

Réponse immune contre les glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine : la glycosylation, bouclier ou talon d'Achille ?

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a pour caractéristique remarquable la glycosylation exceptionnellement forte de sa glycoprotéine d'enveloppe, la gp160. Cette glycoprotéine joue un rôle crucial lors des premières étapes de l'infection (liaison puis fusion du virus avec les cellules cibles). Les anticorps neutralisant l'infection *in vitro* sont essentiellement dirigés contre cette molécule et, chez l'animal, il a été montré que de tels anticorps protègent contre l'infection. Ces observations ont fait de la gp160 l'objet principal des stratégies vaccinales anti-VIH et de nombreuses études se sont ainsi attachées à déterminer le rôle de la glycosylation dans l'activité biologique et dans l'antigénicité de cette glycoprotéine.

Abdelaziz Benjouad
Emmanuel Fenouillet

La glycosylation est un événement qui affecte de nombreuses protéines au cours de leur biosynthèse. Elle est souvent nécessaire à leur activité biologique [1] et détermine nombre de leurs propriétés physicochimiques (solubilité, résistance aux dégradations thermiques et protéolytiques...) [1, 2]. Elle joue aussi un rôle majeur dans les mécanismes de reconnaissance et d'adhérence [1]. Enfin, la glycosylation module souvent profondément les propriétés antigéniques des glycoprotéines [3]. La glycosylation a une importance

primordiale dans le cas particulier des agents pathogènes : elle influence les propriétés infectieuses de nombreux virus, parasites et bactéries et leur permet de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte, soit en masquant certains épitopes, soit en modifiant leur conformation [3]. Le virus de l'influenza est, dans cette optique, un exemple intéressant. Ce virus infecte les cellules après interaction de sa glycoprotéine d'enveloppe, l'hémagglutinine, avec l'acide sialique des glycoprotéines de surface des cellules cibles. Ce virus est connu pour sa capacité à échapper au système immunitaire et la

ADRESSE

A. Benjouad : Maître-assistant détaché de l'université de Rabat. E. Fenouillet : chargé de recherches au Cnrs. Cnrs URA 1463, CÉRVI, 83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris cedex 13, France.

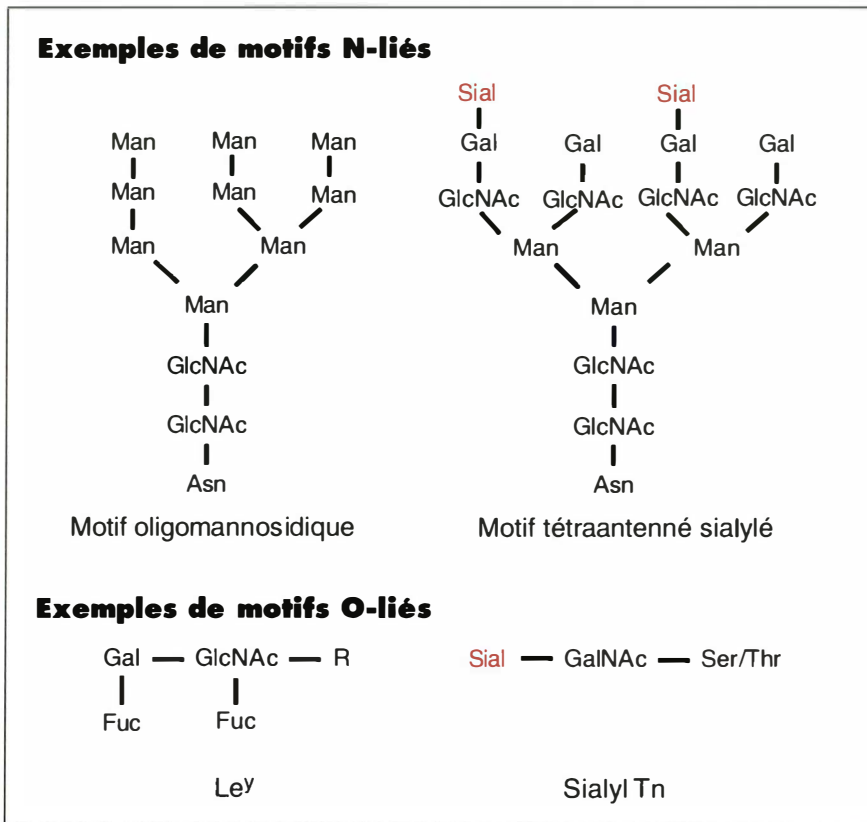


Figure 1. **Exemples de motifs N- et O-liés mis en évidence sur la gp160** [10, 11]. (Man : mannose ; GlcNAc : N acétyl glucosamine ; Gal : galactose ; Sial : acides sialiques ; Fuc : fucose).

