

Inhibition de la synthèse de la phosphatidyléthanoline et du phosphatidylinositol, altération des phases G0 et G1 et apoptose spontanée chez les lymphocytes de sujets sous traitement immunosuppresseur

par Claude Rampini*, Benoît Barrou**, Michel Kornprobst* & Jean-Claude Nicolas*

* Faculté de médecine Saint-Antoine, 27, rue Chaligny, 75012 Paris ; ** Unité de transplantation rénale et pancréatique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris

Reçu le 15 septembre 2004

RÉSUMÉ

Les lymphocytes de sujets traités par les corticoïdes et différents autres agents immunosuppresseurs ont été incubés 48 heures avec ou sans stimulation par la concanavoline A. La synthèse des phospholipides a alors été étudiée par l'incorporation du ³²P-phosphate en pulses de 5 heures. On observe dans ces conditions que la synthèse de la phosphatidyléthanoline est très diminuée sous l'effet du traitement immunosuppresseur. La synthèse du phosphatidylinositol diminue également, mais moins. Ces résultats dénotent une perte de sensibilité des lymphocytes à l'action du mitogène et une altération de la phase G0 et de la phase G1 tardive du cycle cellulaire.

De façon parallèle (mais avec une incubation de 72 heures), les lymphocytes ont été étudiés par cytofluorimétrie en flux (fluorescence rouge à l'iodure de

propidium). On voit alors, au cours de la stimulation, que le passage à la phase S est diminué de deux tiers chez les lymphocytes des sujets immunodéficients par rapport aux lymphocytes de sujets normaux, non traités. La population des lymphocytes en G0-G1, stimulés ou non par le mitogène, est elle-même fortement remaniée. Mais surtout, sous l'effet de l'incubation en milieu de culture, et même en l'absence de toute stimulation par le mitogène, on observe, parmi les lymphocytes des sujets immunodéprimés, une forte proportion de lymphocytes apoptotiques, de 20 à 30 %. Cette tendance à une apoptose spontanée semble être inhérente à l'état d'immunodéficience en général. Elle est à rapporter à l'inhibition de la synthèse de la phosphatidyléthanoline en phase G0.

SUMMARY Inhibition of phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol synthesis, alteration of the G0 and G1 cell cycle phases and spontaneous apoptosis in lymphocytes from patients under immunosuppressive treatment

Lymphocytes from patients treated with immunosuppressive agents were cultured for 48 hours either with or without concanavalin A. Phospholipid synthesis was then studied using ³²P pulse-incorporation (5-hours pulses). Phosphatidylethanolamine synthesis was strongly decreased under immunosuppressive treatment: 1.5-fold in resting lymphocytes and 3- to 4-fold in concanavalin A-stimulated lymphocytes. Phosphatidylinositol synthesis also decreased about 2-fold in stimulated lymphocytes. These results indicate a loss of sensitivity of immunodeficient lymphocytes to the mitogen and an alteration of the G0 and the late G1 cell cycle phases.

In parallel, but after a 72-hours incubation, lym-

phocytes were analysed by flow-cytofluorimetry with propidium iodide. Under concanavalin A-triggered stimulation, the entry into the S phase was much lower in immunodeficient lymphocytes as compared to standard. The characteristics of the G0-G1 population of lymphocytes were also modified. More importantly, after incubation in the culture medium in the absence of mitogen, we observed, among the immunodeficient lymphocytes, a high level of apoptotic cells, about 20 to 30 %. This susceptibility to spontaneous apoptosis seems inherent to the status of immunodeficiency itself, whatever its origin. It may be related to the inhibition of phosphatidylethanolamine synthesis in the G0 phase.

INTRODUCTION

L'étude parallèle de la synthèse des phospholipides et des caractéristiques cytofluorimétriques des lymphocytes de sujets traités par des agents immunosuppresseurs apporte des indications nouvelles sur l'état d'immuno-déficience cellulaire.

On peut rappeler que l'incorporation du ^{32}P -phosphate, en pulses de 5 heures, dans les phospholipides des lymphocytes humains périphériques en culture stimulés par la concanavaline A, indique une augmentation continue de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine au cours de la phase G1 du cycle cellulaire (Rampini & Dubois, 1995). Il semble que cette augmentation soit spécifique de la phase G1, à la fin de laquelle la synthèse est optimale. Elle est à mettre en relation avec le remaniement des systèmes membranaires au cours de la phase G1, phase qui voit s'exprimer les différentes fonctions immunitaires des lymphocytes stimulés. La synthèse du phosphatidylinositol est aussi augmentée.

