyl cyclase type 6 activity is dependent upon lipid rafts and caveolin signaling complexes. *J Biol Chem* 279:19846-19853.

- Paetkau V. (1985) Molecular biology of interleukin 2. *Can J Biochem Cell Biol* 63:691-699.
- Pang H., Le P.U., Nabi I.R. (2004) Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 117:1421-1430.
- Pawelec G., Barnett Y., Forsey R., Frasca D., Globerson A., McLeod J., Caruso C., Franceschi C., Fulop T. Jr., Gupta S., Mariani E., Mocchegiani E., Solana R. (2002) T cells and aging, *Front Biosci* 7:d156-183.
- Pawelec G., Hirokawa K., Fulop T. Jr. (2001) Altered T cell signalling in ageing. *Mech Ageing Dev* 122:1613-1637.
- Pawelec G., Sansom D., Rehbein A., Adibzadeh M., Beckman I. (1996) Decreased proliferative capacity and increased susceptibility to activation-induced cell death in late-passage human CD4+ TCR2+ cultured T cell clones. *Exp Gerontol* 31:655-668.
- Piantanelli L., Viticchi C., Basso A., Rossolini G. (1990) Thymic involution and aging processes. *Int J Neurosci.* 51:283-285.
- Plackett T.P., Boehmer E.D., Faunce D.E., Kovacs E.J. (2004) Aging and innate immune cells. *J Leukoc. Biol.* 76:291-299.
- Plowden J., Renshaw-Hoelscher M., Engleman C., Katz J., Sambhara S (2004) Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 3:161-167.
- Pryme I.F. (1986) Compartmentation of the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biochem* 71:3-18.
- Puff N., Lamaziere A., Seigneuret M., Trugnan G., Angelova M.I. (2005) HDLs induce raft domain vanishing in heterogeneous giant vesicles. *Chem Phys Lipids.* 133:195-202.

- Rattan S.I. (2004) Aging intervention, prevention, and therapy through hormesis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59:705-709.
- Razzaq T.M., Ozegbe P., Jury E.C., Sembi P., Blackwell N.M., Kabouridis P.S. (2004) Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains. *Immunology* 113:413-426.
- Resch K., Schneider S., Szamel M. (1983) Characterization of functional domains of the lymphocyte plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 733:142-153.
- Resh M.D. (2004) Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem* 37:217-232.
- Rider D.A., Sinclair A.J., Young S.P. (2003) Oxidative inactivation of CD45 protein tyrosine phosphatase may contribute to T lymphocyte dysfunction in the elderly. *Mech Ageing Dev* 124:191-198.
- Rincon M., Pedraza-Alva G. (2003) JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev.* 192:131-142.
- Rubin E, Rottenberg H. (1982) Ethanol-induced injury and adaptation in biological membranes. *Fed Proc.* 41:2465-2471.
- Sadighi Akha A.A., Miller R.A. (2005) Signal transduction in the aging immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 17:486-491
- Sadra A., Cinek T., Imboden J.B. (2004) Translocation of CD28 to lipid rafts and costimulation of IL-2. *PNAS.* 101:11422-11427.
- Salazar-Fontana L.I., Bierer B.E. (2001) T-lymphocyte coactivator molecules. *Curr Opin Hematol* 8:5-11.

- Salojin K.V., Zhang J., Delovitch T.L. (1999) TCR and CD28 are coupled via ZAP-70 to the activation of the Vav/Rac-1-/PAK-1/p38 MAPK signaling pathway. *J Immunol* 163:844-853.
- Sawamura N., Ko M., Yu W., Zou K., Hanada K., Suzuki T., Gong J.S., Yanagisawa K., Michikawa M. (2004) Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. *J Biol Chem.* 279:11984-11991.
- Sedwick C.E., Morgan M.M., Jusino L., Cannon J.L., Miller J., Burkhardt J.K. (1999) TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J Immunol* 162:1367-1375.
- Segrest J.P., Li L., Anantharamaiah G.M., Harvey S.C., Liadaki K.N., Zannis V. (2000) Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 11:105-115.
- Shao D., Segal A.W., Dekker L.V. (2003) Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils. *FEBS Lett* 550:101-106.
- Shogomori H., Hammond A.T., Ostermeyer-Fay A.G., Barr D.J., Feigenson G.W., London E., Brown D.A. (2005) Palmitoylation and intracellular domain interactions both contribute to raft targeting of linker for activation of T cells. *JBiol Chem* 280:18931-18942.
- Siegel J.N., Egerton M., Phillips A.F., Samelson L.E. (1991) Multiple signal transduction pathways activated through the T cell receptor for antigen. *Semin Immunol* 3:325-334.
- Simons K., Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Sims T.N., Dustin M.L. (2004) A polarizing situation. *Nat Immunol* 5:1012-1013.
- Singer S. J., Nicholson G. L. (1972) *Science* 175:720-731.
- Solana R., Alonso M.C., Pena J. (1999) Natural killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol* 34:435-443.