glycosylation de l'hémagglutinine a, à cet effet, une grande importance. On a ainsi observé que les sérums d'animaux immunisés par les glycoprotéines natives ne réagissent pas avec les molécules déglycosylées [3]. La reconnaissance par les anticorps peut même être détournée par des altérations très discrètes de la glycosylation : ainsi, l'apparition d'un site de glycosylation au sein de l'hémagglutinine d'un variant de la souche Hong-Kong empêche-t-elle la liaison d'un anticorps monoclonal dirigé contre le virus natif [4], et il suffit même d'un seul résidu N-acétyl glucosamine pour abolir la reconnaissance de l'épitope au sein duquel ce sucre est situé [5]. Enfin, la propagation d'une souche virale en présence d'un anticorps monoclonal neutralisant anti-hémagglutinine sélectionne un variant différent de la souche d'origine par l'apparition d'un seul site de glycosylation.

On a étudié le rôle de la glycosylation d'autres agents infectieux, dont le VIH, et l'apparente incapacité du

système immunitaire à combattre l'infection par les rétrovirus (VIH-1 et VIH-2) responsables du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) a conduit à s'interroger sur le rôle fonctionnel de la glycosylation de leurs protéines d'enveloppe et sur l'influence de celle-ci dans la réponse immune.

Glycosylation des virus du SIDA

Les produits du gène *env* jouent un rôle très important au cours de l'infection à VIH. *env* code pour le précurseur des glycoprotéines d'enveloppe, la gp160 [6]. La gp160 est clivée dans l'appareil de Golgi en gp120 et gp41, qui restent liées par la suite de façon non covalente. La gp120 interagit avec le récepteur viral CD4 présent à la surface des cellules cibles, tandis que la gp41, ancrée dans l'enveloppe virale, induit la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire. Le génome viral peut alors pénétrer dans la cel-

lule. Outre leur implication dans les phénomènes conduisant à l'entrée du VIH dans les cellules CD4, ces deux glycoprotéines constituent les cibles principales des anticorps neutralisants [7, 8].

La gp160 est N-glycosylée par addition covalente de structures oligosaccharidiques au squelette protéique selon le mode commun à toutes les glycoprotéines [1, 9] : un glycane précurseur (Glc3Man9GlcNAc2) est adjoint, au cours de la traduction dans le réticulum endoplasmique, aux asparagines situées au sein de séquences peptidiques consensus (Asn-X-(Ser ou Thr)). Après clivage des glucoses par les glucosidases I et II, les branches du motif (*figure 1*) sont ensuite « élaguées » dans l'appareil de Golgi par des mannosidases pour donner un motif dit oligomannosidique. Différentes transférases ajoutent alors, éventuellement, à ce dernier divers sucres (N-acétylglucosamine, fucose, galactose, acide sialique), élaborant ainsi une structure dite « complexe » (*figure 1*). Outre les glycanes N-liés, quelques structures O-liées (*figure 1*) ont aussi été mises en évidence sur Env [10].

Alors que la glycosylation est un mécanisme très variable, habituellement influencé par de nombreux paramètres (structure tridimensionnelle de la protéine et accessibilité des sites de glycosylation, environnement et état de différenciation cellulaire, présence de stimuli tels que les hormones), les caractéristiques de la glycosylation de Env restent curieusement assez constantes : que la molécule soit d'origine recombinante ou virale, une dizaine de « grands » motifs oligomannosidiques (de type Man7-9GlcNAc2 (*figure 1*)) coexistent avec une dizaine de structures complexes bi- ou triantennées fucosylées et assez fortement sialylées (*figure 1*) [11, 12]. Ces quelque 30 glycanes font de la gp160 une molécule glycosylée de manière inhabituellement forte, puisqu'ils constituent la moitié de sa masse moléculaire, avec pour conséquence vraisemblable le masquage du squelette protéique par les motifs glucidiques. En effet, un motif tétra-antenné sialylé, tel que ceux décrits sur la gp160, couvre 20 à 25 nm². Or cette surface est sans doute tout à fait

