

COMMUNAUTE FRANCAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBLOUX

Contribution à l'étude du peptide de fusion et du
domaine transmembranaire des glycoprotéines de
fusion virales de classe 1

Aurélien LORIN

Essai présenté en vue de l'obtention du grade de docteur
en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs : Pr. Robert Brasseur
Dr. Benoît Charloteaux

2007

Lorin Aurélien (2007). Contribution à l'étude du peptide de fusion et du domaine transmembranaire des glycoprotéines de fusion virales de classe 1 (thèse de doctorat). Gembloux Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 224 p., 1 tabl., 13 fig.

Résumé : Les glycoprotéines de fusion virales de classe 1 contrôlent la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Ces glycoprotéines présentent une extrémité N-terminale indispensable à la fusion, le peptide de fusion. Les peptides de fusion sont capables d'induire à eux seuls la fusion de membranes *in vitro*. Dans cette étude, nous avons d'abord analysé les peptides de fusion de gp41 du HIV et de gp30 du BLV. Ces deux peptides de fusion sont des peptides obliques : ils s'insèrent obliquement dans la membrane sous forme hélicoïdale. Nos études ont montré une relation entre la capacité de ces deux peptides de fusion à s'insérer obliquement dans la membrane et la capacité de leurs glycoprotéines de fusion à induire la fusion. Dans le cas du BLV, nous avons également montré une relation entre l'obliquité du peptide de fusion et sa fusogénicité. Cette relation obliquité-fusogénicité a été utilisée pour prédire avec succès la région minimale des deux peptides de fusion suffisante pour induire une fusion significative *in vitro*, qui correspond respectivement aux douze et aux quinze premiers acides aminés de gp41 et gp30. Nos résultats montrent également que le peptide caméléon, un peptide *de novo* avec une structure labile, s'insère obliquement dans la membrane et induit la fusion *in vitro*. Le fait que ce peptide fasse partie des peptides obliques, comme les peptides de fusion du HIV et BLV, renforce l'hypothèse d'un lien entre la fusogénicité des peptides de fusion et leur flexibilité structurale.

De nombreuses études réalisées sur les glycoprotéines de fusion de classe 1 indiquent que le domaine transmembranaire intervient également dans la fusion virale. Ce domaine doit être suffisamment long pour que la fusion soit complète. Dans ce travail, nous avons montré qu'un peptide transmembranaire modèle, le peptide KALR, est capable de s'insérer et d'induire la fusion de liposomes *in vitro*. En comparant les résultats de modélisation moléculaire avec ceux de FTIR et ceux de la fusion de phase lipidique/perméabilisation de liposomes, nous avons également montré que le taux d'insertion membranaire et la fusogénicité de KALR dépendent de la longueur de son cœur hydrophobe. En effet, le taux d'insertion de KALR dans la membrane est beaucoup plus important lorsqu'il contient un cœur hydrophobe lui permettant de traverser entièrement la membrane. Dans cette situation, KALR est capable d'induire la déstabilisation et la fusion de membranes alors que lorsque son cœur hydrophobe est trop court pour lui permettre de traverser la membrane, il en est incapable. Ces résultats ont permis d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes intervenant lors de la fusion induite par les glycoprotéines de fusion virales.

Lorin Aurélien (2007). Contribution to the study of the fusion peptide and the transmembrane domain of class 1 viral fusion glycoproteins (thèse de doctorat in French). Gembloux, Belgium Gembloux Agricultural Faculty, 224 p., 1 tabl., 13 fig.

Summary: Class 1 fusion glycoproteins of viruses are involved in the fusion between viral envelope and cell membrane. The N-terminal extremity of these glycoproteins, called fusion peptide, is essential for fusion. Fusion peptides are able to induce by themselves *in vitro* membrane fusion. Firstly, we analysed fusion peptides of HIV-1 gp41 and BLV gp30. These two peptides are tilted peptides: they insert obliquely in the membrane when helical. Our studies showed a correlation between the ability of these two fusion peptides to insert obliquely in the membrane and the ability of whole glycoproteins to induce fusion. For BLV, a relationship between the obliquity of the fusion peptide and its fusogenicity was also observed. This obliquity/fusogenicity relationship was used to successfully predict the

minimal region of the two fusion peptides sufficient to induce significant *in vitro* fusion. The minimal fusion peptide corresponds respectively to the twelve and to the fifteen first residues of gp41 and gp30. Our results also showed that the chameleon peptide, a *de novo* peptide with structural flexibility, inserts obliquely into the membrane and induces *in vitro* fusion. The fact that this peptide is a tilted peptide, like fusion peptides of HIV-1 and BLV, confirms the hypothesis of a relationship between the fusion peptides fusogenicity and their structural flexibility.

A lot of studies on class 1 fusion glycoproteins of viruses indicate that the transmembrane domain is also directly involved in the viral fusion. Glycoproteins must have a domain long enough to induce complete fusion. In this study, we showed that a model transmembrane peptide, KALR peptide, is able to insert into membranes and to induce their fusion. By comparing molecular modelling results with those of FTIR, of liposomes lipid-mixing and of liposomes leakage, we also showed that the insertion rate into the membranes and the fusogenicity of KALR depend on the length of its hydrophobic core. Indeed, the insertion rate of KALR into the membrane is greatly larger when it contains a hydrophobic core long enough to allow the peptide to traverse the membrane. In this situation, KALR is able to destabilize membranes and to induce their fusion, while when it is too short to match the membrane, it is unable to induce fusion. These results allow to better understanding mechanisms involved in the fusion induced by viral fusion glycoproteins.

Copyright : Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886, sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous une autre forme est donc faite en violation avec la loi.

« L'envie de savoir est le plus puissant moteur humain »

Bernard Werber

Extrait de l'empire des Anges

Remerciements

La thèse de doctorat présentée ici a été réalisée au sein du Centre de Biophysique Moléculaire Numérique de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Je tiens tout d'abord à remercier mes promoteurs de thèse, le professeur Robert Brasseur et le docteur Benoît Charlotheaux, ainsi que le docteur Laurence Lins, pour leur accueil ainsi que leurs conseils aussi bien au niveau de la modélisation moléculaire qu'au niveau des analyses expérimentales et pour la rédaction de cette thèse et des articles scientifiques associés.

J'exprime toute ma gratitude à mes deux rapporteurs, Erik Goormaghtigh, professeur et directeur de recherches FNRS à l'Université Libre de Bruxelles, et Richard Kettmann, professeur à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je les remercie également pour leurs nombreux conseils concernant respectivement la spectroscopie infrarouge et la fusion virale.

Je remercie André Théwis, Michel Paquot, Daniel Portetelle, Bernard Wathelet, professeurs à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux ainsi que Laurence Lins, chercheur qualifié FNRS à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, pour avoir accepté de participer à mon jury.

J'adresse mes remerciements à Annick Thomas, directeur de recherche INSERM à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, pour ses nombreux conseils fournis tout au long de mon doctorat.

Mes remerciements vont également à Yechiel Shai, directeur de recherche au sein du département de chimie biologique de l'Institut Weizmann (Rehovot, Israël), pour notre collaboration ainsi que pour l'accueil qu'il m'a réservé lors de mon passage dans son laboratoire durant l'été 2006. Je tiens également à remercier Vincent Stroobant, chercheur à l'Institut Ludwig de Bruxelles, pour ses nombreuses synthèses peptidiques.

Merci à toute l'équipe du CBMN : à Christelle pour avoir guidé mes pas dans le laboratoire expérimental, à Marc et Benoît, pour avoir partagé quotidiennement mes « pétages de plombs », à Jean-Marc D., Colette et Viviane, pour m'avoir simplifié la vie au niveau administratif, à Gaëtan, pour ses nombreuses interventions informatiques, à Sébastien D., Sébastien S., Nicolas et Jean-Marc C., pour leur bonne humeur. Je tiens également à remercier ceux qui sont passés au sein du laboratoire et qui m'ont aidé lors de ma thèse.

Merci également à toute l'équipe du département de chimie biologique de l'Institut Weizmann et plus particulièrement à Arik qui, en plus de m'avoir aidé au sein du laboratoire m'a fait découvrir les charmes d'Israël.

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans les soutiens financiers qu'ont bien voulu m'octroyer le Fonds National de la Recherche Scientifique, par l'intermédiaire d'une bourse Télévie, et la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, par l'intermédiaire d'une bourse de doctorat durant l'année 2003.

Enfin, je tiens à remercier mes proches. Un grand merci à mes parents pour les sacrifices qu'ils ont fait afin de me permettre de réaliser ce doctorat ainsi que pour leur soutien continu. Mes plus tendres remerciements vont à ma fiancée Anne, qui m'a toujours soutenu et n'a jamais hésité à m'aider durant ces années.

