Rôle du changement de conformation du CD4 lors de la fusion VIH/cellule

On the role of CD4 conformational change in the HIV-cell fusion process

YVES-HENRI SANEJOUAND

Laboratoire de physique quantique, UMR 5626 du CNRS, IRSAMC, université Paul-Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex,

RÉSUMÉ

On sait que le complexe Gp120-Gp41 change de conformation lorsqu'il se fixe sur le CD4. On a de bonnes raisons de penser que le CD4 change alors lui aussi de conformation. Un calcul des modes normaux de vibration des deux domaines N-terminaux du CD4 a récemment montré qu'il devrait s'agir, pour cette partie du CD4, d'un mouvement dit « de charnière ». On vérifie ici qu'on obtient un résultat similaire à celui obtenu précédemment, lorsqu'on étudie deux autres structures cristallographiques, déterminées de manière indépendante. Un schéma décrivant les premières étapes du processus conduisant à l'infection d'une cellule par le VIH est ensuite proposé. Il repose sur l'idée que les changements de conformation du CD4 et de Gp120-Gp41 permettent le rapprochement des membranes virales et cellulaires.

Mots clés: modes normaux de vibration, structures cristallographiques, co-récepteurs, CXCR4, CCR5, infection, Gp120, Gp41

ABSTRACT

It is well known that the gp120-gp41 complex undergoes a conformational change after CD4 binding. It is likely that CD4 undergoes a conformational change as well. Recently, a calculation of the normal modes of the two N-terminal domains of CD4 has shown that a hinge-bending motion of one of these domains with respect to the other may occur. In the present study, results obtained previously are verified with two other normal mode calculations, starting from crystallographic structures of different origin. A scheme describing the first steps of the process leading to cell infection by human immunodeficiency virus (HIV) is then proposed. It rests upon the idea that CD4 and gp120-gp41 conformational changes allow for bringing the cell and virus membranes closer to each other.

Keywords: normal mode, crystallographic structures, co-receptors, CXCR4, CCR5, cell infection, Gp120, Gp41

Abridged version (see p. 168)

Introduction

Le CD4 est le récepteur du virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Il a une très grande affinité pour Gp120, une des protéines de l'enveloppe du virus ($K_a \approx 10^{-10}$ M).

Le CD4 est constitué de six domaines structuraux. Les quatre premiers (résidus 1-374), dont la localisation est extracellulaire, sont de type « immunoglobuline ». Le suivant (résidus 375-395) est un court segment transmembranaire tandis que le dernier (résidus 396-435) est

Note présentée par Luc Montagnier Note remise le 13 novembre 1996, acceptée après révision le 20 janvier 1997 intracellulaire. Les structures des deux premiers domaines du CD4 humain (résidus 1-178), d'une part [1-3], et des deux suivants du CD4 du rat noir (résidus 183-374), d'autre part [4], ont été résolues à l'échelle atomique (figure 1). Confrontés aux résultats de nombreuses études, de mutagenèse dirigée notamment, ces travaux ont permis de montrer que les chaines latérales de certains acides aminés du premier domaine du CD4 interagissent vraisemblablement avec Gp120 lors de la formation du complexe CD4-Gp120. En particulier : Lys 29, Lys 35, Phe 43, Lys 46 et Arg 59 [3].

On s'est très rapidement aperçu que la présence du CD4 à la surface d'une cellule ne suffisait pas à permettre son infection par le VIH [5], mais ce n'est que très récemment qu'on a pu identifier quelques-uns des co-récepteurs du virus. Il s'agit de récepteurs des chimiokines : CXCR4, tout d'abord nommé « fusine » [6], CCR5 [7], etc. Ce qui permet par exemple d'expliquer pourquoi les chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β inhibent l'infection des macrophages par certaines souches du virus [8] (le CD4 et CCR5 sont présents à la surface des macrophages).

On sait par ailleurs qu'après sa fixation sur le CD4 Gp120 change de conformation, ce qui rend accessible une partie de Gp41, une protéine transmembranaire du VIH impliquée dans le processus de fusion des membranes du virus et de la cellule hôte [9].

On a de bonnes raisons de penser qu'un changement de conformation du CD4 est aussi nécessaire. Ce changement de conformation serait complexe. Il concernerait, d'une part, la région charnière entre les domaines 2 et 3 du CD4. On a en effet isolé un anticorps monoclonal qui se fixe sur un épitope localisé au voisinage de cette région charnière, qui n'inhibe pas la fixation de Gp120 sur le CD4, tout en empêchant l'infection par le VIH [10]. De plus, on a montré que cette région est très flexible [4] et que le VIH ne peut pas infecter une cellule portant à sa surface un CD4 dépourvu de cette région [11].