RÉFÉRENCES

1. Goochee C, Gramer M, Andersen D, Bahr J, Rasmussen J. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology* 1991; 9: 1347-55.
2. Schauer R. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem Sci* 1985; 10: 357-60.
3. Alexander S, Elder JH. Carbohydrate dramatically influences immune reactivity of antisera to viral glycoprotein antigens. *Science* 1984; 226: 1326-30.
4. Skehel JJ, Stephens DJ, Daniels RS, et al. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1779-83.
5. Munk K, Pritzer E, Kretschmar E, et al. Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus haemagglutinin independent of oligosaccharide size. *Glycobiology* 1992; 2: 233-40.
6. Moore JP, Jameson BA, Weiss RA, Sattentau QJ. The HIV-cell fusion reaction. In: Bentz J., ed. *Viral fusion mechanisms* Boca Raton: CRC Press, 1993: 233-289.
7. Putney S. How antibodies block HIV infection: paths to an AIDS vaccine. *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 191-6.
8. Brand D, Truong C, Barin F. Domaines fonctionnels de l'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et anticorps neutralisants: apport dans l'approche vaccinale. *médecine/sciences* 1994; 10: 417-24.
9. Fenouillet E, Gluckman JC, Jones I. HIV glyco-biology. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 65-70.
10. Hansen JES, Nielsen C, Arendrup M, et al. Broadly neutralizing antibodies are targeted to mucin-type carbohydrate epitopes of human immunodeficiency virus. *J Virol* 1991; 65: 6461-7.
11. Geyer H, Holschbach C, Hunsmann G, Schneider J. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 1988; 263: 11760-7.
12. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 10373-82.

considérable par rapport à celle occupée par la gp160: si l'on se réfère, par exemple, à la transferrine, molécule dont les caractéristiques biochimiques sont assez proches de celles de la gp120, un seul motif tétra-antenné recouvre près de 10 % de son interface avec le milieu extérieur [13] ! Les quelque 25 sites de glycosylation de la gp120 ont une position assez conservée entre VIH-1 et VIH-2 (figure 2) et leurs emplacements varient généralement de moins de 5 acides aminés entre les isolats. Ces sites sont également répartis entre les régions variables (V) et les régions conservées (C) de la gp120 [12]. Quant à la gp41, quatre à cinq sites potentiels sont présents sur son domaine extramembranaire dans une région proche à la fois des épitopes « immunodominants » et neutralisants, du site de clivage protéolytique de la gp160 et de la séquence peptidique hydrophobe responsable de la fusion membranaire [6, 7, 14]. Le caractère conservé de la glycosylation de Env et le fait que Env soit la cible principale des stratégies thérapeutiques et vaccinales contre l'infection à VIH ont stimulé une étude approfondie de l'influence des glycanes sur l'antigénicité et l'activité biologique des glycoprotéines du VIH. La glycosylation contribue-t-elle à détourner la réponse immunitaire dirigée contre le VIH en jouant le rôle de bouclier ? En modifiant ses caractéristiques, peut-on espérer obtenir une réponse immunitaire neutralisante efficace et trouver ainsi le talon d'Achille du virus ? Modifier la carapace glucidique de ces glycoprotéines pour les rendre plus immunogènes, ou modifier leur glycosylation pour altérer leurs fonctions, ont ainsi figuré parmi les premiers objectifs.

Influence de la glycosylation sur les fonctions de Env

Le rôle fonctionnel des glycanes de Env a été déterminé par des approches méthodologiques diverses (emploi d'inhibiteurs de la glycosylation, mutagenèse dirigée, déglycosylation enzymatique), et les données recueillies peuvent être résumées de la façon suivante [9, 15] :

la mutation individuelle des sites de glycosylation n'influence généralement ni la biosynthèse de la gp160 ni ses fonctions, alors que la mutation simultanée de 3 à 5 sites de glycosylation a souvent un effet majeur [9, 16] ; par exemple, si l'on mute individuellement chacun des trois sites situés dans la région de la gp120 dont on suppose qu'elle interagit avec CD4 (N411/N412, N468), cette interaction n'est pas affectée, alors que la mutation simultanée de ces trois sites l'abolit [16]. Au cours de la biosynthèse, la présence du « capitonnage glucidique » formé par l'ensemble des glycanes de la gp160 apparaît donc nécessaire pour que sa structure tridimensionnelle s'établisse, alors que l'influence individuelle de chaque glycanes semble généralement réduite. Il apparaît que les glycanes exercent leur effet au moment où se fait le repliement de la gp160 dans le réticulum endoplasmique et le *cis*-Golgi, puisque seuls les inhibiteurs qui agissent dans ces compartiments en inhibant les toutes premières étapes de la glycosylation (la désoxyjirimycine, par exemple) altèrent l'activité biologique de Env, tandis que l'inhibition des étapes plus tardives de la glycosylation n'a pas de conséquence [9, 14, 15] sur ses fonctions.