- Spiteller G. (2002) Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process? *Ann N Y Acad Sci.* 959:30-44.
- Stulnig T.M., Berger M., Roden M., Stingl H., Raederstorff D., Waldhausl W. (2000) Elevated serum free fatty acid concentrations inhibit T lymphocyte signaling. *FASEB J* 14:939-947.
- Stulnig T.M., Klocker H., Harwood H.J. Jr, Jurgens G., Schonitzer D., Jarosch E., Huber L.A., Amberger A., Wick G. (1995) In vivo LDL receptor and HMG-CoA reductase regulation in human lymphocytes and its alterations during aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:872-878.
- Switzer K.C., McMurray D.N., Chapkin R.S. (2004) Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on T-cell membrane composition and function. *Lipids* 39:1163-1170.
- Tavano R., Gri G., Molon B., Marinari B., Rudd C.E., Tuosto L., Viola A. (2004) CD28 and lipid rafts coordinate recruitment of Lck to the immunological synapse of human T lymphocytes. *J Immunol* 173:5392-5397.
- Taylor C.M., Coetzee T., Pfeiffer S.E. (2002) Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J Neurochem* 81:993-1004.
- Thoman M.L., Weigle W.O. (1981) Lymphokines and aging: interleukin-2 production and activity in aged animals. *J Immunol* 127:2102-2106.
- Tinkle C.W., Lipschitz D., Ponnappan U. (1998) Decreased association of p56lck with CD4 may account for lowered tyrosine kinase activity in mitogen-activated human T lymphocytes during aging. *Cell Immunol* 186:154-160.

- Tomas E.M., Chau T..A., Madrenas J. (2002) Clustering of a lipid-raft associated pool of ERM proteins at the immunological synapse upon T cell receptor or CD28 ligation *Immunol Lett* 83:143-147.
- Torgersen K.M., Vaage J.T., Rolstad B., Tasken. (2001) A soluble LAT deletion mutant inhibits T-cell activation: reduced recruitment of signalling molecules to glycolipid-enriched microdomains. *Cell Signal* 13:213-220.
- Tuosto L., Parolini I., Schroder S., Sargiacomo M., Lanzavecchia A., Viola A. (2001) Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol* 31:345-349.
- Trubiani O, Salvolini E, Santoleri F, D'Arcangelo C, Spoto G, Primio RD, Mazzanti L (2005) Changes of plasma membrane properties in a human pre-T cell line undergoing apoptosis. *J. Membr. Biol.* 204:77-84
- Vamosi G., Bodnar A., Vereb G., Jenei A., Goldman C.K., Langowski J., Toth K., Matyus L., Szollosi J., Waldmann T.A., Damjanovich S. (2004) IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11082-11087.
- Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, Fogelman AM, Lusis AJ. (2001) The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 11:155-161.
- Varga Z., Bressani N., Zaia A.M., Bene L., Fulop T., Leovey A., Fabris N., Damjanovich S. (1990) Cell surface markers, inositol phosphate levels and membrane potential of lymphocytes from young and old human patients. *Immunol Lett* 23:275-280.
- Varma R., Mayor S. (1998) GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394:798-801.

- Viola A., Schroeder S., Sakakibara Y., Lanzavecchia A. (1999) T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283:680-682.
- von Haller P.D., Donohoe S., Goodlett D.R., Aebersold R., Watts J.D. (2001) Mass spectrometric characterization of proteins extracted from Jurkat T cell detergent-resistant membrane domains. *Proteomics* 1:1010-1021.
- Wallach D.F. (1969) The organization of cellular membranes. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 36:Suppl:672-701.
- Wang T.Y., Leventis R., Silvius J.R. (2000) Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: a model for molecular partitioning into "lipid rafts". *Biophys J* 79:919-933.
- Ward S.G (1996) CD28: a signalling perspective. *Biochem J.* 318:361-377.
- Wechsler A., Brafman A., Shafir M., Heverin M., Gottlieb H., Damari G., Gozlan-Kelner S., Spivak I., Moshkin O., Fridman E., Becker Y., Skaliter R., Einat P., Faerman A., Bjorkhem I., Feinstein E. (2003) Generation of viable cholesterol-free mice. *Science* 302:2087.
- Werlen G., Palmer E. (2002) The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr Opin Immunol* 14:299-305.
- Whisler R.L., Newhouse Y.G., Bagenstose S.E. (1996) Age-related reductions in the activation of mitogen-activated protein kinases p44mapk/ERK1 and p42mapk/ERK2 in human T cells stimulated via ligation of the T cell receptor complex. *Cell Immunol* 168:201-210.
- Wickstrom S.A., Alitalo K., Keski-Oja J. (2003) Endostatin associates with lipid rafts and induces reorganization of the actin cytoskeleton via down-regulation of RhoA activity. *J Biol Chem* 278:37895-37901.

- Williams D.L., Wong J.S., Hamilton R.L. (2002) SR-BI is required for microvillar channel formation and the localization of HDL particles to the surface of adrenocortical cells in vivo. *J Lipid Res* 43:544-549.
- Wood W.G., Schroeder F., Igbavboa U., Avdulov N.A., Chochina S.V. (2002) Brain membrane cholesterol domains, aging and amyloid beta-peptides. *Neurobiol Aging* 23:685-694.
- Xu Q., Buhler E., Steinmetz A., Schonitzer D., Bock G., Jurgens G., Wick G. (1992) A high-density-lipoprotein receptor appears to mediate the transfer of essential fatty acids from high-density lipoprotein to lymphocytes. *Biochem J* 287:395-401.
- Xu Q., Jurgens G., Huber L.A., Bock G., Wolf H., Wick G. (1992) Lipid utilization by human lymphocytes is correlated with high-density-lipoprotein binding site activity. *Biochem J* 285:105-112.
- Yashiro-Ohtani Y., Zhou X.Y., Toyo-Oka K., Tai X.G., Park C.S., Hamaoka T., Abe R., Miyake K., Fujiwara H. (2000) Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J Immunol.* 164:1251-1259.
- Zhang W., Samelson L.E. (2000) The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling. *Semin Immunol* 12:35-41.
- Zhang W., Tribble R.P., Samelson L.E. (1998) LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9:239-246.
- Zinkernagel R.M., Doherty P.C. (1979) MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 27:51-177.