La région charnière entre les domaines 1 (résidus 1-99) et 2 (résidus 100-178) du CD4 serait aussi impliquée dans son changement de conformation. En effet, le mouvement le plus ample de ces deux domaines, tel qu'on l'obtient en calculant leurs modes de vibration, est un mouvement relatif de l'un de ces domaines par rapport à l'autre, chacun d'eux restant relativement rigide au cours du mouvement [12]. C'est certainement la grande flexibilité de la boucle BC du second domaine (résidus 120-127, dont trois prolines et une glycine) qui rend possible ce mouvement, celui-ci s'effectuant malgré la surface importante et le caractère compact de la zone de contact entre les deux domaines [1], dont la boucle BC fait partie. Or la boucle BC fait aussi partie de l'épitope du CD4 reconnu par un anticorps monoclonal, 5A8, qui inhibe la formation de cellules multinucléées, appelées syncitia, qui proviennent de la fusion de cellules saines et de cellules infectées par le VIH (l'interaction entre le CD4 et Gp120, présent à la surface des cellules infectées, est à l'origine de ce phénomène). 5A8, de plus, inhibe l'infection des lymphocy-

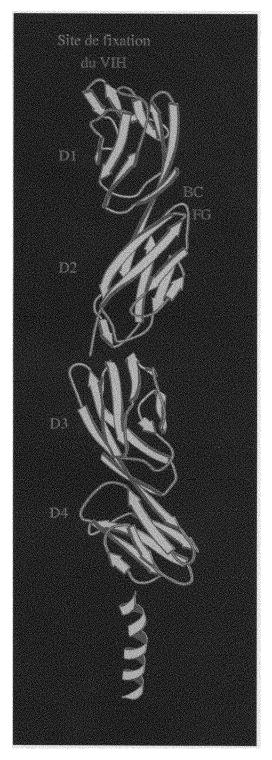


Figure 1. Structure des quatre premiers domaines du CD4.

L'orientation relative des deux premiers domaines (D1, D2) et des deux suivants (D3, D4) est arbitraire (elle n'est pas connue, les structures cristallographiques des deux paires de domaines ayant été obtenues séparément). L'hélice représentée au bas de la figure est la portion transmembranaire du CD4. La structure du domaine intracellaire est inconnue. Les localisations du site de fixation du VIH et des boucles BC (résidus 120-127) et FG (résidus 163-166) du second domaine sont indiquées (figure créée avec MOLSCRIPT [34]).

tes T4 par le VIH, et ce, avec la même efficacité que Leu3a, un anticorps anti-CD4 qui agit en empêchant la fixation de Gp120 sur le CD4. L'épitope reconnu par 5A8 est pourtant clairement distinct du site de fixation de Gp120 puisque 5A8, le CD4 et Gp120 peuvent former des complexes ternaires [13]. On notera que, de plus, le remplacement simultané des résidus Pro 121, Pro 122, Gly 123, dans la boucle BC, par les résidus Ser, Lys, Val, respectivement, diminue l'affinité du CD4 pour Gp120 [14] alors que cette boucle est située à plus de 15 Å du site d'interaction entre le CD4 et Gp120. Enfin, rappelons qu'on a montré dans de nombreux cas - par exemple, ceux de l'hexokinase [15], du lysozyme [16-17], ou de la citrate synthase [18] - que le mouvement de plus grande amplitude obtenu lorsqu'on calcule les modes normaux de vibration d'une conformation donnée de ces protéines ressemble beaucoup au changement de conformation qu'on observe lorsque ces protéines sont mises en présence de leur substrat. L'hypothèse que les deux premiers domaines du CD4 peuvent changer de conformation, que ce changement de conformation se produit lorsque Gp120 et le CD4 se fixent l'un sur l'autre, et qu'il ressemble au mouvement de grande amplitude brièvement décrit cidessus, est donc à prendre en considération. D'autant plus qu'un mouvement de ce type, mais de quelques degrés d'amplitude seulement, a déjà été observé lors de la comparaison de deux structures du CD4, obtenues à partir de cristaux de maille de symétrie différente [3], ainsi que lors d'une simulation de dynamique moléculaire en présence de solvant [19].

Le calcul des modes normaux de vibration des deux premiers domaines du CD4 [12] avait été fait à partir de 3cd4 [2], la structure cristallographique la mieux résolue (R = 2,2 Å) parmi celles qui sont actuellement disponibles dans la base de données de Brookhaven. Les calculs analysés ci-après furent faits à partir de deux autres structures : 1cdh (R = 2,3 Å) et 1cdi (R = 2,8 Å). Ces structures ont été obtenues indépendamment de 3cd4, par un autre groupe de chercheurs [1, 3] et, en ce qui concerne 1cdi, la maille du cristal étudié avait une symétrie différente. De fait, les position des C_{α} dans 3cd4, 1cdh et 1cdi diffèrent de près de 1 Å, en moyenne.