Table des matières

<u>Introduction générale</u>	1
<u>I. Introduction</u>	3
1. La fusion membranaire	3
1.1. Mise en contact des deux membranes	4
1.2. Fusion des monocouches externes	5
1.2.1. Intermédiaire « stalk »	6
1.2.2. Intermédiaire TMC	8
1.2.3. Intermédiaire « diaphragme d'hémifusion »	8
1.3. Fusion des monocouches internes et formation du pore de fusion initial	9
1.4. Pore de fusion final	10
2. Les glycoprotéines virales : des protéines spécialisées dans la fusion membranaire	11
2.1. Propriétés communes aux glycoprotéines de fusion virales de classe 1	12
2.2. Structures et changements de conformations des glycoprotéines de classe 1	13
2.3. Mode d'action des glycoprotéines de classe 1	16
3. Peptide de fusion	17
3.1. Peptide de fusion et séquence	19
3.2. Effet des peptides de fusion sur la membrane	21
3.3. Peptide de fusion et structure	24
4. Domaine transmembranaire	27
4.1. Substitution du domaine transmembranaire par une ancre lipidique	27
4.2. Substitution du domaine transmembranaire par un autre domaine protéique	28
4.3. Diminution de la longueur du domaine transmembranaire	28
4.4. Mutations au niveau du domaine transmembranaire	29
4.5. Fusogénicité de peptides correspondant au domaine transmembranaire de glycoprotéines virales	29
4.6. Hypothèses sur le mode d'action du domaine transmembranaire lors de la fusion	30

5. Les peptides obliques	33
5.1. Hélices insérées obliquement dans les membranes	33
5.2. Peptide oblique et structure	34
5.3. Une asymétrie hydrophobe à l'origine de l'orientation oblique	35
5.4. Relation obliquité-fusogénicité	36
<u>II. But du travail</u>	39
<u>III. Résultats</u>	41
1. Le peptide correspondant aux 12 résidus N-terminaux de la gp41 du HIV est le peptide minimal suffisant pour induire la déstabilisation significative <i>in vitro</i> de membranes mimant celles des lymphocytes T.	41
2. Détermination du peptide de fusion minimal de la gp30 du virus de la leucémie bovine.	43
3. Propriétés déstabilisatrices d'un peptide présentant une plasticité structurale.	45
4. Le mode d'interaction membranaire et les propriétés fusogènes d'un peptide transmembranaire modèle <i>de novo</i> dépendent de la longueur du cœur hydrophobe.	47
<u>IV. Discussion générale</u>	51
1. Conclusions sur l'étude des peptides de fusion	51
2. Conclusions sur l'étude des peptides transmembranaires modèles	54
3. Implication du peptide de fusion et du domaine transmembranaire dans la fusion virale	57
<u>V. Perspectives</u>	61
<u>VI. Références bibliographiques</u>	63
<u>VII. Annexes</u>	93
1. Annexe I : Les liposomes : description, fabrication et applications	93
2. Annexe II : Implication des peptides de fusion des glycoprotéines de fusion virales de classe I dans la fusion membranaire	95

Liste des abréviations

Å : angström (10^{-10} m)

A β : peptide β -amyloïde

Apo : apolipoprotéine

ATR-FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier – réflexion totale atténuée (*attenuated total reflectance - Fourier transform infrared*)

CBMN : Centre de Biophysique Moléculaire Numérique

CD : dichroïsme circulaire (*circular dichroism*)

DiPoPE : dipalmitoleoylphosphatidyléthanolamine

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPhPC : diphytanoylphosphatidylcholine

DPC : dodécyl-phosphocholine

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

EPR : résonance paramagnétique électronique (*electron paramagnetic resonance*)

ESR : résonance de spin électronique (*electron spin resonance*)

FNRS : Fonds National de la Recherche Scientifique

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (*Fourier transform infrared*)

GB1 : domaine de liaison IgG de la protéine G (*IgG-binding domain of protein G*)

gp : glycoprotéine

GpA : glycophorine A

GPI : glycosylphosphatidylinositol

HA2 : sous-unité membranaire de l'hémagglutinine, glycoprotéine de fusion du virus de l'influenza A ou de l'influenza B.

HCA : analyse d'amas hydrophobes (*hydrophobic cluster analysis*)

HFIP : hexafluorisopropanol

IMPALA : *integral membrane protein and lipid association*

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IR : infrarouge

LPC : lysophosphatidylcholine

MHP : potentiel d'hydrophobicité moléculaire (*molecular hydrophobicity potential*)

μ : micro (10^{-6})

nm : nanomètre (10^{-9} mètre)

PA : acide phosphatidique

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : poly(éthylène glycol)

pH : potentiel hydrogène

PrP : protéine prion

RMN : résonance magnétique nucléaire

R-X : rayons X

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

SNARE : récepteur de la protéine d'attachement NSF soluble (*soluble NSF attachment protein receptor*)

SDS : sodium dodécylsulfate

TFE : trifluoroéthanol

TMC : contact des monocouches trans (*trans monolayer contact*)

Virus :

ASLV : virus aviaire du groupe sarcome-leucose (*avian sarcoma and leukosis virus*)

BLV : virus de la leucémie bovine (*bovine leukemia virus*)

CDV : virus de la maladie du carré canine (*canine distemper virus*)

FIV : virus de l'immunodéficience féline (*feline immunodeficiency virus*)

FLV : virus de la leucémie féline (*feline leukemia virus*)

HIV : virus de l'immunodéficience humaine (*human immunodeficiency virus*)

HIV-1 : virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (*human immunodeficiency virus type 1*)

HIV-2 : virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (*human immunodeficiency virus type 2*)

HRSV : virus respiratoire syncytial humain (*human respiratory syncytial virus*)

HTLV : virus T lymphotrope humain (*human T lymphotropic virus*)

MHV : virus de l'hépatite murine (*mouse hepatitis virus*)

MoMuLV : virus de la leucémie murine de Moloney (*moloney murine leukemia virus*)

SIV : virus de l'immunodéficience simienne (*simian immunodeficiency virus*)

virus du SARS : virus du syndrome respiratoire aigu sévère (*severe acute respiratory syndrome virus*).

SV5 : virus para-influenza simien 5 (*simian virus 5*)

VSV : virus de la stomatite vésiculaire (*vesicular stomatitis virus*)

Introduction générale

Depuis toujours, l'homme côtoie les virus. Toutefois, il a fallu attendre la fin du XIX^{ème} siècle pour que l'homme commence à identifier ces agents infectieux. A l'heure actuelle, la communauté scientifique s'accorde à dire que les infections virales seront parmi les grandes pathologies du XIX^{ème} siècle. Le virus responsable du syndrome de l'immuno-déficience acquise (SIDA), le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), a déjà fait 30 millions de morts et infecte actuellement plus de 40 millions de personnes dans le monde. L'émergence de nouveaux virus, comme ceux du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS) ou de l'influenza aviaire, représente des menaces d'épidémies futures.

Des vaccins protecteurs ont permis d'éradiquer certaines épidémies virales. Toutefois, pour de nombreux autres virus, comme le HIV, aucun vaccin n'existe à ce jour. Bloquer l'entrée de ces virus dans la cellule cible représente un espoir de lutte contre ces virus. Dans le cas des virus enveloppés, l'entrée nécessite la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule. De nombreuses avancées ont été réalisées qui permettent de mieux comprendre cette étape. Les molécules impliquées dans la fusion virale ont ainsi été mises en évidence. Dans le cas des virus enveloppés comme ceux du virus de l'influenza A, du virus du SARS, du virus de la leucémie bovine (BLV) ou du HIV, ce sont des glycoprotéines de classe 1 ancrées à la surface de l'enveloppe virale qui induisent la fusion et donc la pénétration du virus dans la cellule cible. Toutefois, le mode d'action de ces protéines reste relativement méconnu. Une meilleure compréhension de ce mode d'action s'avère nécessaire pour permettre le développement de nouvelles techniques de lutte contre les virus.

L'objectif de ce travail est donc de contribuer à accroître les connaissances sur le mode d'action des glycoprotéines de fusion virales de classe 1. Nous avons ainsi étudié les propriétés membranaires et fusogènes de peptides correspondant à l'extrémité N-terminale, également appelée peptide de fusion, des glycoprotéines de fusion des virus HIV-1 et BLV. L'importance des propriétés structurales des peptides de fusion sur leur fusogénicité a également été analysée, en étudiant un peptide *de novo* qui présente une labilité structurale. Enfin, l'implication du domaine transmembranaire des glycoprotéines a été analysée, en quantifiant les propriétés membranaires et fusogènes d'un peptide transmembranaire modèle. Pour toutes ces études, des approches expérimentales et de modélisation moléculaire ont été utilisées

I. INTRODUCTION

1. La fusion membranaire

La fusion membranaire intervient dans de nombreux processus biologiques, comme le transport intracellulaire (Rothman, 1994), le développement musculaire (Towler et al., 2004), la neurotransmission (Gianinazzi et al., 2005 ; Jena, 2005), la fécondation (Longo et Yanagimachi, 1993) et l'infection virale (Hughson, 1995 ; Chizmadzhev, 2004).

Qu'elle soit intracellulaire ou extracellulaire, la fusion est un processus qui implique le rapprochement de deux membranes, leur fusion et le mélange des deux compartiments aqueux précédemment séparés par les deux membranes (Zimmerberg, 1993). Ce mélange aqueux se réalise par l'intermédiaire d'un pore de fusion (Jahn et Grubmuller, 2002).