Il est donc légitime d'étudier les changements éventuels de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine et du phosphatidylinositol chez les lymphocytes de sujets immunodéficients. C'est ce que nous avons réalisé dans le cas de sujets qui avaient subi une transplantation rénale ou pancréatique, et qui recevaient, pour éviter le rejet des transplants, un traitement immunosuppresseur. Nous avons effectivement observé chez les lymphocytes de ces sujets une forte inhibition de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine et du phosphatidylinositol au cours des phases G0 et G1.

Les lymphocytes des mêmes sujets ont de plus été étudiés par cytofluorimétrie en flux, et nous avons observé là encore une altération des phases G0 et G1. Mais, principalement, l'immuno-déficience, obtenue ici par un traitement immunosuppresseur, fait apparaître une tendance proapoptotique importante qui rappelle celle des lymphocytes des sujets VIH⁺ (Gougeon *et al.*, 1991).

SUJETS ET MÉTHODES

Le traitement immunosuppresseur, réalisé dans l'unité de transplantation rénale et pancréatique de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Pr M.-O. Bitker), consiste en une corticothérapie à la prednisone (Cortancyl[®], Aventis), complétée par l'administration de différents agents immunosuppresseurs : soit mofétylmycophénolate (Cellcept[®], Roche) et tacrolimus (Prograf[®], Fujisawa) couplés, soit azathioprine (Imurel[®], Glaxo Wellcome). Les échantillons de sang des sujets normaux, non traités, proviennent du Centre National de Transfusion Sanguine (Centre Saint-Antoine, Paris).

La synthèse des phospholipides a été étudiée dans des conditions précédemment décrites (Rampini & Dubois, 1995), qu'il s'agisse de la séparation des lymphocytes périphériques, de leur incubation 48 heures, à 37°C, avec ou sans concanavaline A, de l'incorporation du ^{32}P -phosphate (en pulses de 5 heures), de l'extraction et de la

séparation chromatographique des phospholipides et, finalement, du comptage de la radioactivité de chacun d'eux. La radioactivité de la phosphatidyléthanolamine et celle du phosphatidylinositol sont rapportées à celle de la phosphatidylcholine, phospholipide pondéralement le plus important des membranes cellulaires, et pour lequel l'incorporation du traceur varie peu au cours de la phase G1.

Pour la cytométrie en flux, à la fin de l'incubation, qui est ici de 72 heures, les lymphocytes sont centrifugés, mis en suspension dans de l'éthanol à 70 % glacé, gardés 18 heures à température ambiante et éventuellement conservés à 4°C. Ils sont alors traités par l'iodure de propidium, fluorochrome spécifique de l'ADN et responsable d'une fluorescence rouge, en solution à 50 µg/ml dans du PBS, avec du Triton X100 à 0,25 % et de la ARNase à 0,5 mg/ml, à 37°C, 30 minutes, et analysés en cytofluorimétrie de flux (cytofluorimètre FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), selon la méthode décrite par Ormerod (Ormerod *et al.*, 1992). Le comptage est effectué par intervalles successifs d'intensité de la fluorescence (histogramme de l'ADN), intervalles caractéristiques des différentes phases du cycle cellulaire. Les lymphocytes en apoptose tardive, les lymphocytes éclatés et les corps apoptotiques ne sont pas séparés (on parlera non pas de « pourcentage », mais de « taux d'apoptose »). Les lymphocytes en phase G0 et en phase G1 sont comptés ensemble (pic G0-G1), de même que les lymphocytes en S et en G2-M, le passage en S étant seul étudié.

Les variations statistiques des résultats numériques ont été analysées par l'utilisation de la table du t (nombre de cas inférieur à 30). Nous avons ainsi évalué (mentionné entre parenthèses), pour chaque résultat, l'intervalle de confiance au risque 0,05, soit SD *t* au risque 0,05, et éventuellement, pour les différences entre les résultats d'une ligne des tableaux, le risque auquel ces différences sont significatives.