En revanche, après la biosynthèse, si l'on déglycosyle par voie enzymatique la gp120, on altère peu la liaison à CD4 et le virus déglycosylé garde son aptitude à se fixer aux cellules CD4⁺ et à les infecter [17]. Si les glycanes sont donc indispensables à l'induction de la structure tridimensionnelle de Env au cours de sa biosynthèse, ils ne sont pas nécessaires à son maintien, une fois la biosynthèse achevée [9, 14, 18].

Glycosylation et propriétés immunologiques de Env

Les anticorps neutralisant VIH

Les anticorps neutralisants, présents chez les personnes infectées par VIH-1, sont dirigés, soit contre la boucle variable V3 de la gp120, soit contre des épitopes impliqués dans la liaison avec CD4 [7, 8].

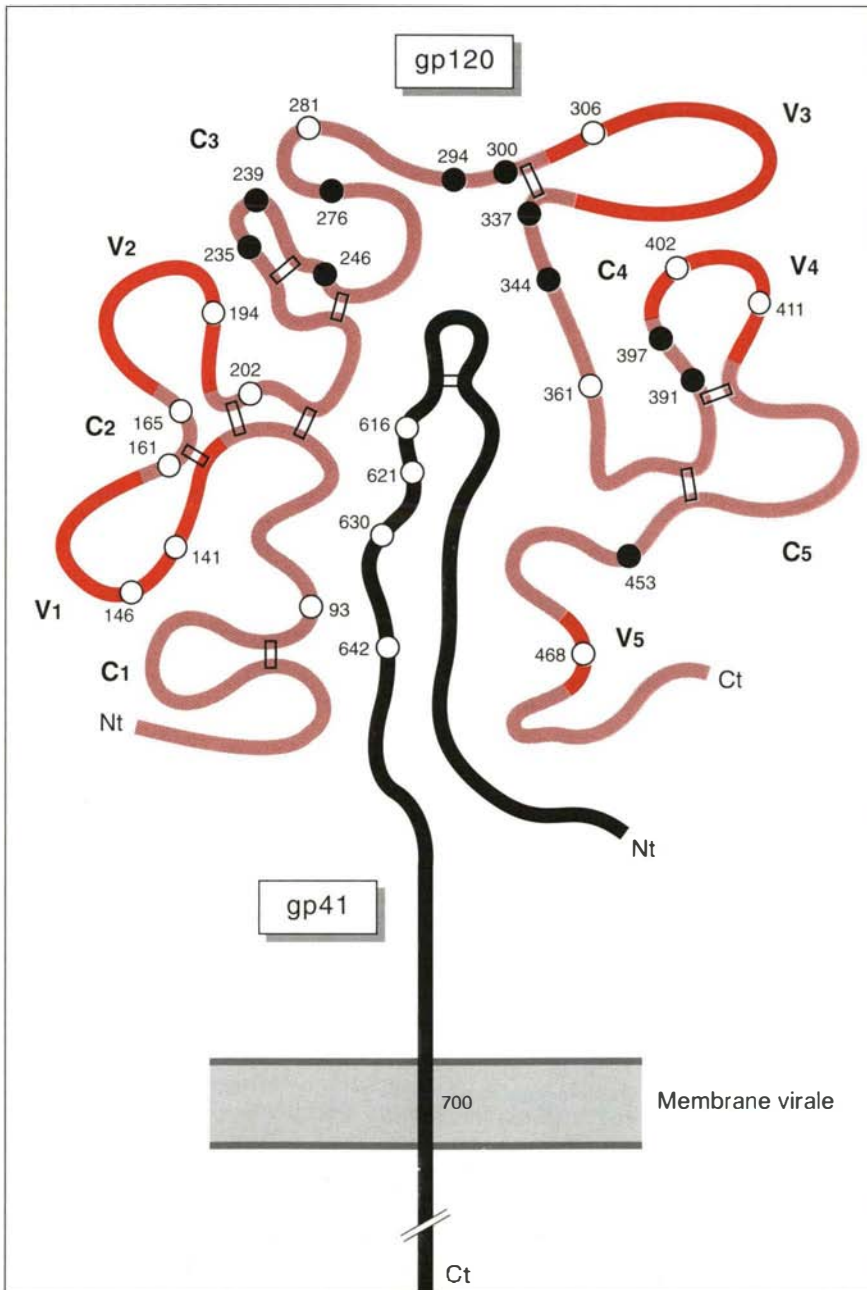


Figure 2. **Schéma représentant les différents domaines de la gp120 et de la gp41.** Régions variables (V) et constantes (C); sites de glycosylation potentiels : cercles blancs (motifs de type complexe) et noirs (motifs de type oligomannosidique ou hybride); ponts disulfures (rectangles) (d'après [12]). La numérotation se rapporte à celle utilisée dans la Los Alamos Data Base. Cette figure ne prétend pas rendre compte des interactions non covalentes existant entre diverses régions de la gp120 et la gp41: la proximité de leurs régions respectives, telles qu'elles sont représentées sur la figure, a pour seule justification des facilités d'illustration. Nt: extrémité N terminale; Ct: extrémité C-terminale.

m/s n° 5 vol. 10, mai 94

V3 (figure 2) inclut l'épitope neutralisant principal, et ce domaine joue un rôle majeur dans l'infektivité et le tropisme du VIH [6-8]; si les anticorps anti-V3 n'interfèrent pas avec la fixation du virus à son récepteur, ils empêchent généralement la fusion membranaire et cela explique sans doute leur effet