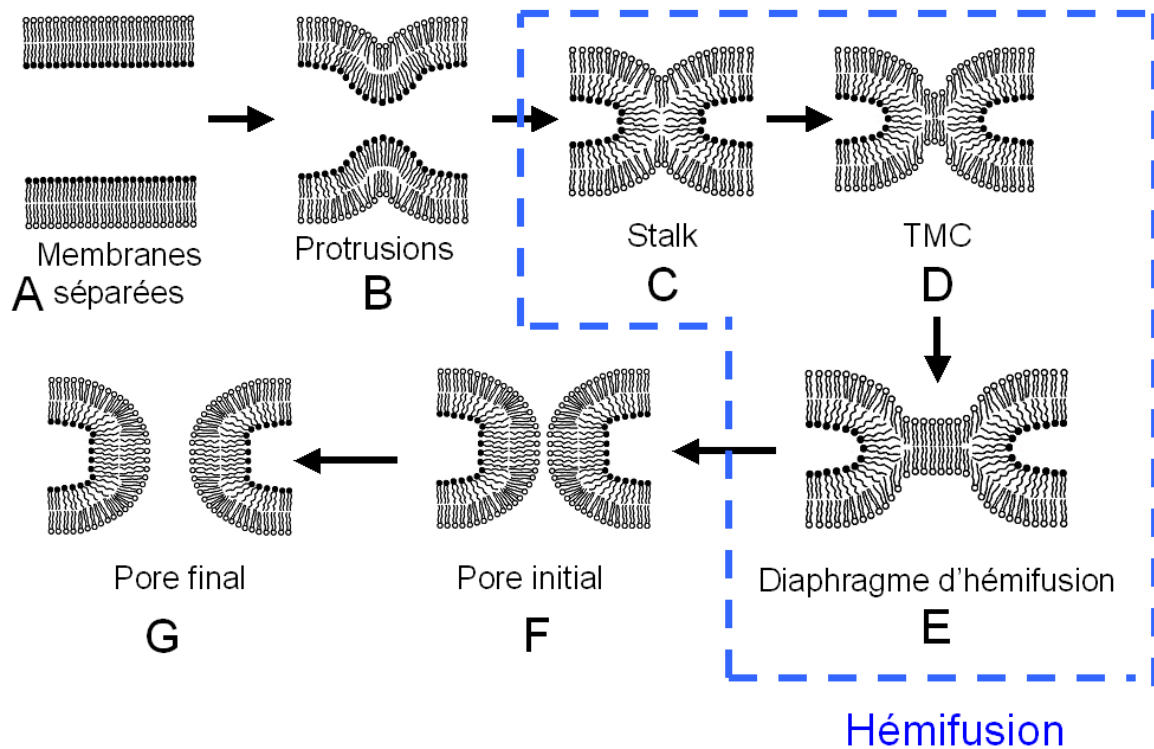


Figure 1 : Différentes étapes de la fusion selon le modèle « stalk ». Les têtes polaires des lipides des monocouches externes sont schématisées en noir, celles des monocouches internes en blanc.

Malgré le développement de techniques permettant de contrôler la fusion, les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de fusion ne sont toujours pas connus avec exactitude. Cette difficulté est majoritairement due à la vitesse à laquelle se réalise la fusion : moins de 100 μ s comme le suggèrent les mesures électrophysiologiques (Lindau et de Toledo, 2003 ; Hafez et al., 2005). Plusieurs modèles ont ainsi été proposés dans la littérature

pour expliquer le déroulement de la fusion (Siegel, 1984, 1993 ; Ellens et al., 1989 ; White, 1992 ; Lindau et Almers, 1995 ; Chernomordik et al., 1995, Kinnunen et Holopainen, 2000 ; Jahn et Grubmüller, 2002). Dans le cas de la fusion virale, de nombreuses expériences suggèrent que la fusion se déroule selon le modèle « stalk » (Chernomordik et al., 1993, 1995 ; Kemble et al., 1994 ; Melikyan et al., 2000 ; Gaudin, 2000 ; Russell et al., 2001 ; Cohen et Melikyan, 2004). Ce modèle propose que la fusion se déroule d'abord par la mise en contact de deux membranes, la fusion de leurs monocouches externes, puis celle de leurs monocouches internes pour finalement évoluer vers le pore de fusion (Figure 1). Toutes ces étapes sont expliquées plus en détail dans les paragraphes ci-dessous.

1.1. Mise en contact des deux membranes

La distance minimale séparant deux bicouches purement lipidiques non chargées est d'environ 2-3 nm alors qu'entre deux membranes cellulaires, elle est d'environ 12 nm à cause de la répulsion électrostatique entre les membranes et entre les protéines membranaires (Figure 1B ; Rand et Parsegian, 1989 ; Skehel et Wiley, 2000). Une diminution de la distance intermembranaire induit une augmentation drastique de l'énergie, ce qui empêche la mise en contact de deux membranes ou deux bicouches (Rand et Parsegian, 1989 ; Siegel, 1993, 1999 ; Chizmadzhev, 2004). Un apport externe d'énergie est donc nécessaire pour diminuer la couche d'hydratation intermembranaire et mettre en contact deux membranes ou deux bicouches. Cet apport peut avoir une origine physique, comme une déshydratation ou une augmentation de pression ou de température (Chernomordik et al., 1987 ; Lentz et Lee, 1999 ; Chizmadzhev, 2004). Deux membranes peuvent également se rapprocher suite à des modifications chimiques, comme une diminution du pH ou l'ajout d'ions (Newton et al., 1978 ; Ellens et al., 1989 ; Chanturiya et al., 2000) ou suite à l'ajout de molécules synthétiques, comme le polymère PEG (Zschornig et Ohki, 1993 ; Lentz, 2006).

Lors de la fusion virale, le contact entre les membranes est induit par des glycoprotéines exposées à la surface virale appelées glycoprotéines de fusion (Chernomordik et al., 2006). Dans ce cas, au moins une des deux membranes se déforme pour interagir avec la seconde membrane (Figure 1B). Le contact est alors localisé au niveau de ces déformations appelées protrusions (Cohen et Melikyan, 2004 ; Chernomordik et al., 2006 ; Efrat et al., 2007). Des vésicules lipidiques présentent de telles protrusions lorsqu'elles sont incubées avec le virus de l'influenza A ou le peptide de fusion du HIV-1 (Figure 2A ; Burger et al.,

1993 ; Kanaseki et al., 1997 ; Agirre et al., 2000). Des calculs théoriques ont prédit que les protrusions adoptaient une forme de selle à cheval dirigée vers la seconde membrane (Kozlov et Chernomordik, 1998 ; Chernomordik et al., 1999).

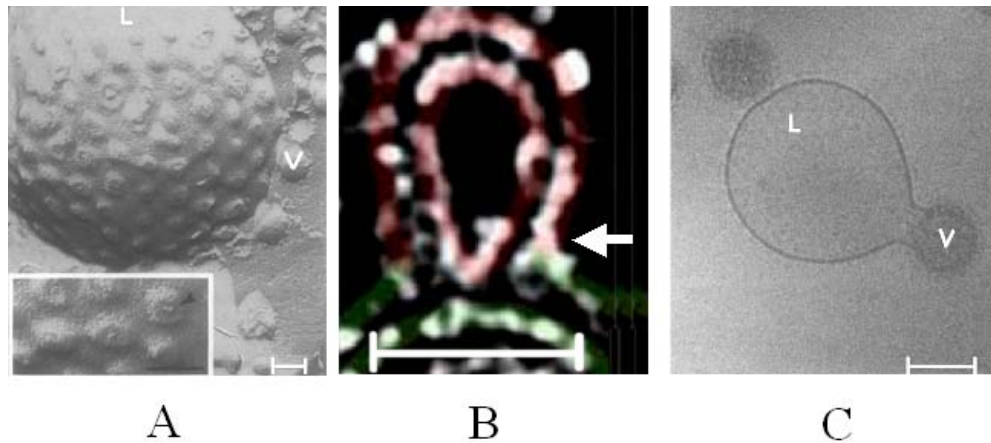


Figure 2 : Trois étapes de la fusion visualisées par microscopie électronique. A : Formation de protrusions à la surface de liposomes (L) en présence de virus (V). En encadré, un agrandissement d'une zone avec protrusions. Venant de Burger et al., 1993. B : Hémifusion entre deux vésicules (une colorée en rouge, l'autre en vert). La flèche indique l'hémifusion. Venant de Zampighi et al., 2006. C : Pore de fusion entre un virus (V) et un liposome (L). Venant de Burger et al., 1993. Pour les trois figures, barre d'échelle = 0,1 μ m.

1.2. Fusion des monocouches externes

De nombreux résultats montrent que la fusion peut être bloquée à un stade où un mélange lipidique s'est opéré alors qu'aucun mélange aqueux n'est mesuré (Melikyan et al., 1995, 2000 ; Chernomordik et al., 1987, 1993, 1995 ; Kemble et al., 1994 ; Lee et Lentz, 1998 ; Gaudin, 2000 ; Russell et al., 2001). Ces résultats suggèrent qu'une étape de la fusion implique la fusion des monocouches externes des deux membranes alors que les monocouches internes n'ont pas fusionné, empêchant un contact aqueux. Cet état est appelé hémifusion puisque seulement la moitié de la fusion complète a été réalisée (Figure 1C-E ; Lentz et Lee, 1999). L'hémifusion a depuis été confirmée par des mesures de microscopie électronique et de fluorescence sur bicouches lipidiques simples et sur membranes biologiques (Figure 2B ; Nussler et al., 1997 ; Pantazatos et MacDonald, 1999 ; Ravoo et al., 2001 ; Lei et MacDonald, 2003 ; Heuvingh et al., 2004 ; Zampighi et al., 2006).

1.2.1. Intermédiaire « stalk »

Suite à la fusion des monocouches externes (également appelées monocouches cis), une structure semi-toroïdale appelée « stalk » se forme (Figure 1C ; Markin et al., 1984 ; Siegel, 1993 ; Malinin et Lentz, 2004 ; Katsov et al. 2004). Les monocouches externes fusionnées adoptent au niveau de cette structure une courbure négative très importante. Récemment, une structure semi-toroïdale similaire à celle du « stalk » a été mesurée par diffraction des R-X suite à la déshydratation de membranes de DPhPC, un lipide dérivé de la DPPC (Yang et Huang, 2002).