RÉSULTATS

Diminution de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine et du phosphatidylinositol

Le tableau I montre que, chez les lymphocytes non stimulés, donc en phase G0, la synthèse de la phosphatidyléthanolamine est diminuée dans le cas des sujets immunodéficients par rapport aux sujets normaux. Chez les lymphocytes stimulés par la concanavaline A, l'immuno-déficience s'accompagne d'une chute de la stimulation par le mitogène de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine et du phosphatidylinositol. Pour la phosphatidyléthanolamine, la stimulation diminue des deux tiers, de 5,68 à 1,80, et pour le phosphatidylinositol, la stimulation diminue de deux cinquièmes, de 1,89 à 0,99.

De plus, on voit que l'effet des deux traitements immunosuppresseurs utilisés n'est pas le même (Tableau II). La stimulation par le mitogène de la synthèse de la phospho-

TABLEAU I. – Synthèse de la phosphatidyléthanolamine et du phosphatidylinositol.

	Sujets normaux	Sujets immunodéficients	
Phosphatidyléthanolamine :			
Lymphocytes non stimulés	0,085 (0,029)	0,054 (0,017)	(0,05)
Lymphocytes stimulés	0,568 (0,068)	0,151 (0,046)	
Coefficient de stimulation	5,68 (0,38)	1,80 (0,23)	(0,001)
Phosphatidylinositol :			
Lymphocytes non stimulés	0,081 (0,10)	0,77 (0,16)	
Lymphocytes stimulés	2,34 (0,34)	1,53 (0,22)	
Coefficient de stimulation	1,89 (0,45)	0,99 (0,36)	(0,001)

La synthèse des phospholipides est évaluée par l'incorporation du ^{32}P -phosphate en pulses de 5 heures. La synthèse de la phosphatidyléthanolamine et celle du phosphatidylinositol sont rapportées à la synthèse de la phosphatidylcholine. Le coefficient de stimulation par le mitogène est défini par la formule :

$$(\text{lymphocytes stimulés} - \text{lymphocytes non stimulés}) / \text{lymphocytes non stimulés}$$

TABLEAU II. – Effet comparé de deux traitements immunosuppresseurs (*) sur la synthèse de la phosphatidyléthanolamine et du phosphatidylinositol.

	1 ^{er} groupe	2 ^{ème} groupe	
Coefficient de stimulation (**)			
phosphatidyléthanolamine	1,30	2,47	(0,02)
phosphatidylinositol	0,67	1,37	(0,05)

(*) Pour les sujets du 1^{er} groupe : prednisone, mofétylmycophénolate, tacrolimus. Pour les sujets du 2^{ème} groupe : prednisone, azathioprine.

(**) Voir la légende du Tableau I.

tidyléthanolamine et du phosphatidylinositol baisse plus sous l'effet du traitement prednisone-mofétylmycophénolate-tacrolimus que sous l'effet du traitement prednisone-azathioprine. Mais, qu'il s'agisse de la phosphatidyléthanolamine ou du phosphatidylinositol, la différence relative entre les effets des deux traitements est la même.

Altérations cytofluorimétriques

Inhibition du passage en phase S des lymphocytes stimulés par la concanavaline A

Le traitement immunosuppresseur entraîne une diminution du pourcentage de lymphocytes qui entrent en S de plus de deux tiers : 1,9 % de lymphocytes contre 6,8 % pour les sujets normaux. Ces valeurs, très faibles, ne sont indicatives que d'un ordre de grandeur.

Altérations des caractéristiques des lymphocytes en G0-G1

Le Tableau III montre les modifications du spectre de répartition quantitative, en fluorescence rouge, des lymphocytes qui se trouvent en G0-G1. La moyenne géométrique des valeurs de la fluorescence de ces lymphocytes, comptée à partir du début de l'intervalle qui leur correspond dans l'histogramme de l'ADN, et évaluée en pourcentage de la largeur totale de cet intervalle, diminue dans le cas des sujets immunodéficients par rapport aux

TABLEAU III. – Caractéristiques, en fluorescence rouge (iodure de propidium), de la population des lymphocytes en G0-G1.

	Sujets normaux	Sujets immunodéficients	
Lymphocytes non stimulés	56,2 (16,5)	37,5 (11,2)	(0,02)
Lymphocytes stimulés	43,2 (6,1)	34,4 (11,9)	

On considère la moyenne géométrique de l'intensité de la fluorescence rouge (iodure de propidium) des lymphocytes en G0-G1, comptée à partir du début de l'intervalle qui leur correspond dans l'histogramme de l'ADN, et évaluée en pourcentage de la largeur totale de cet intervalle.

sujets normaux. Pour les lymphocytes non stimulés, elle passe de 56,2 % à 37,5 % de l'intervalle total. Une variation dans le même sens est observée lors de la stimulation des lymphocytes. Ces résultats indiquent une déformation du pic de répartition quantitative des lymphocytes en G0-G1 vers les valeurs faibles de la fluorescence. Une explication de ce phénomène pourrait être une diminution de l'accessibilité de l'ADN à l'iodure de propidium.