Le but du présent travail est de confirmer les résultats obtenus précédemment [12], mais aussi de proposer un modèle décrivant les toutes premières étapes du processus conduisant à l'infection d'une cellule par le VIH.

Méthode

La théorie des modes normaux [20] repose sur le fait que si l'énergie potentielle d'un système, V, peut être approximée par :

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i} \sum_{j} k_{ij} \left(r_i - r_i^e \right) \left(r_j - r_j^e \right)$$

où r_i^e et r_j^e sont les coordonnées i et j du système étudié, alors on peut résoudre analytiquement les équations du mouvement des N atomes de ce système. Cette théorie a un caractère général. On peut en effet toujours faire une telle approximation, dès lors qu'on s'intéresse au mouvement des atomes au voisinage d'un minimum de la surface d'énergie potentielle du système (dans ce cas, k_{ij} est la dérivée seconde de V par rapport à r_i et r_j).

Dans le cadre de cette théorie, le mouvement de chaque atome résulte de la superposition de 3N contributions sinusoidales d'amplitude et de fréquence différentes – les modes normaux de vibration du système. En pratique, la fréquence du mode normal j est obtenue à partir de la j e valeur propre de la matrice 3N x 3N dont les éléments sont les k_{ij} , pondérés par $(m_i m_j)^{-1/2}$.

On constate notamment que, à une température donnée, plus la fréquence d'un mode de vibration est basse, plus son amplitude est grande. Dans le cas des protéines, on a pu montrer que les modes dont la fréquence dépasse 30 cm^{-1} contribuent pour une part négligeable à l'amplitude des déplacements atomiques [21].

Comme précédemment [12], les études de 1cdh et 1cdi ont commencé par une minimisation d'énergie poussée, effectuée avec le programme CHARMM [22] version 21,3, en utilisant des paramètres pour atomes étendus (ce qui signifie que seuls les hydrogènes impliqués dans des liaisons polaires sont traités explicitement; ainsi, les deux premiers domaines du CD4 sont composés de 1 722 atomes). Les interactions électrostatiques et de Van der Waals furent calculées, respectivement, avec un rayon de coupure de 7,5 Å et une fonction de lissage de type SHIFT [22], et une fonction de lissage de type SWITCH [22] entre 6,5 et 7,5 Å. La minimisation fut stoppée lorsque la force moyenne s'exerçant sur les atomes devenait inférieure à 10⁻⁴ kcal/(mole.Å). Ensuite, la matrice des dérivées secondes de l'énergie potentielle, d'ordre 3N = 5166, fut calculée, puis diagonalisée. Comme cette matrice n'est pas très grande, ce sont les algorithmes standard, disponibles dans CHARMM, qui ont été utilisés. Ainsi, l'obtention de 20 valeurs et vecteurs propres a demandé environ 20 min de CPU sur un processeur de l'IBM SP2 du CNUSC, à Montpellier. Le critère de fin de minimisation adopté dans ce travail permet d'obtenir pour chaque matrice six valeurs propres numériquement nulles (environ 10⁻⁷ – chacune de ces valeurs correspondant à un mouvement de translation ou de rotation d'ensemble de la protéine), ce qui garantit une excellente précision pour les autres, et notamment pour la première valeur propre non nulle ainsi que pour le vecteur propre qui lui est associé (ce vecteur donne les amplitudes des déplacements atomiques correspondant au mode de vibration de plus basse fréquence).

Résultats et discussion

Au cours des minimisations d'énergie, qui nécessitent environ 10 000 étapes chacune, les C_α s'éloignent notablement de leur position initiale : de 1,8 et 1,6 Å en moyenne, pour 1cdh et 1cdi, respectivement. Dans le premier cas, après minimisation, l'énergie potentielle est de -7 318,6 kcal/mole, ce qui est très voisin de la valeur trouvée en partant de 3cd4 [12]: -7 313,2 kcal/mole (pourtant les positions des C_{α} diffèrent de près de 2 Å en moyenne, dans les deux structures ainsi obtenues). Dans le cas de 1cdi, on arrive à une valeur significativement plus élevée: -7 279,9 kcal/mole. Comme il s'agit d'énergies potentielles calculées in vacuo, on ne peut cependant conclure de manière catégorique : si les valeurs des énergies de solvatation étaient ajoutées aux valeurs cidessus, 1 cdi pourrait tout aussi bien avoir l'énergie la plus basse des trois.

Le fait que les structures minimisées et cristallographiques soient clairement distinctes est habituel. Les minimisations d'energie étant effectuées in vacuo, ce n'est d'ailleurs pas surprenant.