La géométrie du « stalk » n'est toutefois pas connue et a fait l'objet de plusieurs propositions. La toute première structure « stalk » proposée contenait des interstices vides énergétiquement défavorables (Figure 3A ; Markin et al., 1984 ; Siegel, 1993). De nombreuses autres géométries de la structure « stalk » ont depuis été proposées, dans le but de diminuer l'espace de ces interstices vides (Figures 3B-E). Les deux derniers modèles proposent que les interstices soient complètement comblés suite à un mouvement des lipides (Figures 3D et E ; Kuzmin et al., 2001 ; Koslovsky et Kozlov, 2002). Le calcul énergétique de ces « stalk » modifiés indique qu'ils ont besoin de moins d'énergie pour se former que le « stalk » non modifié (Figure 3A). Toutefois, de nombreuses approximations sont effectuées lors de ces calculs et il est difficile de connaître la structure « stalk » la plus probable d'un point de vue énergétique.

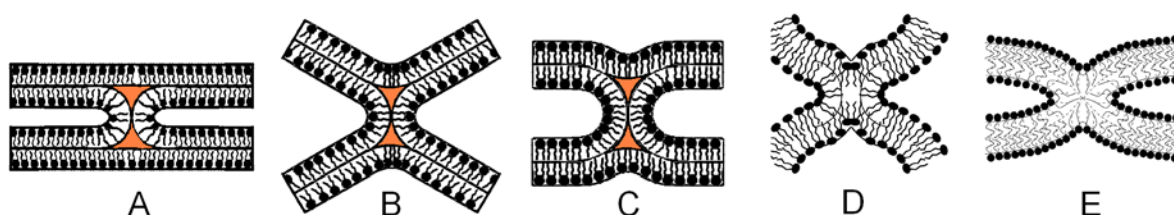


Figure 3 : Différentes conformations du « stalk » proposées dans la littérature. Les vides sont représentés en orange.

A : Stalk non modifié selon Siegel (1993) ;

B-E : Stalks modifiés. B : Stalk modifié en forme de X selon Siegel (1993).

C : Stalk modifié avec les monocouches internes se creusant selon Siegel (1993).

D : Stalk modifié selon Kuzmin et al. (2001).

E : Stalk modifié selon Kozlovky and Kozlov (2002), dans ce modèle une seule chaîne acylée des phospholipides est représentée.

Quelle que soit sa géométrie exacte, la formation du « stalk » nécessite la déformation et la rupture des monocouches externes. Un apport énergétique est donc nécessaire. En ce qui concerne la fusion virale, il est admis que cet apport énergétique est fourni par les protéines de fusion virales (Weissenhorn et al., 1997 ; Chan et al., 1997 ; Eckert et Kim, 2001). La composition lipidique des membranes joue également un rôle sur la formation du « stalk ». En effet, la formation du stalk est favorisée ou défavorisée par la présence respectivement de lipides à courbure naturelle négative ou positive dans les monocouches externes initiales (Figure 4 ; Chernomordik et Kozlov, 2005). Ainsi, la présence de phospholipides ayant une forte courbure négative naturelle, comme la phosphatidyléthanolamine (PE) ou l'acide phosphatidique (PA), dans les monocouches externes de membranes, augmente le rendement de la fusion (Glaser et Gross, 1994 ; Chernomordik et al., 1997 ; Chernomordik et Kozlov, 2003 ; Gaudin, 2000). Par contre, la présence de phospholipides avec une courbure positive, comme la LPC, dans ces monocouches inhibe la fusion (Vogel et al., 1993 ; Chernomordik et al., 1993, 1995).

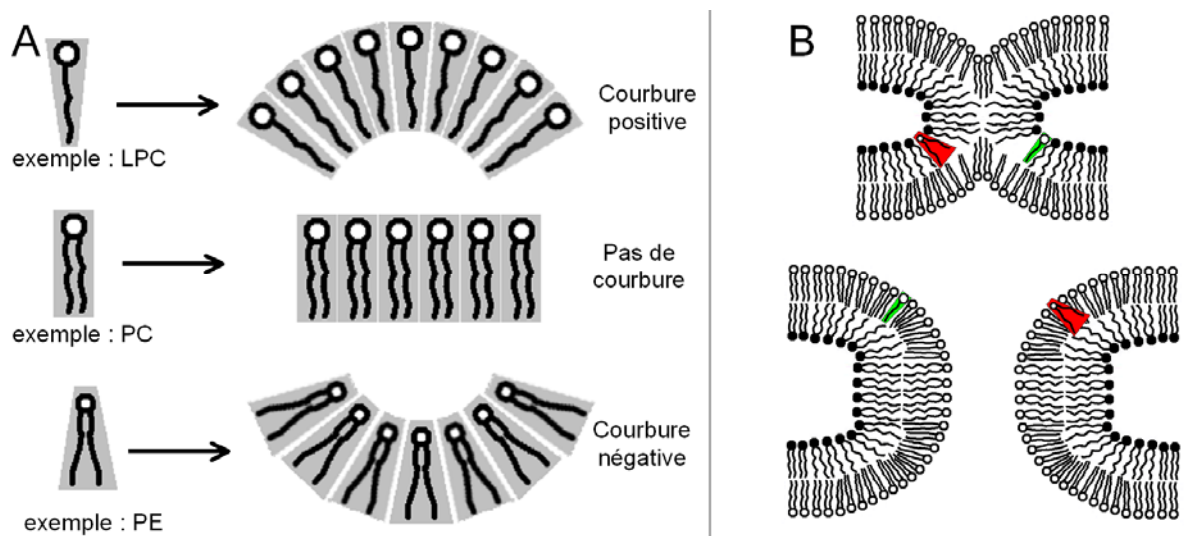


Figure 4 : A : courbure naturelle de lipides avec une forme de cône inverse (haut), avec une forme cylindrique (milieu) ou avec une forme de cône (bas).

B : Haut : La formation du stalk est favorisée par la présence de lipides à courbure naturelle négative (rouge) dans les monocouches externes initiales. Par contre, elle est défavorisée par la présence dans ces monocouches de lipides à courbure naturelle positive (vert). Bas : La formation du pore de fusion est favorisée par la présence de lipides à courbure naturelle positive (vert) dans les monocouches internes initiales. Par contre, elle est défavorisée par la présence dans ces monocouches de lipides à courbure naturelle négative (rouge).

L'analyse de la fusion de membranes modèles induite par le PEG et de la fusion de membranes biologiques induite par la protéine de fusion du virus de l'influenza A indique que la formation de l'intermédiaire « stalk » est réversible (Lee et Lentz, 1998 ; Leikina et Chernomordik, 2000). Seul un petit nombre des « stalks » formés évolue en pore de fusion, un grand nombre fournit à nouveau deux membranes séparées.

1.2.2 Intermédiaire TMC

De nombreuses études suggèrent que le « stalk » s'élargit pour former une nouvelle structure où les deux monocouches internes (ou monocouches trans) entrent en contact (Siegel, 1993, 1999 ; Chernomordik et al., 1995, 1999, 2006 ; Burger, 2000). L'attraction hydrophobe entre les monocouches internes faciliterait cette mise en contact (Chizmadzhev, 2004). Un nouvel intermédiaire, appelé Contact des Monocouches Trans (TMC) est alors formé (Figure 1D).

Tout comme la première structure « stalk » proposée, la première structure TMC proposée contenait des interstices vides énergétiquement défavorables en son centre (Siegel, 1993). Il a été calculé qu'à cause de ces vides, le TMC ne peut se former dans des systèmes réels (Kozlovski et Kozlov, 2002). Une nouvelle structure du TMC où les interstices sont remplis suite à l'inclinaison des chaînes acylées des lipides, a ainsi été proposée (Kozlovski et Kozlov, 2002). Il a également été proposé que cette structure puisse être la première structure formée lors de la fusion, suggérant ainsi que le « stalk » et le TMC ne forment qu'un seul intermédiaire (Figure 3E).

1.2.3 Intermédiaire « diaphragme d'hémifusion »

De nombreuses études expérimentales suggèrent que l'expansion du TMC continue pour former un nouvel intermédiaire appelé diaphragme d'hémifusion (Figure 1E ; Leventis et al., 1986 ; Chernomordik et al., 1987 ; Kemble et al., 1994 ; Melikyan et al., 1995). Dans cet intermédiaire, la zone des monocouches internes en contact est suffisamment large pour former une membrane. Selon les publications, des vides énergétiquement défavorables peuvent exister au sein du diaphragme d'hémifusion (Siegel, 1999 ; Jahn et Sudhof, 1999 ; Jahn et al., 2003 ; Jackson et Chapman, 2006).

Suivant les conditions expérimentales, le diaphragme d'hémifusion est restreint (aucune diffusion possible des lipides des monocouches externes au niveau du diaphragme) ou non restreint (diffusion possible). Le premier cité ne serait que transitoire et peut évoluer en pore de fusion alors que le second correspondrait à une étape finale stable (Chernomordik et al. 1987 ; Chernomordik et Zimmerberg, 1995 ; Chanturiya et al., 2000 ; Garcia et al., 2001). Il a également été suggéré que le diaphragme d'hémifusion restreint peut évoluer en diaphragme d'hémifusion non restreint, bloquant alors la fusion à ce stade (Chernomordik et al., 1998).

Des études suggèrent que les protéines de fusion virales jouent un rôle dans la restriction des lipides du diaphragme d'hémifusion (Chernomordik et al. 1998). En effet, lorsque ces protéines ne sont pas assez nombreuses, un diaphragme d'hémifusion non restreint est obtenu, bloquant le processus de fusion. Par contre, lorsque leur nombre est suffisant, le diaphragme d'hémifusion est restreint et peut évoluer en pore de fusion (Chernomordik et al., 1998).

1.3. Fusion des monocouches internes et formation du pore de fusion initial

De nombreuses mesures expérimentales ont fourni les preuves de la formation d'un pore à la fin du processus de fusion (Figures 1F et 2C ; Chandler et Heuser, 1980 ; Spruce et al., 1989, 1991 ; Burger et al., 1993 ; Monck et Fernandez, 1996 ; Kanaseki et al., 1997 ; Henry et al., 1998 ; Martin et Ruyschaert, 2000).