Taux d'apoptose

On voit, dans le Tableau IV, qu'une grande proportion de lymphocytes apoptotiques apparaît parmi les lymphocytes des sujets immunodéficients, par simple incubation en milieu de culture, même en l'absence de mitogène : 28,9 %, contre 7,5 % pour les lymphocytes normaux. Nous avons vérifié que l'apoptose observée ne préexiste pas à l'incubation. La stimulation par le mitogène élève le pourcentage d'apoptose à 39,1 %.

TABLEAU IV. – Taux d'apoptose.

	Sujets normaux	Sujets immunodéficients	
Lymphocytes non stimulés	7,5 (0,7)	28,9 (14,2)	(0,02)
Lymphocytes stimulés	9,6 (8,6)	39,1 (13,2)	(0,01)

DISCUSSION

Le traitement immunosuppresseur inhibe largement l'entrée en phase S des lymphocytes stimulés par la concanavale A. Il s'agit là du blocage de l'étape finale de la stimulation par le mitogène. Toutefois, l'immunodéficience se manifeste dès la phase G0 et la phase G1. Ainsi, les caractéristiques de fluorescence de la population des lymphocytes en G0-G1 sont très altérées (Tableau III). De même, chez les lymphocytes des sujets traités par les immunosuppresseurs, la simple incubation en milieu de culture entraîne un fort degré d'apoptose spontanée (Tableau IV).

Ces modifications sont à mettre en parallèle avec les modifications de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine et du phosphatidylinositol observées chez les lymphocytes des sujets immunodéficients (Tableau I).

La stimulation des lymphocytes par les mitogènes entraîne, dès ses toutes premières étapes et au-delà au cours de la phase G1, une stimulation de la synthèse du phosphatidylinositol (Fischer & Mueller, 1968; Masuzawa *et al.*, 1973) qui correspond à l'activation du cycle des phosphoinositides (Michell, 1975), avec formation de deux seconds messagers, l'inositoltriphosphate cyclique et le diacylglycérol (Berridge & Irvine, 1984; Imboden & Stobo, 1985; Isakov & Altman, 1987; Berridge, 1993). Ceux-ci sont eux-mêmes responsables de l'élévation du taux du calcium cytosolique et de l'activation de la protéine kinase C. Finalement, différentes protéines kinases sont elles-mêmes activées. Les facteurs de croissance peptidiques, à récepteurs membranaires, sont impliqués dans ces phénomènes (Verkleij & Post, 2000). L'immunodéficience des lymphocytes s'accompagne de la chute, par rapport aux sujets normaux, de la stimulation de la synthèse du phosphatidylinositol, chute qui est encore observée 48 heures après le début de la stimulation. Selon ce qui précède, il s'agit, pour les lymphocytes immunodéficients, d'une perte de sensibilité à l'action combinée du mitogène et des facteurs de croissance, et donc d'une diminution de leur aptitude à passer de la phase G0 à la phase G1 et à progresser en G1.

La synthèse de la phosphatidyléthanolamine est très faible chez les lymphocytes au repos, en phase G0. Lors de la stimulation des lymphocytes par la concanavale A, elle est de plus en plus forte au cours de la phase G1, pour être maximale à la fin de celle-ci et au début de la phase S (Rampini & Dubois, 1995). Elle peut ainsi être utilisée pour évaluer l'aptitude des lymphocytes à progresser en G1. L'immunodéficience se manifeste par la diminution de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine chez les lymphocytes en G0 et par une chute de sa stimulation par la concanavale A en G1, chute qui indique alors l'altération particulière de la phase G1 : celle-ci, bien qu'enclenchée, ne peut se développer normalement pour arriver à son terme et permettre le passage à la phase S.