Le calcul des modes de vibration n'ayant un sens physigue certain que lorsque les déplacements des atomes sont de faible amplitude [20], on aurait d'ailleurs pu croire, a priori, qu'il ne doit pas être possible d'obtenir avec une telle méthode une description, même approximative, des changements de conformation qu'effectuent certaines protéines et au cours desquels quelques uns de leurs résidus se déplacent de plus de 10 Å. Ce qu'il faut saisir, c'est que ce type de calcul permet d'extraire des informations sur les caractéristiques purement mécaniques d'une protéine. Le mode de vibration de plus basse fréquence d'une protéine est en effet le mouvement calculé au cours duquel ses atomes se déplacent le plus, pour un coût en énergie donné [20]. Or, si les atomes d'une protéine peuvent se déplacer beaucoup, en dépit du caractère compact de la structure des protéines, c'est en se déplaçant de manière collective. C'est ce déplacement d'ensemble, qui peut s'effectuer en rencontrant une résistance minimale, dont on peut obtenir une description approchée en calculant le mode normal de vibration de plus basse fréquence d'une protéine.

Les figures 2 et 3 décrivent le mouvement de plus grande amplitude calculé pour les deux premiers domaines du CD4 dans le cas des structures 1cdh et 1cdi, respectivement. Ce type de carte est dû à Seno et Go [23]. Elle indique si deux résidus se rapprochent (un point) ou s'éloignent (une croix) de manière significative au cours du mouvement. Les zones blanches signifient donc que les acides aminés concernés ne se rapprochent (ou ne s'éloignent) pas beaucoup. Lorsqu'une zone blanche est située de part et d'autre de la diagonale de la carte, cela signifie que le bloc d'acides aminés concerné se comporte de manière relativement rigide. Les figures 2 et 3 décrivent donc un mouvement quasi-rigide du premier domaine du CD4 par rapport au second. Dans le cas de

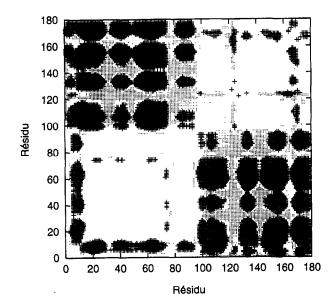


Figure 2. Variation des distances entre les résidus d'acide aminé des deux premiers domaines du CD4, lors de leur mouvement de plus grande amplitude, tel qu'il fut calculé à partir de la structure cristallographique 1cdh.

. et + signifient que les résidus se rapprochent (.) ou s'éloignent (+) plus que ne le font en moyenne, et en valeur absolue, l'ensemble des paires de résidus.

1cdh (figure 2), comme dans le cas de 3cd4 [12], seuls quelques acides aminés ont un mouvement propre à l'intérieur de chaque domaine, notamment ceux des boucles BC et FG du second domaine, ainsi que certains acides aminés N-terminaux. Dans le cas de 1cdh toutefois, le mouvement de la boucle FG paraît être de plus faible amplitude. Le mouvement décrit pour la structure 1cdi (figure 3) est, lui, notablement différent de celui décrit pour les deux autres structures, le premier domaine paraissant

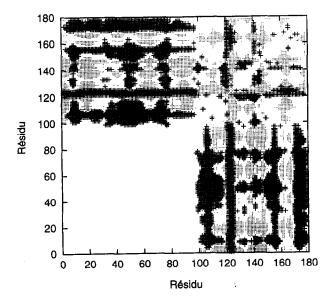


Figure 3. Comme pour la figure 2, mais à partir de 1 cdi.

dans ce cas beaucoup plus rigide que le second. Il est satisfaisant de constater que le résultat le plus sensiblement différent de celui obtenu pour 3cd4 l'est pour 1cdi, la structure de loin la moins bien résolue (R=2,8 Å), celle dont l'énergie potentielle est par ailleurs la plus élevée, après minimisation.

Lorsqu'on compare les mouvements des résidus du second domaine calculés pour chacune des trois structures, 3cd4, 1cdh et 1cdi, on remarque que dans les trois cas la boucle BC se montre particulièrement flexible (figure 4). D'une structure à l'autre, la flexibilité de la boucle FG (résidus 163-166) est, elle, plus variable. Des résultats similaires sont obtenus lorsqu'on analyse les modes de vibration correspondant à la deuxième ou à la troisième plus basse fréquence de chacune de ces structures (dans le cas de 3cd4, voir [12]).

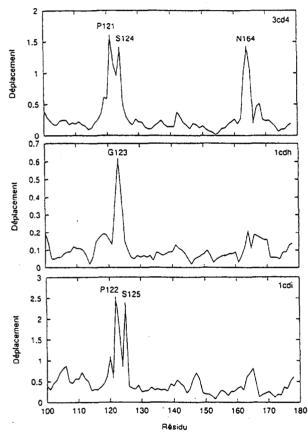


Figure 4. Déplacement maximum (en Å) de chacun des C_{α} du second domaine du CD4, lors du mouvement de plus grande amplitude des deux premiers domaines du CD4, tel qu'il fut calculé à partir des structures cristallographiques 3cd4, 1cdh et 1cdi.

