

## Mise en évidence de peptides antigéniques de la protéine Env du virus HIV

Armand Bensussan

Une des grandes particularités du lymphocyte T est de reconnaître des peptides antigéniques non pas lorsqu'ils se présentent sous forme soluble comme le fait le lymphocyte B mais lorsqu'ils sont présentés à la surface des cellules cibles par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [1-3].

En fonction de leur affinité particulière pour les molécules du CMH on distingue deux sous-populations de lymphocytes T : l'une de ces sous-populations cellulaires, normalement majoritaire, exprime l'antigène de différenciation CD4 et possède des récepteurs spécifiques capables de reconnaître l'antigène peptidique présenté par les molécules de la classe II du CMH. L'autre sous-population est composée de cellules CD8<sup>+</sup> dont le récepteur spécifique reconnaît l'antigène lorsque celui-ci est présenté par les molécules de la classe I du CMH. Les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont essentiellement des cellules effectrices de la cytotoxicité à médiation cellulaire alors que les cellules CD4<sup>+</sup>, lorsqu'elles sont activées spécifiquement, sécrètent des lymphokines qui agissent sur d'autres types cellulaires et, de ce fait, sont principalement impliquées dans le contrôle et la différenciation des cellules du système immunitaire. A ce schéma général il existe des exceptions, notamment une minorité de lymphocytes CD4, qui peuvent acquérir, sous l'action de l'interféron  $\gamma$ , une activité cytotoxique [4]. Par ailleurs, des résultats récents semblent indiquer que les cellules suppressives qui expriment l'antigène de différenciation CD8 reconnaissent l'antigène associé aux molécules de la classe II du CMH [5].

Le virus de l'immunodéficience humaine ou HIV (*human immunodeficiency virus*), responsable du syn-

drome de l'immunodéficience acquise, a un tropisme préférentiel pour les lymphocytes CD4<sup>+</sup>, la molécule CD4 étant elle-même le récepteur cellulaire spécifique du HIV, fixant le virus par l'intermédiaire de sa glycoprotéine d'enveloppe gp 120. La protéine virale d'enveloppe joue un rôle important dans la cellule cible du virus, notamment par un mécanisme analogue à celui de la fusion cellulaire par laquelle le virus se transmet de cellules à cellules : la molécule gp 120 à la surface d'une cellule infectée se lie aux molécules CD4 des cellules voisines. La fusion des membranes engendre une grosse masse appelée syncytium, limitée par une membrane et renfermant de nombreux noyaux. Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> en sont les principales victimes ; néanmoins le virus infecte d'autres populations de cellules comme les macrophages et les cellules gliales, qui peuvent exprimer très peu de molécules CD4. La formation de syncytia amplifie l'effet destructeur du virus et semble responsable de la disparition de ce « chef d'orchestre » du système immunitaire qu'est le lymphocyte CD4<sup>+</sup>. En effet le lymphocyte CD4<sup>+</sup> activé spécifiquement est non seulement nécessaire pour amplifier une réponse humorale, mais est aussi essentiel pour induire la différenciation et la propagation des lymphocytes CD8 effecteurs de la cytotoxicité [6], ces derniers étant indispensables à la défense de l'organisme contre les cellules infectées par le HIV.

Étant donné que l'utilisation d'un vaccin à base de virus tué semble actuellement devoir être écarté, il nous a semblé important d'identifier des peptides antigéniques de la protéine Env du HIV-1 capables de stimuler les lymphocytes CD4<sup>+</sup> afin de

les utiliser comme composants éventuels d'un vaccin contre le SIDA. D'autre part, sachant que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> provenant d'individus HIV-1 positifs asymptomatiques ont souvent une réponse proliférative à des antigènes spécifiques considérablement diminuée, nous avons préféré utiliser les lymphocytes CD4<sup>+</sup> du sang périphérique d'individus sains volontaires pour être immunisés avec des virus recombinants de la vaccine contenant le gène de l'enveloppe du HIV-1.

Les lymphocytes du sang périphérique de 14 individus ainsi immunisés et réimmunisés *in vivo* six mois après avec des fragments contenant au moins 40 % de l'extrémité C terminale de la protéine gp 120 ont été stimulés *in vitro* par deux peptides synthétiques différents (correspondant à des segments particuliers de la protéine gp 120) dont il a été préalablement décrit qu'ils entraînaient une réponse proliférative dans un modèle murin [7]. Le peptide env-T1 correspond aux acides aminés 428-443 (Lys-Gln-Ile-Ile-Asn-Met-Trp-Gln-Glu-Val-Gly-Lys-Ala-Met-Tyr-Ala) alors que le second peptide env-T2 correspond aux résidus 112-124 (His-Glu-Asp-Ile-Ile-Ser-Leu-Trp-Asp-Gln-Ser-Leu-Lys) de la gp 120. Les résultats indiquent que, 40 jours après la deuxième immunisation, huit des 14 individus étudiés répondent au peptide env-T1 et quatre au peptide env-T2. La réponse au peptide env-T2 n'était pas attendue dans la mesure où le fragment de la protéine gp 120 utilisé lors du rappel ne contenait pas la séquence 112-124 (env-T2) [8].