La proportion de phosphatidyléthanolamine règle les caractéristiques physico-chimiques et structurales de la phase lipidique des membranes, éventuellement au niveau de zones ou de domaines topologiquement limités. Il en est ainsi de leur microviscosité (Vaughan & Keough,

1974; Huber *et al.*, 1991). Mais principalement, l'augmentation pondérale de la phosphatidyléthanolamine, qui peut résulter de l'augmentation de sa synthèse, entraîne la formation de structures membranaires non lamellaires, hexagonales, au sein des doubles couches phospholipidiques (Stier *et al.*, 1978; Cullis, 1980; Verkleij, 1984; Van Duijn, 1986; Post *et al.*, 1995), telles que les particules lipidiques, ou micelles inversées. Ces structures, en tant que telles, peuvent être impliquées directement dans diverses fonctions associées aux membranes et caractéristiques de la phase G1 : par exemple, l'échange, à partir du réticulum endoplasmique, des phospholipides néosynthétisés (De Kruijff *et al.*, 1978), l'insertion des protéines intégrales dans la membrane plasmique (Stier *et al.*, 1978) ou encore les phénomènes de fusion et de vésiculation des membranes (Verkleij, 1984; Warren, 1989). Plus généralement, la déstabilisation structurale de domaines en double couche peut influencer indirectement des activités membranaires diverses, qui sont tributaires de leur environnement phospholipidique : recrutement de facteurs protéiques cytosoliques à la membrane plasmique, phosphorylation par des protéines kinases associées à celle-ci, etc. L'activité des enzymes membranaires du cycle des phosphoinositides pourrait être modulée de la même façon. Chez les lymphocytes immunodéficients, l'importante inhibition de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine, en G0 mais aussi en G1, peut avoir les effets en sens inverse, et donc entraîner l'altération structurale et fonctionnelle des membranes.

Dans le cas des deux traitements immunosuppresseurs différents (Tableau II), la diminution de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine est différente pour chacun d'eux, et il en va de même pour la diminution de la synthèse du phosphatidylinositol. Mais d'un traitement à l'autre, le rapport des synthèses de la phosphatidyléthanolamine et du phosphatidylinositol reste inchangé, de l'ordre de 2. Ceci est un argument en faveur d'une relation entre les deux phénomènes, qui pourrait être la modulation par la phosphatidyléthanolamine de l'activité des enzymes du cycle des phosphoinositides (voir plus haut).

L'apoptose qui touche les lymphocytes immunodéficients peut mettre en jeu, d'une façon générale, les différentes altérations membranaires structurales et fonctionnelles qui sont causées par la diminution de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine, en G0 – dans le cas de l'apoptose spontanée – aussi bien qu'en G1. Les anomalies morphologiques de la membrane plasmique décrites au cours de l'apoptose, la dispersion des cellules en corps apoptotiques, etc., sont autant de phénomènes qui évoquent les altérations membranaires liées au trouble de la phosphatidyléthanolamine.

Une telle apoptose spontanée a déjà été observée chez les lymphocytes de sujets VIH⁺ (Gougeon, 1999; Gougeon *et al.*, 1991). Dans ce dernier cas, elle a été rapportée à un dérèglement de la phase ultime de la réponse immune, à savoir la phase qui, par différents processus proapoptotiques (activation de la voie Fas-L, répression du gène bcl-2 et carence en IL2), permet normalement, par apoptose, d'arrêter l'expansion des clones lymphocytaires

stimulés et de rétablir l'homéostasie du système immunitaire. Chez les sujets VIH⁺, l'apoptose en cause serait accentuée par une stimulation antigénique secondaire due à la persistance de l'agent viral, à virémie élevée, ce qui entraînerait une déplétion lymphocytaire pathologiquement exagérée (Gougeon, 1999; Gougeon *et al.*, 1996).

Dans le cas des sujets qui ont reçu un traitement immunosuppresseur, la participation d'une telle stimulation antigénique secondaire, due cette fois aux antigènes du transplant, n'est pas exclue. Toutefois, à la différence du cas des sujets VIH⁺, c'est ici le traitement immunosuppresseur qui est, au départ, la cause initiale de l'immunodéficience et de la déplétion lymphocytaire par apoptose, et non pas une stimulation antigénique à long terme. L'apoptose observée serait donc inhérente à l'état d'immunodéficience en général, quelle qu'en soit l'origine.