antiviral. Malheureusement, en raison de l'incidence élevée des mutations qui affectent cette région, les anticorps anti-V3 sont généralement spécifiques de l'isolat viral contre lequel ils sont originellement dirigés [7, 8]. Le site de liaison de la gp120 avec CD4 a une architecture complexe car il est le résultat d'interactions entre plusieurs régions de Env [6]. Deux types d'anticorps neutralisent l'infection en bloquant cette liaison: le premier reconnaît un épitope centré autour de l'acide aminé 430, le second un épitope discontinu, constitué par des régions éloignées incluant les extrémités N- et C-terminales [6].

Outre des anticorps neutralisants dirigés contre des séquences peptidiques, il existe aussi une réponse humorale dirigée sélectivement contre des antigènes glucidiques qui ne sont habituellement pas exprimés à la surface cellulaire alors qu'ils sont présents sur les cellules infectées [10, 19, 20]. Ainsi, des anticorps monoclonaux, dirigés contre des structures présentes simultanément sur certains motifs N- et O-liés (figure 1) (Le^x, A1, Tn et Sialyl Tn), neutralisent l'infection par VIH *in vitro* et bloquent la formation de *syncytia* (cellules géantes multinucléées qui résultent de la fusion des cellules CD4⁺ avec des cellules infectées présentant Env à leur membrane). Ces anticorps ont une activité neutralisante étendue: ils agissent sur divers isolats de VIH-1 et de VIH-2 [10]. On a aussi montré que certains anticorps dirigés contre un polysaccharide de levure de type N-lié, le mannan, inhibent *in vitro* l'infection par VIH en interagissant avec certaines structures glucidiques de la gp120 [20].

En dehors du fait que les structures glucidiques de Env peuvent être, par elles-mêmes, une cible pour certains anticorps neutralisants [10, 19, 20], sa forte glycosylation influence aussi