Dans le but de mettre en évidence une réponse proliférative spécifique des lymphocytes CD4<sup>+</sup> aux peptides de l'env-T1, nous avons choisi deux individus, parmi les huit qui don-

naient une réponse proliférative significative face aux peptides de l'env-T1. La population CD8<sup>+</sup> a été éliminée lors du prélèvement des lymphocytes du sang périphérique par lyse dépendante du complément en utilisant un anticorps spécifique anti-CD8. Le *Tableau 1* indique que la population cellulaire du sang périphérique des individus 2 et 3 séparée des lymphocytes CD8 donne une réponse proliférative spécifique similaire à celle de la population non séparée. De plus, lorsqu'un anticorps anti-CD4 (OKT4) est rajouté au début de la culture cellulaire, une nette inhibition de la réponse à l'antigène env-T1 est observée. Ces résultats montrent clairement que le peptide correspondant aux résidus 428-443 de la gp 120 est un motif antigénique pour les lymphocytes CD4 humains.

L'approche — qui consiste à définir des peptides viraux que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> reconnaissent, dans le but de les inclure dans un vaccin qui aurait pour vocation de développer une réponse des lymphocytes T amplificateurs — est essentielle dans la défense de l'organisme contre toute agression d'un rétrovirus tel que le HIV ■

## Summary

### Antigenic peptides from Env- protein of human immunodeficiency virus

In the normal immune defense against virus, CD4<sup>+</sup> helper T lymphocytes are necessary for the antibody response as well as the cytotoxic response performed by the CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Therefore, it is important to define antigenic sites of the viral Env- protein of HIV to develop helper CD4<sup>+</sup> cell immunity to this virus. We show that synthetic peptides of the viral envelope protein gp 120 are able to induce *in vitro* CD4<sup>+</sup> T lymphocytes proliferation. For our study we use peripheral blood mononuclear cells from of human volunteers who had been immunized with a recombinant vaccinia virus containing the AIDS viral envelope gene and boosted with a recombinant fragment.

	Individu 2*		Individu 3*	
	Cellules non séparées	Cellules séparées des lymphocytes CD8	Cellules non séparées	Cellules séparées des lymphocytes CD8
Milieu de culture***	145**	233	621	507
Milieu de culture + 4 µM de peptide env-T1	5 312	4 827	12 356	13 010
Milieu de culture + 4 µM de peptide env-T1 + 100 ng/ml OKT 4	1 460	1 132	4 916	4 470

\* Les individus 2 et 3 ont été sélectionnés pour leur réponse proliférative importante au peptide env-T1. \*\* Incorporation de thymidine radioactive au jour 7 de la culture cellulaire. Chaque valeur (cpm) correspond à la valeur médiane de trois cultures identiques indépendantes. \*\*\* Le test de prolifération consiste à cultiver 2 · 10<sup>5</sup> cellules dans un volume final de 200 µl de milieu de culture constitué de RPMI 1640, 10 % de sérum de veau fœtal et des antibiotiques.

## RÉFÉRENCES

- Zinkernagel R, Doherty P. H-2-compatibility requirement for T-cell-mediated lysis of target cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: different cytotoxic T-cell specificities are associated with structures from H-2K or H-2D. *J Exp Med* 1975; 141: 1427-36.
- Babbitt B, Allen P, Matsueda G, Haber E, Unanue E. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985; 317: 359-61.
- Buus S, Sette A, Colon SM, et al. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T-cell recognition. *Cell* 1986; 47: 1071-7.
- Bensussan A. CD4 cytotoxic T lymphocytes differentiation. *Biochimie* 1988; 70: 937-40.
- Shinohara N, Watanabe M, Sachs DH, Hozumi N. Killin of antigen-reactive B cells by class II-restricted, soluble antigen-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1988; 336: 481-4.
- Chouaib S, Bensussan A, Termijtelen AM, et al. Allogeneic T-cell activation triggering by MHC class I antigens. *J Immunol* 1988; 141: 423-9.
- Cease KB, Margalit H, Cornette JL, et al. Helper T-cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency syndrome virus gp 120 envelope protein and induction of immunity in mice of the native protein using a 16-residue synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4249-53.
- Berzofsky JA, Bensussan A, Cease KB, et al. Antigenic peptides recognized by T lymphocytes from AIDS viral envelope-immune humans. *Nature* 1988; 334: 706-8.

### Remerciements

Je voudrais remercier ici D. Zagury (Institut Pierre-et-Marie-Curie, Paris, France), et J.A. Berzofsky (NCI, Bethesda, USA) sans lesquels ce travail n'aurait pu être réalisé.

### ADRESSE

A. Bensussan : chargé de recherche. INSERM U. 93, Hôpital Saint-Louis, Centre Hayem, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris Cedex, France.

### TIRÉS A PART

A. Bensussan.