CONCLUSION

On peut conclure que, chez les lymphocytes de sujets traités par des agents immunosuppresseurs, l'immunodéficience s'accompagne d'une diminution de la synthèse de la phosphatidyléthanolamine principalement, et aussi de celle du phosphatidylinositol. Ces phénomènes sont susceptibles d'être responsables d'une altération structurale et fonctionnelle des membranes cellulaires, ainsi que d'une perte de sensibilité des lymphocytes à la concanavaleine A et aux facteurs de croissance lymphocytaires. Il peut alors en résulter les modifications cytométriques des lymphocytes en G0-G1 et leur tendance à l'apoptose spontanée, qui sont parallèlement observées. L'apoptose spontanée liée à l'immunodéficience est obtenue ici sous l'effet d'un traitement immunosuppresseur, et elle n'est donc pas spécifique du cas des lymphocytes VIH⁺, mais elle semble plutôt être caractéristique de l'état d'immunodéficience en général, quelle que soit son origine.

Remerciements. – Nous remercions Mme Chantal KAZAZIAN pour son assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- Berridge M. J. & Irvine R. F., Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 1984, 352, 312-315.
- Berridge M., Inositoltriphosphate and calcium signalling. *Nature*, 1993, 361, 315-325.
- Cullis P. R., De Kruijff B., Hope M. S., Nayar R., Rietveld A. & Verkleij A. J., Structural properties of phospholipids in the rat liver inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 600, 625-635.
- De Kruijff B., Van Den Besselaar A. M. H. P., Cullis P. R., Van Den Bosch H. & Van Deenen L. L. M., Evidence for isotropic

- motion of phospholipids in liver microsomal membranes. A ³¹P NMR study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 514, 1-8.
- Fisher D. B. & Mueller G. C., An early alteration in the phospholipid metabolism of lymphocytes by phytohemagglutinin. *Biochemistry*, 1968, 60, 1396-1402.
- Gougeon M.-L., Olivier R., Garcia S., Guetard D., Dragic T., Dauquet C. & Montagnier L., Demonstration of an engagement process towards cell death by apoptosis in lymphocytes of HIV-infected patients. *Acad. Sci.*, 1991, 312, 529-537.
- Gougeon M.-L., Lecur H., Dulioust A., Enouf M.-G., Crouvoisier M., Goujard C., Debord T. & Montagnier L., Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: the increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol.*, 1996, 156, 3509-3520.
- Gougeon M.-L., Apoptose et sida. *Revue Française des Laboratoires*, 1999, 311, 57-63.
- Huber L. A., Xu Q. B., Järgens G., Bick G., Bähler E., Gey K. F., Shinitzer D., Traill K. N. & Wick G., Correlation of lymphocyte lipid composition, membrane microviscosity and mitogen responses in the aged. *Eur. J. Immunol.*, 1991, 21, 2761-2765.
- Imboden J. B. & Stobo J. B., Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.*, 1985, 161, 446-456.
- Isakof N. & Altman A., Human T lymphocyte activation by tumor promoters: role of protein kinase C. *J. Immunol.*, 1987, 138, 3100-3107.
- Masuzawa Y, Osawa T., Inoue K. & Nojima S., Effects of various mitogens on the phospholipid metabolism of human peripheral lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 326, 339-344.
- Michell R. H., Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 415, 81-147.
- Ormerod M.-G., Collins M. L., Rodriguez-Tarduchy K. & Robertson D., Apoptosis in IL-3-dependent haemopoietic cells. Quantification by two flow-cytometric methods. *J. Immunol. Methods*, 1992, 153, 57-65.
- Post J. A., Bijvelt J. J. & Verkleij A. J., Phosphatidylethanolamine and sarcolemma damage during ischemia or metabolic inhibition of heart myocytes. *Amer. J. Physiol.*, 1995, 268, 773-780.
- Rampini C. & Dubois C., Stimulation of phosphatidylethanolamine synthesis during the last stages of the G1 phase in concanavalin A-activated human peripheral lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1257, 75-80.
- Stier A., Finch S. A. E. & Bisterling B, Non-lamellar structure in rabbit liver microsomal membranes. *FEBS Lett.*, 1978, 91, 109-112.
- Van Duijn G., Luiken J. Verkleij A.J. & De Kruijff B., Relation between lipid polymorphism and transbilayer movement of lipids in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 863, 193-204.
- Vaughan D. J. & Keough K. M., Changes in phase transitions of phosphatidylethanolamine – and phosphatidylcholine – water dispersions induced by small modifications in the headgroup and backbone regions. *FEBS Lett.*, 1974, 47, 158-161.
- Verkleij A. J., Lipidic intramembranous particles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 779, 43-63.
- Verkleij A. J. & Post S. A., Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction. *J. Membrane Biol.*, 2000, 178, 1-10.
- Warren G., Mitosis and membranes. *Nature*, 1989, 342, 857-858.