RÉFÉRENCES

13. Montreuil J. Spatial conformation of glycans and glycoproteins. *Biol Cell* 1984; 51: 115-32.
14. Ratner L. Glucosidase inhibitors for treatment of HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1992; 8: 165-73.
15. Fenouillet E. La N-glycosylation du VIH: du modèle expérimental à l'application thérapeutique. *médecine/sciences* 1993; 9: 901-6.
16. Dirckx L, Lindemann R, Ette R, Manzoni C, Moritz D, Mous J. Mutation of conserved N-glycosylation around the CD4-binding site of human immunodeficiency virus type 1 gp120 affects viral infectivity. *Virus Res* 1990; 18: 9-20.
17. Fenouillet E, Gluckman JC, Bahraoui E. Role of N-linked glycans of envelope glycoproteins in infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990; 64: 2841-8.
18. Li Y, Luo L, Rasool N, Kang CY. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* 1993; 67: 584-8.
19. Adachi M, Hayami M., Kashiwagi M, et al. Expression of Ley antigen in HIV-infected T cell line and in peripheral lymphocytes of patients with AIDS and AIDS-related complex. *J Exp Med* 1988; 167: 323-31.
20. Muller WEG, Schroder HC, Reuter P, Maidhof A, Uhlenbruck G, Winkler I. Polyclonal antibodies to mannan from yeast also recognise the carbohydrate structure of gp-120 of the AIDS virus: an approach to raise neutralizing antibodies to HIV-1 infection *in vitro*. *AIDS* 1990; 4: 159-62.
21. Girard M, Kieny MP, Pinter A, et al. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 542-6.
22. Emini EA, Nara PL, Schileif WA, et al. Antibody mediated *in vitro* neutralization of HIV-1 abolishes infectivity for chimpanzees. *J Virol* 1990; 64: 3674-8.
23. Davis D, Stephens DM, Willers C, Lachmann PJ. Glycosylation governs the binding of antipeptide antibodies to regions of hypervariable amino-acid sequence within recombinant gp120 of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 1990; 71: 2889-98.
24. Benjouad A, Gluckman JC, Rochat H, Montagnier L, Bahraoui E. Influence of carbohydrate moieties on the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp160. *J Virol* 1992; 66: 2473-83.
25. Benjouad A, Mabrouck, Gluckman JC, Fenouillet E. Effect of sialic acid removal on the antibody response to the third variable domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *FEBS Letters* 1994; 341: 244-50.
26. Bolmstedt A, Olofsson S, Sjogren-Jansson E, et al. Carbohydrate determinant NeuAc-Gal of N-linked glycans modulates the antigenic activity of human immunodeficiency virus type-1 glycoprotein gp120. *J Gen Virol* 1992; 73: 3099-105.
27. Back NK, Smit TL, Goudsmit J, Tersmette M. HIV-1 molecular clones exhibiting three different mechanisms of neutralization escape from gp120 monoclonal antibodies. Abstract PO-A21-0446, IXth International Conference on AIDS, Berlin, 1993: 209.
28. Back NK. 1993. Thèse de sciences soutenue à l'Université d'Amsterdam.
29. Wolinsky SM, Wike CM, Korber BTM, et al. Selective transmission of human immunodeficiency virus type-1 variants from mothers to infants. *Science* 1992; 265: 1134-7.
30. Benjouad A, Gluckman JC, Montagnier L, Bahraoui E. Specificity of antibodies produced against native or desialylated human immunodeficiency virus type 1 recombinant gp160. *J Virol* 1993; 67: 1693-7.
31. Huso DL, Narayan O, Hart GW. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J Gen Virol* 1988; 62: 1974-80.
32. Botarelli P, Houlden BA, Haigwood NL, Servis C, Montagna D, Abrignani S. N-glycosylation of HIV-gp120 may constrain recognition by T lymphocytes. *J Immunol* 1991; 147: 3128-32.
33. Drummer H, Jackson D, Brown L. Modulation of CD4+ T-cell recognition of influenza hemagglutinin by carbohydrate side chains located outside a T-cell determinant. *Virology* 1993; 192: 282-9.
34. Wells DE, Compans RW. Expression and characterisation of a functional human immunodeficiency virus envelope glycoprotein in insect cells. *Virology* 1990; 176: 575-86.
- l'immunogénicité et l'antigénicité d'épitopes peptidiques. L'élucidation du rôle que jouent les glycanes pourrait permettre de commencer à comprendre comment le virus échappe *in vivo* à la neutralisation par les anticorps. Comme nous allons le voir, les glycanes affectent, en fait, la réponse immune contre des régions comme V3, le site de fixation à CD4, le domaine de fusion, mais aussi, sans doute, la réponse dirigée contre d'autres régions jouant un rôle critique dans l'infectivité.

Glycosylation et antigénicité de V3

La boucle V3 est une des cibles principales des stratégies vaccinales puisqu'il semble établi que des anticorps anti-V3 puissent protéger le chimpanzé de l'infection expérimentale par VIH-1 [21, 22]. Bien que cette boucle ne comprenne au plus que deux glycanes [11], l'influence de la glycosylation globale de Env sur ses propriétés immunologiques a été suggérée :

- Des anticorps dirigés contre un peptide de V3 (acides aminés 301-315) ne se fixent pas à la gp120 normalement glycosylée alors qu'ils se fixent à la forme non glycosylée [23].

- Les anticorps de lapins immunisés par de la gp160 traitée par des mannosidases sont incapables de reconnaître la région centrale de V3 [24]. Cette absence de réactivité est peut-être liée à une atteinte de l'intégrité de l'épitope (changements conformationnels induits par des modifications de l'hydrophilie ou dégradation protéolytique).