Pour que le pore de fusion se forme à partir de l'hémifusion, les deux monocouches internes doivent fusionner. Il a été suggéré que le pore pouvait se former à partir du « stalk » (Kuzmin et al., 2001), du TMC (Siegel, 1993) ou du diaphragme d'hémifusion restreint (Chernomordik et al., 1987 ; Kozlov et al., 1989 ; Melikyan et al., 1997 ; Kozlovski et al., 2002). Cette dernière hypothèse est la plus fréquemment exposée dans la littérature. Certains articles proposent que le pore de fusion initial se forme au centre du diaphragme (Melikyan et al., 1997 ; Jahn et Sudhof, 1999 ; Zimmerberg et Chernomordik, 1999 ; Basanez, 2002) alors que d'autres proposent qu'il se forme en périphérie (Kozlovski et al., 2002 ; Chernomordik et Kozlov, 2003) (Figure 5). La tension latérale étant la plus élevée en périphérie, la formation du pore à cet endroit semble la plus probable (Kozlovski et al., 2002).

En plus de la tension latérale, la composition lipidique intervient lors de la formation du pore. En effet, la formation du pore de fusion est favorisée par la présence de lipides à

courbure naturelle positive dans les monocouches internes initiales (Figure 4). Il a d'ailleurs été montré que l'ajout de molécules ayant une courbure naturelle positive au niveau des monocouches internes induit la formation du pore de fusion à partir de cellules hémifusionnées (Melikyan et al., 1997).

Le pore de fusion initial est petit et vacille entre des états d'ouverture et de fermeture (Fernandez et al., 1984; Zimmerberg et al., 1987; Spruce et al., 1991). Suivant les conditions expérimentales, ces pores initiaux se referment complètement ou forment le pore de fusion final.

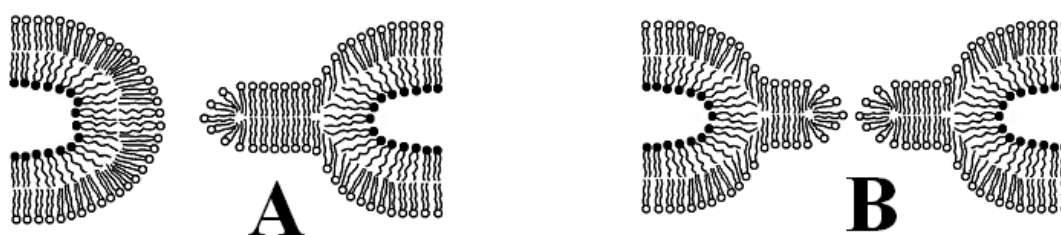


Figure 5 : Formation du pore de fusion initial dans le diaphragme d'hémifusion.

A : Formation en périphérie du diaphragme.

B : Formation au centre du diaphragme.

1.4. Pore de fusion final

Des études de microscopie et de fluorescence ont montré que suite à l'ouverture d'un pore de fusion, une redistribution lipidique s'opère suivie du mélange de solutés intramembranaires (Lowy et al., 1990 ; Tse et al., 1993 ; Zimmerberg et al., 1994). Les lipides du pore de fusion se réarrangent donc pour élargir le pore initial en un pore plus large permettant le passage de grosses molécules (Figure 1G ; Chizmadzhev et al., 1995 ; Razinkov et al., 1998, 1999 ; Chanturiya et al., 2000 ; Chizmadzhev et al., 2004 ; Melikyan et al., 2005). L'expansion du pore est sensible à la tension, l'élasticité et la mobilité des régions membranaires (Chizmadzhev et al., 1995 ; Chanturiya et al., 2000 ; Chizmadzhev, 2004). L'expansion est également dépendante de la courbure des monocouches au niveau du pore initial : l'augmentation de la courbure négative des monocouches externes stabiliserait le pore de fusion initial qui serait alors moins propice à s'élargir. Par contre, l'augmentation de la courbure négative des monocouches internes favoriserait l'expansion du pore de fusion (Razinkov et al., 1998).

2. Les glycoprotéines virales : des protéines spécialisées dans la fusion membranaire

Contrairement aux autres microorganismes, les virus sont des entités incapables de se reproduire sans utiliser la machinerie protéique de la cellule qu'ils infectent. Ils doivent donc pénétrer dans la cellule hôte pour pouvoir se répliquer. Dans le cas des virus enveloppés, deux modes de pénétration ont été identifiés : la fusion au niveau de la surface membranaire et la fusion après endocytose (Figure 6 ; Poranen et al., 2002 ; Marsh et Helenius, 2006).

La fusion après endocytose concerne de nombreux virus tels que le virus de l'influenza A, les autres membres de la famille des Paramyxoviridae, les Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae, Arenaviridae, Togaviridae, Bunyaviridae et Flaviviridae. La fusion sans endocytose concerne les virus HIV-1, BLV, le reste des Retroviridae et les Filoviridae.

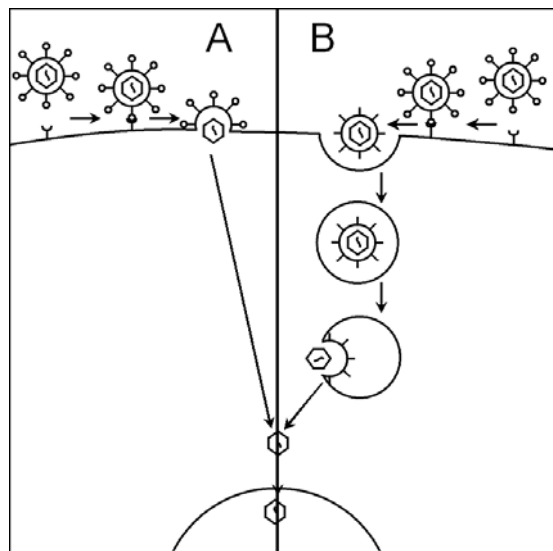


Figure 6 : Schéma montrant les deux modes de pénétration des virus enveloppés dans la cellule.

A : Entrée virale sans endocytose. La fusion se déroule au niveau de la membrane plasmique.

B : Entrée virale par endocytose. Le virus est endocyté puis fusionne avec l'endosome.

Malgré les différences entre ces deux modes de pénétration, les virus ne pénètrent à l'intérieur de la cellule qu'après fusion entre leur enveloppe et une membrane lipidique de la cellule cible, soit la membrane plasmique soit celle de l'endosome. De plus, dans les deux

cas, la fusion membranaire est induite par des glycoprotéines de fusion localisées sur l'enveloppe virale. Lorsque ces protéines sont inhibées par des anticorps (Devadas et al., 2003 ; Zhang et Chen, 2003) ou mutées (Freed et al., 1990 ; Kowalski et al., 1987 ; Fredericksen et Whitt, 1995), la fusion est inhibée. La fusion membranaire est également observée lorsque ces glycoprotéines de fusion sont exprimées à la surface de cellules (Kielian, 1995 ; Marquardt et Kielian, 1996).

A l'heure actuelle, trois classes de glycoprotéines de fusion ont été identifiées (Weissenhorn et al., 2007). Les glycoprotéines de classe 1 sont les mieux caractérisées à l'heure actuelle. Elles sont présentes au niveau de l'enveloppe de nombreux virus, dont le virus de l'influenza A, le BLV et le HIV-1. Les propriétés et le mode d'action des glycoprotéines de classe 1 sont expliqués dans les paragraphes suivants.

2.1. Propriétés communes aux glycoprotéines de fusion virales de classe 1

Les glycoprotéines de fusion virales de classe 1 sont exprimées par les virus des familles virales Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Filoviridae, Coronaviridae, Arenaviridae et Retroviridae (Caffrey et al., 1998 ; Weissenhorn et al., 1998 ; Malashkevich et al., 1999 ; Kobe et al., 1999 ; Bosch et al., 2003 ; Schibli et Weissenhorn, 2004 ; Sainz et al., 2005 ; Eschli et al., 2006). Elles sont encodées par le gène viral *env*. Suite à la pénétration de ce gène au sein de la cellule infectée, un précurseur glycosylé est synthétisé par la cellule. Ce précurseur est ultérieurement clivé par une protéase cellulaire en deux sous-unités : une sous-unité de surface et une sous-unité membranaire. L'unité de surface est impliquée dans la liaison virus-cellule en interagissant directement avec des récepteurs cellulaires spécifiques. L'unité membranaire correspond à la glycoprotéine de fusion et est impliquée dans la fusion virale proprement dite. Le clivage du précurseur en ces deux sous-unités est une étape essentielle pour l'infectivité du virus (Klenk et al., 1975; Lazarowitz et Choppin, 1975). Ce clivage est réalisé en fin du processus de biosynthèse ; puisque clivée, la glycoprotéine de fusion est facilement activée (Colman et Lawrence, 2003).

La glycoprotéine de fusion, liée à la sous-unité de surface, est présente au niveau de la membrane de la cellule infectée, puis incorporée dans l'enveloppe virale suite au bourgeonnement des particules virales. Elle forme des trimères et comprend un large domaine présenté à l'extérieur du virus, appelé ectodomaine, une hélice transmembranaire ancrée à l'enveloppe virale et une queue cytoplasmique. Ces glycoprotéines se projettent perpendiculairement à l'enveloppe virale, formant ainsi des spicules observables par

microscopie électronique (Bottcher et al., 1999 ; Forster et al., 2005 ; Beniac et al., 2006 ; Zhu et al. 2006). La glycoprotéine d'enveloppe du virus de l'influenza A, comprenant la glycoprotéine de fusion et la sous-unité de surface, se projette perpendiculairement à l'enveloppe virale à une hauteur de 135 Å (Wilson et al., 1981 ; Carr et Kim, 1993).