Dans le cadre de la théorie des modes normaux, il faut 3 kcal/mole pour obtenir de tels déplacements.

Rappelons que la boucle FG fait aussi partie de la zone de contact entre les deux domaines. L'insertion de Ser-Arg après Asn 164 diminue d'ailleurs l'affinité du CD4 pour Gp120 [24]. De plus, plusieurs anticorps monoclonaux qui inhibent la formation de syncitia reconnaissent un

épitope voisin de Gln 165. L'un d'eux, MT151, reconnaît un épitope qui est à cheval sur les deux domaines, de part et d'autre de la région charnière – les résidus 1, 94 et 165 font partie de cet épitope [25–27]. Il est donc clair que la fixation de MT151 sur le CD4 doit pouvoir empêcher tout mouvement relatif de grande amplitude de la part des deux premiers domaines du CD4.

Conclusion

Les résultats décrits ci-dessus confirment qualitativement ceux obtenus précédemment [12]. Ils confortent donc l'hypothèse que le CD4 doit pouvoir effectuer un changement de conformation au cours duquel ses deux premiers domaines changent d'orientation relative, ce mouvement étant rendu possible par la grande flexibilité de la boucle BC du second domaine. Les données relatives à des anticorps monoclonaux tels 5A8 ou MT151 suggèrent de plus qu'un tel mouvement est nécessaire au processus qui conduit à la fusion des membranes du virus et de la cellule hôte.

La figure 5 décrit schématiquement les premières étapes du processus qui conduit à l'infection d'une cellule par le VIH, telles qu'on peut les imaginer lorsqu'on souhaite tenir compte de l'ensemble des faits évoqués dans le présent travail. Selon ce modèle, le changement de conformation du CD4 impliquerait à la fois les régions charnières entre les domaines 1 et 2, d'une part, 2 et 3, d'autre part, rendant possible un ajustement fin de la position dans l'espace du premier domaine du CD4. Couplé au changement de conformation de Gp120-Gp41, ce changement de conformation permettrait le rapprochement des membranes du virus (ou d'une cellule infectée, lors de la formation de syncitia) et de la cellule portant le CD4 à sa surface. Il y aurait alors interaction entre le corécepteur et V3, une portion de Gp120 connue pour être responsable du tropisme des souches virales [6], ce qui stabiliserait l'ensemble et rendrait possible la fusion des deux membranes lors d'une étape ultérieure. On a d'ailleurs récemment montré que le complexe Gp120-CD4 interagit directement avec CXCR4 [28]. On a aussi montré que lorsque cette interaction a lieu en présence de PMA (phorbol-acétate-myristate), le complexe Gp120-CD4 est internalisé [28]. Il est probable qu'une telle internalisation est l'un des autres phénomènes clés permettant la fusion des membranes virales et cellulaires. Il est aussi possible qu'il y ait un contact direct entre une boucle extracellulaire de CCR5 et l'interface située entre les domaines 2 et 3 du CD4. On a en effet montré que les deux premiers domaines du CD4 inhibent la fixation de MIP- 1α et MIP-1 β sur CCR5, alors qu'un CD4 soluble complet ne le fait pas [29] (le contact aurait lieu suite au changement de conformation du CD4, au cours duquel cette interface doit se trouver exposée). On a aussi montré qu'un anticorps monoclonal, Q425, qui reconnait un épitope localisé sur le troisième domaine, est capable d'inhiber

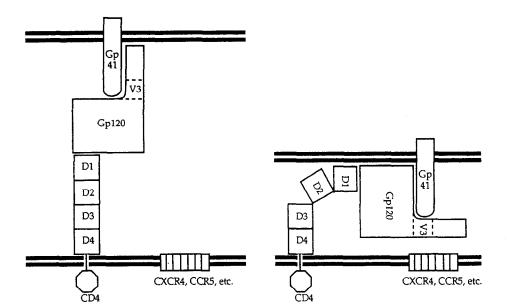


Figure 5. Premières étapes du processus conduisant à l'infection d'une cellule par le VIH.

Les membranes de la cellule (en bas) et celle du virus (en haut) sont chacune symbolisée par deux épais traits noirs. À gauche : lors de la première étape, le VIH se fixe sur une cellule portant le CD4, grâce à la forte interaction Gp120–CD4. À droite : les changements de conformation du CD4 et de Gp120-Gp41 permettent le rapprochement des membranes du virus et de la cellule. L'interaction entre Gp120 et le corécepteur stabilise cette configuration, à partir de laquelle pourra se faire la fusion des deux membranes.

l'infection des lymphocytes par certaines souches du virus – celles qui ne sont pas primaires, c'est-à-dire celles dont le corécepteur n'est pas CCR5.

Dans le cadre du modèle décrit dans la figure 5, les propriétés antivirales de RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β proviendraient de la compétition entre ces chimiokines et Gp120 pour le corécepteur. De fait, on a récemment montré qu'un analogue non fonctionnel de RANTES avait lui aussi des propriétés antivirales [30].