- Les anticorps de lapin produits contre la gp160 traitée par des sialidases ont une capacité accrue à reconnaître les séquences de V3 d'isolats différents [25]. A côté de cette augmentation d'immunogénicité, la désialylation de la gp160 provoque une diminution de sa réactivité vis-à-vis des anticorps anti-V3 [26]. Ce dernier résultat est à rapprocher du fait que des anticorps monoclonaux anti-V3 réagissent faiblement avec la gp160 produite en présence de désoxyjirimycine,

gp160 qui est alors peu sialylée [9, 14].

- Enfin, l'addition dans V3 d'un glycan, à un site contigu du site de fixation des anticorps neutralisants, provoque la résistance à la neutralisation du virus correspondant [27].

- Très récemment, on a montré que des clones de VIH-1 ne présentant pas de glycosylation en position N306 dans V3 étaient plus sensibles à la neutralisation induite par des anticorps monoclonaux anti-V3, ou par des anticorps dirigés contre le site de fixation à CD4, que des clones glycosylés à cette position [28]. Curieusement, l'étude des séquences de V3 chez les patients montre que la glycosylation en N306 est très souvent présente au cours des phases asymptomatiques précoces. La résistance à la neutralisation humorale qu'il procure *in vitro* pourrait donc avoir une pertinence *in vivo*. L'importance des interactions entre V3 et glycanes dans la pathogénicité du VIH est aussi suggérée *in vivo* puisque ce sont fréquemment des mutants viraux dépourvus de site de glycosylation en N306 qui sont responsables de la transmission materno-fœtale de l'infection [29]. Ces résultats indiquent clairement que l'antigénicité de V3, et sans doute ses fonctions, sont influencées par la glycosylation.

Glycosylation et antigénicité d'autres régions de la gp160

L'analyse comparée de la reconnaissance de la gp120, glycosylée ou déglycosylée, par des anticorps anti-peptides montre que la présence des glycanes peut modifier son immunoréactivité [23] : cinq épitopes de la gp120, correspondant à des séquences de V1, V2, V3 ou V4, ne sont accessibles aux anticorps qu'une fois la molécule déglycosylée, et ils semblent donc masqués par les chaînes glucidiques sur la molécule native. Un de ces épitopes (acides aminés 61-75) ne contient pas de site de glycosylation et son inaccessibilité au sein de la structure tridimensionnelle native est donc sans doute causée par l'encombrement de glycanes avoisinants.

Alors que des anticorps dirigés contre la gp160 traitée par des manno-

sidases ne neutralisent plus l'infection par VIH, la désialylation de Env accroît son immunogénicité : les anticorps de lapin dirigés contre la gp160 désialylée, contrairement à ceux produits contre la gp160 native, reconnaissent la gp140 de VIH-2 [24]. Cette reconnaissance est essentiellement le fait de l'apparition d'une population d'anticorps réagissant avec l'épitope dominant de la gp41 [30]. Mais les anticorps anti-gp160 désialylée reconnaissent aussi une région située en aval de la boucle V2 de la gp120 (acides aminés 262-266), région apparemment silencieuse sur la molécule native [24, 26].

Les glycanes affectent donc l'antigénicité de la gp160 et leur effet est probablement le résultat d'interactions complexes, entre glycanes et squelette protéique, d'une part, et entre les glycanes eux-mêmes, d'autre part. La façon dont l'acide sialique peut influencer l'antigénicité des glycoprotéines donne une idée de la complexité de ces phénomènes : dans le contexte de la molécule native, la charge négative de l'acide sialique interagit sans doute avec les acides aminés basiques et ces interactions peuvent maintenir ainsi la conformation en « parapluie » des chaînes glucidiques [2, 13]. Ces conformations glycaniques, par leur encombrement stérique, peuvent empêcher la reconnaissance et la fixation des anticorps à certains épitopes ainsi « protégés ». *A contrario*, le clivage de l'acide sialique restaure la mobilité des branches glucidiques et abolit ainsi l'effet protecteur. L'antigénicité et l'immunogénicité de la protéine sont alors augmentées puisque de nouveaux épitopes deviennent accessibles. Mais l'effet du clivage de l'acide sialique, et la disparition de ses charges, peuvent aussi entraîner des modifications de la conformation interne de la molécule et permettre l'exposition de nouveaux épitopes, comme cela a été observé pour la séquence en aval de V2 [24].

L'acide sialique a un effet important sur les propriétés immunologiques d'un certain nombre de glycoprotéines virales : par exemple, le clivage de l'acide sialique présent à la surface du virus CAEV, virus responsa-

ble de l'arthrite et de l'encéphalite caprines, accroît la cinétique de neutralisation du virus par les anticorps et rend les particules virales plus sensibles à la dégradation protéolytique [31]. Ces observations indiquent que l'acide sialique contribue ici à masquer à la fois le site de fixation des anticorps et le site d'action de la protéinase K.