Les glycoprotéines de fusion induisent la fusion virale suite à des changements de conformation. Dans le cas des virus pénétrant dans la cellule par endocytose, ces changements de conformation sont provoqués par l'exposition au milieu acide de l'endosome. Dans le cas des virus pénétrant dans la cellule sans endocytose, la liaison de la sous-unité de surface avec le récepteur de la cellule cible provoque les changements de conformation des glycoprotéines de fusion.

2.2. Structures et changements de conformations des glycoprotéines de classe 1

L'analyse cristallographique de l'ectodomaine ou de parties d'ectodomaine des glycoprotéines de fusion virales de classe 1 indique que l'ectodomaine de ces glycoprotéines de fusion est majoritairement hélicoïdal (Figure 7 ; Skehel et Wiley, 2000 ; Harrison, 2005).

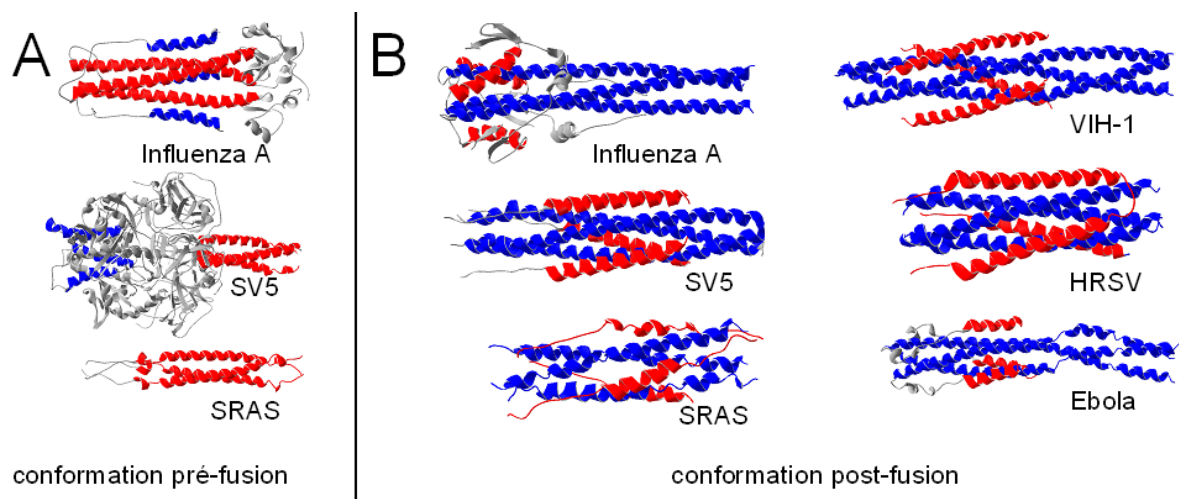


Figure 7 : Conformations de l'ectodomaine des glycoprotéines de fusion de classe 1 de différents virus. Les hélices N-terminales sont représentées en bleu, les hélices C-terminales en rouge.

A : conformation pré-fusion de HA2 du virus de l'influenza A, de la protéine F du SV5 et de la protéine S2 du virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS).

B : conformation post-fusion des mêmes glycoprotéines ainsi que de la gp41 du HIV-1, de la protéine F du virus respiratoire syncytial humain (HRSV) et de la gp2 du virus Ebola.

Pour les glycoprotéines du virus de l'influenza A, du virus du SARS et du virus parainfluenza simien 5 (SV5), deux structures différentes ont été mesurées par diffractions R-X ou RMN (Figures 7A et B ; Wilson et al., 1981 ; Carr et Kim, 1993 ; Bullough et al., 1994 ; Baker et al., 1999 ; Supekar et al., 2004 ; Yin et al., 2006 ; Hakansson-McReynolds et al., 2006). Ces deux structures correspondent à la conformation pré-fusion (avant fusion) et post-fusion (après fusion) des glycoprotéines (Wilson et al., 1981 ; Carr et Kim, 1993 ; Bullough et al., 1994 ; Baker et al., 1999 ; Supekar et al., 2004 ; Yin et al., 2006 ; Hakansson-McReynolds et al., 2006).

Sous conformation pré-fusion, les hélices C-terminales des trois monomères (en rouge dans la Figure 7A) interagissent ensemble pour former un trimère d'hélices. Dans le cas de la glycoprotéine de fusion du virus de l'influenza A (la sous-unité membranaire de l'hémagglutinine appelée HA2), ce trimère d'hélices C-terminales est entouré par les hélices N-terminales (en bleu dans la Figure 7A). Sous conformation post-fusion, l'arrangement des glycoprotéines est différent. En effet, ce sont les hélices N-terminales qui interagissent ensemble et sont entourées par les hélices C-terminales (Figure 7B). Cette différence structurale frappante entre les deux états révèle que les glycoprotéines de classe 1 subissent un changement de conformation lors de la fusion virale (Carr et Kim, 1993 ; Schibli et Weissenhorn, 2004). Pour HA2, il a été déterminé que la structure post-fusion est plus stable d'un point de vue thermodynamique que la structure pré-fusion (Carr et al., 1997). L'énergie libre libérée lors du changement de conformation induirait la fusion membranaire (Carr et al., 1997).

La structure de l'ectodomaine des glycoprotéines de fusion de nombreux autres virus, dont le HIV-1, a également pu être caractérisée (Weissenhorn et al., 1997, 1998 ; Fass et al., 1996 ; Caffrey et al., 1998 ; Kobe et al., 1999 ; Zhao et al., 2000 ; Malashkevich et al., 2001 ; Xu et al., 2004a, 2004b ; Yin et al., 2005 ; Lou et al., 2006 ; Zheng et al., 2006a). Pour ces glycoprotéines, seule la structure correspondant à la conformation post-fusion a pu être mise en évidence (Figure 7B). Comme pour les glycoprotéines des virus influenza A, du SARS et SV5, les hélices N-terminales interagissent ensemble et sont entourées par les hélices C-terminales. Cette grande similarité entre les structures post-fusion suggère que toutes les glycoprotéines de classe 1 adoptent, comme dans le cas des glycoprotéines des virus de l'influenza A, du SARS et SV5, une conformation pré-fusion où les hélices C-terminales interagissent ensemble. Les glycoprotéines subiraient donc un changement de conformation lors de la fusion virale.

Des résultats obtenus sur les glycoprotéines du virus du SARS, du HIV-1, du virus de l'immunodéficience féline (FIV) et SV5 ont fourni de nouvelles informations sur le changement de conformation s'opérant entre les conformations pré- et post-fusion (Figure 8). En effet, lorsque ces glycoprotéines sont en présence de peptides correspondant à leurs hélices C (appelés peptides C), la fusion est bloquée (Wild et al., 1992, 1994 ; Lu et al., 1995 ; Chen et al., 1995 ; Kilby et al., 1998, 2002 ; Furuta et al., 1998 ; Medinas et al., 2002 ; Bosch et al., 2003, 2004 ; Eckert et Kim, 2001 ; Russell et al., 2001 ; Gustchina et al., 2006). Ces peptides agiraient sur la fusion en se liant aux hélices N des glycoprotéines (Wild et al., 1994 ; Chen et al., 1995). Pour gp41, il a été montré que l'effet de ces peptides n'est perceptible que lorsque la glycoprotéine est exposée à une membrane cible, indiquant que ces peptides ne sont capables d'interagir avec les hélices N que lorsque la glycoprotéine adopte une conformation différente de la conformation pré-fusion (Furuta et al., 1998). Des peptides correspondant aux hélices N (peptides N) des glycoprotéines du HIV-1 et du virus du SARS bloquent également la fusion induite par ces glycoprotéines (Jiang et al., 1993 ; Russell et al., 2001 ; Gustchina et al., 2006). Il a été suggéré que ces peptides se lient aux hélices C de ces glycoprotéines (Lu et al., 1995). Toutes ces études d'inhibition suggèrent que lors du changement de conformation intervenant entre les structures pré et post-fusion, les glycoprotéines de classe 1 adoptent une conformation intermédiaire étirée où les hélices N et C sont exposées (la Figure 8 expose le cas de HA2).

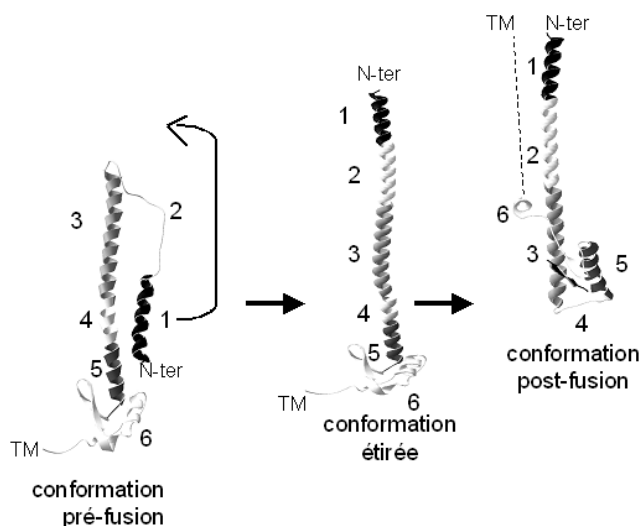


Figure 8 : Conformations pré-fusion, étirée et post-fusion adoptée par l'hémagglutinine HA2 du virus de l'Influenza A. Les conformations pré- et post-fusion proviennent des analyses cristallographiques (Wilson et al., 1981 ; Bullough et al., 1994). La conformation étirée est un modèle probable. L'extrémité N-terminale (N-ter) et le domaine transmembranaire (TM) manquants sont indiqués.