En ce qui concerne les perspectives thérapeutiques, on conçoit bien qu'il pourrait être possible de trouver des molécules ayant une forte affinité pour le corécepteur et, ainsi, des propriétés antivirales voisines de celles des chimiokines. Ces molécules pourraient d'ailleurs avoir très peu d'effets secondaires puisqu'il semble que les individus qui ont des récepteurs CCR5 non fonctionnels, ce qui est le cas de 1 % des individus d'origine caucasienne, vivent tout à fait normalement et sortent indemnes de toute infection, même lorsqu'ils subissent une exposition répétée au virus [31].

Il faudra cependant très certainement que ces molécules ne soient pas des protéines. En effet, les protéines qui circulent dans le sang sont, à de rares exceptions près, très rapidement dégradées. De plus, leur production est coûteuse.

Or, il faut se rendre compte que l'affinité du complexe CD4-Gp120 pour CCR5 est importante ($K_d \approx nM$ [29]). Il ne sera donc pas facile de trouver une molécule pouvant perturber la fixation de Gp120 sur ce corécepteur (on

ABRIDGED VERSION

Human CD4 is the receptor for human immunodeficiency virus (HIV). The binding of gp120, an envelope protein of HIV, to the N-terminal domain of CD4 is the first step of a process leading to HIV entry into cells. It is now known that

n'en a, par exemple, trouvé à ce jour aucune qui soit capable de perturber la fixation de Gp120 sur le CD4, et qui ait grâce à cela un réel intérêt thérapeutique).

Mais peut-être qu'en cherchant de telles molécules en trouvera-t-on une qui, à l'instar des anticorps monoclonaux 5A8 ou MT151, perturbera, voire empêchera, le changement de conformation du CD4, et aura, ainsi, elle aussi des propriétés antivirales. Comme on peut de plus croire que ce changement de conformation doit avoir un rôle fonctionnel, par exemple lors de l'interaction du CD4 avec le CMH-II [12], on peut même penser qu'une telle molécule est déjà produite par l'organisme humain, cette molécule lui permettant de réguler la fonction normale du CD4. On peut aussi espérer trouver une molécule qui entre en compétition avec la portion de CCR5 qui semble se fixer à l'interface entre les domaines 2 et 3 du CD4. Une telle compétition aurait l'avantage de se faire vis-à-vis de deux partenaires qui ne sont pas hautement variables (comme peut l'être Gp120).

D'un autre côté, s'il se confirme que l'internalisation du complexe Gp120-CD4-corécepteur est une des étapes clés conduisant à l'entrée du VIH dans une cellule, alors on peut penser que certaines molécules proches du PMA s'avéreront avoir un réel intérêt thérapeutique. Par exemple : la prostratine, un dérivé du phorbol découvert dans des infusions que les Samoans utilisent pour traiter la fièvre jaune [32], une autre maladie virale, et dont on a montré qu'elle inhibe l'effet cytopathogène du HIV [33].

chemokine receptors such as CXCR4, CCR5, etc., are involved in the subsequent steps of this process. However, it has often been proposed that a conformational change occurs in the HIV envelope glycoproteins, induced by gp120 binding to CD4. Evidence for an HIV-induced conformational change in CD4 has also been obtained.

The latter conformational change is likely to be complex. First, a relative movement of domain two with respect to domain three may occur. Indeed, while the hinge region between these two domains is known to be flexible, it belongs to the epitope recognized by a monoclonal antibody able to block HIV infectivity, but not able to compete with gp120 for CD4 binding. Second, a relative movement of domain one with respect to domain two may also occur. Indeed, the hinge region between these two domains belongs to epitopes recognized by several monoclonal antibodies able to block HIV infectivity. Some of them do not compete with gp120 for CD4 binding as well (the hinge region between domains one and two and the HIV binding site are more than 15 Å away from each other). Moreover, although these two domains were found by crystallographers to be tightly abutting, a normal mode calculation has shown that a hinge-bending motion is nevertheless possible, due to the flexibility of loop BC in the second domain (residues 120-127, including three prolines and one glycine). Note that for several proteins the hinge-bending motion experimentally observed upon ligand binding was found to be similar to the largest amplitude motion obtained with the normal mode theory for these proteins.

The previous calculation of the normal modes of the two N-terminal domains of CD4 was performed starting from 3cd4, the crystallographic structure with the better resolution factor (R = 2.2 Å). Here, in order to confirm the results obtained, other calculations are performed, starting from 1cdh (R = 2.3 Å) or 1cdi (R = 2.8 Å), two structures solved by another group, the latter in the case of a different crystal symmetry.