L'ensemble de ces données indique que les glycanes ont un rôle majeur dans la réponse immune humorale contre Env du VIH. Récemment, l'importance de la glycosylation dans la présentation antigénique aux lymphocytes T auxiliaires a été aussi suggérée : un clone spécifique de la gp120 déglycosylée ne reconnaît pas la molécule glycosylée. A l'aide de peptides synthétiques, on a pu localiser l'épitope T reconnu par ce clone dans une séquence de V3 qui possède un site de glycosylation et dont la reconnaissance par les lymphocytes T serait limitée par la présence de glycanes dans cet épitope [32]. Une observation similaire a été faite pour le virus de l'influenza : des chaînes glucidiques situées à l'extérieur de certains déterminants antigéniques influencent la reconnaissance par les lymphocytes T auxiliaires [33].

Remarques et conclusions

La glycosylation masque donc certains épitopes peptidiques de Env, constituant un moyen efficace pour le virus d'échapper à la réponse immune dirigée contre des régions critiques, tels les épitopes reconnus par les anticorps neutralisants.

Les résultats présentés ici indiquent que si les glycanes de Env mûre ne sont impliqués ni dans ses fonctions ni dans sa conformation biologiquement active, ils jouent, en revanche, un rôle important dans le repliement de la gp160 et dans la modulation de la réponse immune humorale et cellulaire. Or la quasi-totalité des vaccins anti-VIH en voie de développement font intervenir cette glycoprotéine ou ses dérivés. S'il est possible d'obtenir des anticorps neutralisants de spécificité restreinte contre les formes non glycosylées de la gp160 (gp160 déglycosylée ou

produite chez *E. coli*), modifier le type de la glycosylation de la gp160 dans le cadre du développement de vaccins utilisant la glycoprotéine de VIH est certainement un excellent moyen d'optimiser l'immunogénicité de la préparation vaccinale. Une des possibilités consisterait à utiliser comme immunogènes des glycoprotéines recombinantes totalement, ou sélectivement, déglycosylées après leur biosynthèse, grâce à des traitements enzymatiques spécifiques. On obtiendrait ainsi des molécules dont certaines régions critiques devenues plus « vulnérables » en l'absence de sucres pourraient induire une réponse immune apte à contourner la stratégie virale d'échappement. Certes, il reste à établir que des anticorps ainsi obtenus peuvent reconnaître les épitopes présents sur le virus natif et neutraliser son infectivité. Mais on peut aussi espérer s'approcher ainsi de la glycosylation la plus apte à induire une réponse immune optimale.

L'alternative serait de choisir la qualité de la glycosylation par le biais du système cellulaire d'expression des antigènes recombinants : en

effet, les structures glucidiques obtenues dans des cellules de mammifères sont de type complexe [11, 12], très similaires à celles des glycoprotéines virales, alors qu'elles sont de type oligomannosidique [34], sans sialylation donc, lorsque l'expression se fait dans des cellules d'insectes. Si toutes ces glycoprotéines interagissent avec une forte affinité avec CD4, le fait que la glycosylation influence profondément les propriétés antigéniques de ces glycoprotéines devrait être pris en compte pour le choix du système de production des antigènes vaccinaux. ■

Remerciements

Nous remercions M. M. Yagello pour son aide dans la représentation de la gp120 et de la gp41, M. J.C. Gluckman pour ses suggestions et Mmes M. Fenouillet et N. Blanes pour leurs remarques critiques sur la forme du manuscrit. Nous avons bénéficié de l'aide financière de l'ANRS, de l'UREF, de la FERS et de l'AmFAR.

Summary

Immune response against human immunodeficiency virus envelope glycoprotein : does glycosylation act as a shield or as Achilles's heel ?

Human immunodeficiency virus (HIV) envelope glycoprotein (Env) is one of the major targets for the immune response and anti-Env antibodies were reported to provide protection *in vivo* and *in vitro* against HIV infection. Its unusual highly glycosylated state has not gone unnoticed and it has offered a unique opportunity to study the influence of the glycosylation on the immunological properties of a glycoprotein. Some answers already obtained suggest attractive possibilities. How do carbohydrate moieties act on the antigenicity of a glycoprotein? Is it possible to alter the glycosylation in order to improve the anti-HIV immune response?

TIRÉS A PART

A. Benjouad.