2.3. Mode d'action des glycoprotéines de classe 1

La détermination des structures pré- et post-fusion ainsi que les études d'inhibition ont permis l'élaboration de plusieurs modèles expliquant l'action des glycoprotéines de classe 1 lors de la fusion virale (Stegmann et al., 1989, 2000 ; Bentz, 2000 ; Bentz et Mittal, 2000 ; Colman et Lawrence, 2003 ; Jahn et al., 2003). Le modèle « jacknife » est le plus représenté dans la littérature (Figure 9 ; Hughson, 1997 ; Weissenhorn et al., 1997 ; Skehel et Wiley, 2000 ; Russel et al., 2001 ; Jahn et al., 2003 ; Colman et Lawrence, 2003 ; Jardetzky et Lamb, 2004 ; Korazim et al., 2006).

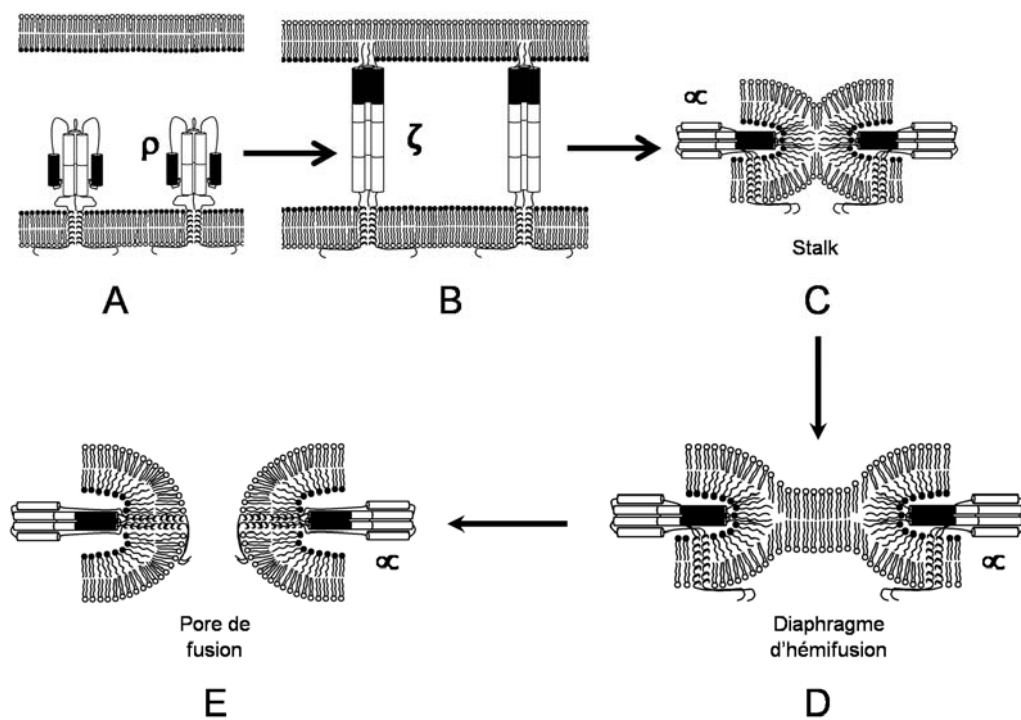


Figure 9 : Modèle « jacknife » expliquant le mode d'action des glycoprotéines de classe 1 lors de la fusion virale. ρ : glycoprotéines sous conformation pré-fusion. ζ : glycoprotéines sous conformation étirée. α ; glycoprotéines sous conformation post-fusion.

Ce modèle propose que le trimère de glycoprotéines de fusion passe tout d'abord de la conformation native pré-fusion à la conformation étirée (Figures 9A et B). Sous conformation étirée, une région N-terminale des glycoprotéines, appelée peptide de fusion, peut alors s'insérer dans la membrane plasmique (Figure 9B). Les glycoprotéines sont alors ancrées aux deux membranes à fusionner. Elles vont ensuite adopter la conformation post-fusion, ce qui entraîne le rapprochement de la membrane plasmique et de l'enveloppe virale, suivi de la

fusion de leurs monocouches externes pour fournir l'intermédiaire « stalk » (Figure 9C). Par la suite, le diaphragme d'hémifusion apparaît, suivi du pore de fusion (Figures 9D et E).

3. Peptide de fusion

Les changements de conformation des glycoprotéines de fusion permettent le rapprochement et la fusion de la membrane plasmique et de l'enveloppe virale (Russel et al., 2001 ; Gruenke et al., 2002). Toutefois, ces changements de conformation ne sont pas à eux seuls responsables de la fusion. En effet, gp41 n'est pas capable d'induire la fusion cellulaire ni la déstabilisation membranaire lorsque son extrémité N-terminale est mutée, alors qu'elle subit toujours des changements de conformation (Dimitrov et al., 2003). La fusion induite par d'autres glycoprotéines de classe 1, dont HA2 (Gething et al., 1986 ; Steinhauer et al., 1995 ; Durell et al., 1997), gp30 du BLV (Vonèche et al., 1992), gp32 du SIV (Bosch et al., 1989 ; Horth et al., 1991) ou gp37 d'ASLV (Balliet et al., 2000) est également inhibée lorsque leur extrémité N-terminale ou une région localisée proche de celle-ci est mutée ou enlevée. De par leur implication dans la fusion, cette région a été nommée « peptide de fusion ».

Selon leur localisation, deux types de peptides de fusion existent : les peptides de fusion N-terminaux et les peptides de fusion internes proches mais non en extrémité N-terminal (Figure 10). La première classe regroupe les peptides de fusion des Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Hepadnaviridae et la plupart des Retroviridae. Les peptides de fusion des familles Filoviridae et Coronaviridae et du rétrovirus ASLV sont quant à eux internes.

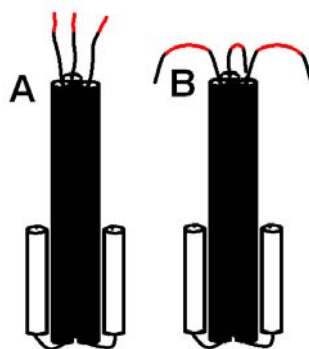


Figure 10 : Représentation en rouge d'un peptide de fusion N-terminal (A) et interne (B) au niveau des glycoprotéines de fusion. Les hélices N-terminales des glycoprotéines sont en noir, les hélices C-terminales sont en blanc.

De nombreuses publications suggèrent que le peptide de fusion intervient directement dans la fusion virale. Comme décrit par le modèle « jacknife », exposé au paragraphe précédent (cf. chapitre 2.3. p.16), les glycoprotéines sous conformation étirée exposeraient leur peptide de fusion vers la membrane plasmique (Carr et Kim, 1993 ; Figure 9). De par ses propriétés hydrophobes, l'exposition du peptide de fusion dans l'espace aqueux intermembranaire pourrait induire une déshydratation de cet espace et favoriser la fusion (Bentz, 1990). Dans le cas de HA2, des mesures de photolabelling ont également montré que le peptide de fusion N-terminal s'insère dans les membranes (Harter et al., 1989 ; Stegmann et al., 1991 ; Tsurudome et al., 1992 ; Durrer et al., 1996). De nombreuses publications suggèrent que l'insertion du peptide de fusion dans la membrane plasmique déstabilise cette dernière (Chan et Kim, 1998 ; Weissenhorn et al., 1997 ; Dimitrov et al., 2003 ; Nieva et Agirre, 2003). Cette déstabilisation serait favorable à la fusion virale. Nieva et Agirre (2003) ont d'ailleurs proposé que la capacité des glycoprotéines virales à induire la fusion dépende exclusivement de la capacité de leur peptide de fusion à désorganiser la membrane après insertion. Des articles suggèrent également qu'alors que certains peptides de fusion s'insèrent dans la membrane plasmique de la cellule cible, d'autres interagissent avec l'enveloppe virale, ce qui favoriserait la fusion virale (Stegmann et al., 1989 ; Gaudin et al., 1995 ; Jahn et al., 2003).

Afin de mieux comprendre l'implication des peptides de fusion dans la fusion virale, des peptides de synthèse correspondant à ces régions ont été utilisés. Les études sur les peptides de fusion N-terminaux et internes de synthèse montrent que ces peptides induisent la fusion de liposomes (Gallaher, 1987 ; Wharton et al., 1988 ; Rafalski et al., 1990, 1991 ; Yeagle et al., 1991 ; Martin et al., 1994, 1996 ; Rodriguez-Crespo et al., 1995, 1999 ; Ruiz-Arguello et al., 1998 ; Suarez et al., 2003 ; Cheng et al., 2004 ; Adam et al., 2004). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle les peptides de fusion jouent un rôle direct dans la fusion virale.

L'analyse de mutations a montré une relation entre la capacité des peptides de fusion de synthèse à déstabiliser les membranes et la capacité des protéines apparentées à favoriser la fusion (Gething et al., 1986 ; Wharton et al., 1988 ; Rafalski et al., 1991, Steinhauer et al., 1995 ; Horth et al., 1991 ; Martin et al., 1994, 1996 ; Rapaport et Shai, 1994 ; Schaal et al., 1995 ; Mobley et al., 1995, 1999). De plus, des conditions favorables à la fusogénicité du peptide de fusion de HA2 augmentent également la fusogénicité de HA2 (Skehel et al., 2001). La bonne corrélation entre les expériences réalisées sur les peptides de fusion de synthèse et celles réalisées sur les glycoprotéines entières indiquent que les peptides de synthèse sont de

bons modèles pour étudier le rôle des peptides de fusion lors de la fusion virale (Nieva et Agirre, 2003 ; Sainz et al., 2005).