Energy minimization and normal mode calculations were performed with the CHARMM-21 program package. The energy of the minimized structure, starting from 1cdh, is close to the energy previously obtained, starting from 3cd4, though the r.m.s. distance between both energy-minimized structures is close to 2 Å. The largest amplitude normal mode obtained for the two corresponding structures are also very similar. In the case of 1cdi, the energy value reached at the end of the minimization process is significantly higher than in the two other cases while the largest amplitude normal mode obtained is clearly different. Note that 1cdi is the crystallographic structure with the worst resolution factor.

However, in all three cases, the largest amplitude normal mode is a hinge-bending motion during which large displacements of residues in loop BC occurs. Thus, the results obtained in the present work with 1cdh and 1cdi confirm those obtained previously with 3cd4. They reinforce the hypothesis that the two N-terminal domains of CD4 undergo a conformational change upon HIV binding.

In order to link these results with other known data related to the process leading to HIV entry into cells, the following scheme is proposed. First, the hinge-bending motions of domains one and two of CD4, on the one hand, of domains two and three, on the other, allows for a very accurate positioning in space of domain one, after gp120 binding. Together with the well documented conformational change of gp120-gp41, it brings the virus membrane much closer to the cell membrane, and makes possible the interaction of region V3 of gp120 with the co-receptor (the V3 region is involved in HIV cell tropism and co-receptor selection). This interaction stabilizes the whole conformational change of the CD4-gp120-gp41 complex, allowing for membrane fusion in the further steps of the process. The last steps of the process may involve the downregulation of the co-receptor.

Indeed, evidence for a physical association of CXCR4 with the CD4-gp120 complex has recently been obtained. Moreover, when phorbol myristate acetate (PMA) is added, tailless CD4 are downmodulated.

Within the framework of this scheme, RANTES, MIP- 1α and MIP- 1β chemokines have anti-HIV properties because they compete with gp120 for binding to their receptors. Indeed, it has recently been shown that a non-functional analogue of RANTES also has anti-HIV properties.

Therefore, molecules able to compete with gp120 for binding to CCR5 would probably be useful for HIV therapy. In particular, they may have few secondary effects, since individuals lacking functional CCR5 seem to live without any problem (while they are free from infection, despite repeated exposure to the virus).

However, it is likely that such molecules will have to be non-proteic. First, most proteins are rapidly cut into pieces in blood circulation. Second, protein production is expensive. But then it has to be kept in mind that it is often difficult to find molecules able to compete with a protein for binding to another protein, since most protein-protein interactions are strong ones. Indeed, no molecule having a therapeutic interest and able to compete with CD4 for binding to gp120 has ever been found in 10 years of research effort.

However, while seeking of such molecules, maybe one will find a molecule able to block CD4 conformational changes, thus having interesting anti-HIV properties. Since, however it is likely that CD4 conformational changes play some role in normal CD4 function, one possibility is that such a molecule is already somewhere in the human organism, its function being to regulate CD4 function.

Of course, if it is confirmed that the co-receptor downregulation is one of the last steps of the process leading to the infection of a cell by HIV, then phorbol derivatives may prove to be powerful therapeutic tools. Indeed, it has already been demonstrated that one of them, prostratin, found in extracts used by Samoans against yellow fever, inhibits cell killing by HIV-1.

RÉFÉRENCES

- 1. Ryu S.E., Kwong P.D., Truneh A., Porter T.G., Arthos J., Rosenberg M., Dai X., Xuong N.H., Axel R., Sweet R.W. Hendrickson W.A., 1990. Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* 348, 419-426
- 2. Wang J., Yan Y., Garret T.P.J., Liu J., Rodgers D.W., Garlick R.L., Tarr G.E., Husain Y., Reinherz E., Harrison S.C. 1990. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* 348, 411-418
- 3. Ryu S.E., Truneh A., Sweet R.W., Hendrickson W.A. 1994. Structures of an HIV and MHC binding fragment from human CD4 as refined in two crystal lattices. *Structure* 2, 59-74
- 4. Brady R.L., Dodson E.J., Dodson G.G., Lange G., Davis S.J., Williams A.F., Barcaly A.N. 1993. Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4, relation to the NH2-terminal domains. *Science* 260, 976-983
- 5. Maddon P.J., Dalgleish A.G., McDougal J.S., Clapham P.R., Weiss R.A., Axel R. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333-348
- 6. Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E., Berger E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877
- 7. Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y., Nagashima K.A., Cayanan C., Maddon P.J., Koup R.A., Moore J.P., Paxton W.A. 1996. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-673
- 8. Cocchi F., DeVico A.L., Garzino-Demo A., Arya S.K., Gallo R.C., Lusso P. 1995. Identification of RANTES, MIP- 1α , MIP- 1β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science* 270, 1811-1815
- 9. Sattentau Q.J., Moore J.P., Vignaux F., Traincard F., Poignard P., 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* 67, 7383-7393
- 10. Healey D., Dianda L., Moore J.P., McDougal J.S., Moore M.J., Estess P., Buck D., Kwong P.D., Beverley P.C.L., Sattentau Q.J. 1990. Novel anti-CD4 monoclonal antibodies separate human immunodeficiency virus infection and fusion of CD4+ cells from virus binding. *J. Exp. Med.* 172, 1233-1242
- 11. James W., Welss R.A., Simon J.H.M. 1995. The receptor of HIV: dissection of CD4 and studies of putative accessory factors. *Curr. Topics in Microbiol. Immunol.* 205, 137-158
- 12. Sanejouand Y.H. 1996. Normal-mode analysis suggests important flexibility between the two N-terminal domains of CD4 and supports the hypothesis of a conformational change in CD4 upon HIV binding. *Protein Engineering*, 9, 671-677
- 13. Burkly L.C., Olson D., Shapiro R., Winkler G., Rosa J.J., Thomas D.W., Williams C., Chisholm P., 1992. Inhibition of HIV infection by a novel CD4 domain 2-specific monoclonal antibody. *J. Immunol.* 149, 1779-1787
- 14. Clayton L.K., Hussey R.E., Steinbrich R., Ramachandran H., Husain Y., Reinherz E.L., 1988. Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV-gp120 binding, *Nature* 335, 363-366
- 15. Harrison W. 1984. Variational calculation of the normal modes of a large macromolecule: methods and some initial results. *Biopolymers* 23, 2943-2949
- 16. Brooks B., Karplus M., 1985. Normal modes for specific motions of macromolecules: application to the hinge-bending mode of lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4995-4999
- 17. Gibrat J.F., Go N., 1990. Normal mode analysis of human lysozyme: study of the relative motion of the two domains and characterization of the harmonic motion. *Proteins* 8, 258-279

- 18. Marques O., Sanejouand Y.H., 1995. Hinge-bending motion in citrate synthase arising from normal modes calculations. *Proteins*. 23, 557-560.
- 19. Ptaszek L.M., Vijayakumar S., Ravishanker G., Beveridge D.L., 1994. Molecular dynamics studies of the human CD4 protein. *Biopolymers* 34, 1145-1153
- 20. Goldstein H. 1950. *Classical Mechanics*. Addison Wesley, Reading, MA
- 21. Levy R.M., Perahia D., Karplus M. 1982. Molecular dynamics of an a-helical polypeptide: temperature dependance and deviation from harmonic behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 1346-1350
- 22. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. 1983. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.* 4, 187-217
- 23. Seno Y., Go N. 1990. Deoxymyoglobin studied by the conformational normal mode analysis. *J. Mol. Biol.* 216, 95-109
- 24. Mizukami T., Fuerst T.R., Berger E.A., Moss B. 1988. Binding region for human immunodeficiency virus (HIV) and epitopes for HIV-blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9273-9277
- 25. Jameson B.A., Rao P.E., Kong L.I., Hahn B.H., Shaw G.M., Hood L.E., Kent S.B.H. 1988. Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. *Science* 240, 1335-1338
- 26. Peterson A., Seed B. 1988. Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. *Cell* 54, 65-72
- 27. Ashkenazi A., Presta L.G., Marsters S.A., Camerato T.R., Rosenthal K.A., Fendly B.M., Capon D.J. 1990. Mapping the CD4 binding site for human immunodeficiency virus by alanine-scanning mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7150-7154
- 28. Lapham C.K., Ouyang J., Chandrasekhar B., Nguyen N.Y., Dimitrov D.S., Golding H. 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 274, 602-605
- 29. Wu L., Gerard N.P., Wyatt R., Choe H., Parolin C., Ruffing N., Borsetti A., Cardoso A.A., Desjardin E., Newman W., Gerard C., Sodroski J. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384, 179-183
- 30. Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J.L., Rousset D., Clark-Lewis I., Loetscher P., Moser B., Baggiolini M., 1996. HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature* 383, 400-400
- 31. Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragousti S., Lapouméroulle C., Cognaux J., Forceille C., Muyldermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R.J., Collman R.G., Doms R.W., Vassart G., Parmentler M., 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of CCR-5 chemokine receptor gene. Nature 382, 722-725
- 32. Cox P.A., 1993. Saving the ethnopharmacological heritage of Samoa. *J. Ethnopharmacol.* 38, 181-188
- 33. Gustafson K.R., Cardellina II J.H., McMahon J.B., Gulakowski R.J., Ishitoya J., Szallasi Z., Lewin N.E., Blumberg P.M., Welslow O.S., Beutler J.A., Buckheit R.W., Cragg G.M., Cox P.A., Bader J.P., Boyd M.R. 1992. A nonpromoting phorbol from the Samoan medicinal plant *Homalanthus nutans* inhibits cell killing by HIV-1. *J. Med. Chem.* 35, 1978-1986
- 34. Kraulis P. 1991. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24, 946-950