3.1. Peptide de fusion et séquence

Les peptides de fusion de virus d'une même famille présentent une séquence conservée (White, 1992). L'identité de séquence peut être supérieure à 90% (Table 1 ; Gallaher, 1987). Par contre, entre des virus appartenant à des familles différentes, l'identité de séquence des peptides de fusion est relativement faible (inférieure à 20%). Malgré cette faible identité, les peptides de fusion présentent des similarités. Ils sont tous majoritairement hydrophobes et contiennent également des résidus de petite taille comme des alanines, glycines, thréonines et sérines (Table 1). De plus, les glycines de nombreux peptides de fusion (HIV-1, SIV, influenza A, influenza B) sont réparties de manière bien définie. Lorsque les peptides de fusion sont repliés en hélice α , une face de leur hélice est alors plus riche en glycines (Delahunty et al., 1996 ; Del Angel et al., 2002). Ces données suggèrent un rôle de cette succession de glycines localisées sur une face hélicoïdale dans les propriétés des peptides de fusion. D'ailleurs, le remplacement des résidus glycines des peptides de fusion N-terminaux de gp41, HA2 ou du peptide de fusion interne du virus Ebola résulte en une diminution de leur fusogénicité (Wharton et al., 1988 ; Delahunty et al., 1996 ; Ruiz-Arguello et al., 1998). Il a été suggéré que cette succession de glycines intervient dans l'oligomérisation des peptides de fusion, dans la balance d'amphipathicité nécessaire pour la fusion des membranes et/ou dans l'orientation des peptides de fusion dans la membrane (Delahunty et al. 1996).

En plus du taux important en petits résidus, des motifs communs sont retrouvés entre certains peptides de fusion. Par exemple, le motif GxxG (où x = leucine ou phénylalanine) est retrouvé chez les peptides de fusion des rétrovirus HIV-1, HIV-2, SIV et chez les peptides de fusion des orthomyxovirus de l'influenza A et de l'influenza B (Durell et al., 1997 ; Allison et al., 2001). Une mutation au sein du motif GFLG du peptide de fusion de gp41 diminue fortement la fusogénicité de ce peptide, indiquant un rôle de ce motif dans les propriétés des peptides de fusion (Pritsker et al., 1999).

Les peptides de fusion internes contiennent généralement un résidu déstabilisant les hélices, comme la proline, près de leur centre (Ruiz-Arguello et al., 1998 ; Balliet et al., 2000). Des mutations au sein des peptides de fusion de ASLV et Ebola indiquent que cette proline est importante dans la fusion (Ito et al., 1999 ; Balliet et al., 2000 ; Delos et al., 2000).

Table 1 : Séquences de peptides de fusion de différentes glycoprotéines de classe I. Adapté de Del Angel et al. (2002). La souche du virus, lorsqu'elle est connue, est notée entre parenthèses. Pour les virus de la famille Hepadnaviridae, l'hôte naturel des virus est notée entre parenthèses. La séquence des peptides de fusion a été limitée à 24 résidus. Les résidus hydrophobes (L, F, I, W, M, Y, V, P, C) sont notés en blanc sur fond noir, les résidus glycines (G) sont notés en blanc sur fond rouge, les petits résidus à l'exception des glycines (A, T, S) sont notés en noir sur fond orange, les résidus hydrophiles (E, N, D, Q, H, R, K) sont notés en noir sur fond blanc.

Virus répertoriés selon leur familles virales	Glycoprotéine de fusion	Séquence des peptides de fusion
Orthomyxoviridae*		
Virus de l'Influenza A (A/Aichi/2/68)	HA2	G L F G A I A G F I E N G W E G M I D G W Y G F
Virus de l'Influenza A (A/Hong Kong/157/1997 H5N1)	HA2	G L F G A I A G F I E G G W Q G M I D G W Y G Y
Virus de l'Influenza A (Japan/305/57)	HA2	G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y G Y
Virus de l'Influenza B (B/Beijing/1/87)	HA2	G F F G A I A G F I E G G W E G M I A G W H G Y
Virus de l'Influenza C (C/California/78)	HA2	I F G I D D L I I G L L F V A I V E A G I G Y
Paramyxoviridae*		
Canine Distemper Virus (Onderstepoort)	F1	F A G V V L A G V A L G V A T A A Q I T A G I A
Measles Virus (AIK-C)	F1	F A G V V L A G A A L G V A T A A Q I T A G I A
Mumps virus (SBL)	F1	F A G V V L A G A A L G V A T A A Q I T A G I A
Rinderspest virus (L)	F1	F A G V V L A G A A L G V A T A A Q I T A G I A
Bovine Respiratory Syncytial Virus (A51908)	F1	F L G F L L G I G S A I A S G V A V S K V L H L
Newcastle Disease Virus (Australia-Victoria/32)	F1	F I G A I I G S V A L G V A T A A Q I T A A S A
Human Parainfluenza 1 Virus (C39)	F1	F A G I A I G I A A L G V A T A A Q I T A G I A
Human Parainfluenza 3 Virus (NIH 47885)	F1	F A G I A I G I A A L G V A T A A Q I T A G I A
Bovine Parainfluenza 3 Virus	F1	F F G E I I G T I A I G I A T S A Q I T A A V A
Human Respiratory Syncytial Virus (B/18537)	F1	F L G F L L G V G S A I A S G I A V S K V L H L
Pneumonia Virus of Mice (15)	F1	F L G L I L G L G A A V T A G V A L A K T V Q
Simian Virus 41	F1	F A G V V I G L A A L G V A T A A Q V T A A V A
Simian Virus 5 (W3)	F1	F A G V V I G L A A L G V A T A A Q V T A A V A
Turkey Rhinotracheitis Virus	F1	F V L G A I A L G V A T A A V T A G V A L A K
Sendai Virus (Fushimi)	F1	F F G A V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
Hendra Virus	F1	L A G V V M A G I A I G I A T A A Q I T A G V A
Nipah Virus	F1	L A G V I M A G V A I G I A T A A Q I T A G V A
Filoviridae**		
Ebola (Zaire/Eckron-76)	GP2	G A A I G L A W I P Y F G P A A E G I Y T E G L
Marburg (Popp-67)	GP2	D L A A G L S W I P F F G P G I E G L Y T A V L
Coronaviridae**		
Virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère	S2	M Y K T P T L K Y F G G F N F S Q I L P D P F L
Human Coronavirus (strain NL63)	S2	A F S L A N V T S F G D Y N L S S V L P Q R N I
Retroviridae*		
Murine Leukemia Retrovirus (isolate 57)	p15E	E P V S L T L A L L L G G L T M G G I A A G V G
Feline Leukemia Virus (Strain A/Glasgow-1)	p15E	E P I S L T V A L L L G G L T V G G I A A G V G
Gibbon Ape Leukemia Virus	p15E	E A V S L T L A V L L G L G I T A G I A T G S T
Mink Cell Focus-Forming Murine Leukemia Virus	p15E	E P V S L T L A L L L G G L T M G G I A A G V G
Sheep Pulmonary Adenomatosis Virus	gp36	G L S L I I L G I V S L I T L I A T A V T A C V
Squirrel Monkey Retrovirus (SMRV-H)	gp20	A V T L I P L V G L G V S T A V A T G T A G L
Simian Mason-Pfizer Virus	gp20	A I Q L I P L F V G L G I T T A V S T G A A G L
Simian Retrovirus SRV-1	gp20	A I Q F I P L V I G L G I T T A V S T G T A G L
Avian reticuloendotheliosis virus	gp22	A V Q F I P L V G L G I T G A T L A G G T G L
Mouse Mammary Tumor Virus (BR6)	gp36	F V A A I I L G I S A L I A I I T S F A V A T T
Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (ATK)	gp21	A V P V A V W L V S A L A M G A G V A G G I T G
Human T-Cell Leukemia Virus Type 2	gp21	A V P I A V W L V S A L A A G T G I A G G V T G
Bovine Leukemia Virus (Belgium LB285)	gp30	S P A A A L T L G L A L S V G L T G I N V A V S
Virus de l'Immunodéficience Humaine de Type 1 (HXB2)	gp41	A V G I G A L F L G F L G A A G S T M G A V S L
Virus de l'Immunodéficience Humaine de Type 2 (BEN A)	gp41	G V F V L G F L G F L A T A G S A M G A R S L T
Virus de l'Immunodéficience Simienne (AGM-155)	gp32	V P F V L G F L G F L G A A G T A M G A A T A
Bovine Immunodeficiency Virus (127)	gp40	A V G L A I F L V L A I M A I T S S L V A A T
Equine Infectious Anemia Virus (P3.2-1)	gp45	F G I S A I V A A I V A A T A I A R S A T M S Y
Feline Immunodeficiency Virus (Petaluma)	gp36	A A I H V M L A L A T V L S I A G A G T G A T A
Caprine Arthritis Encephalitis Virus (Cork)	gp38	G V G L V I M L V I M A I V A A A G A S L G V A
Visna Lentivirus (1514)	gp46	G I G L V I V L A I M A I I A A A G A G L G V A
Hepadnaviridae*		
Virus de l'Hépatite B (Hôte : humain)	S	M E N I T S G E L G P L L V L Q A G F F L L T R
Virus de l'Hépatite B (Hôte : canard)	S	M S G T F G G I L A G L I G L L V S F F L L I K
Virus de l'Hépatite B (Hôte : marmotte)	S	M S P S S L L G L L A G L Q V V Y F L W T K I L

*Peptides de fusion N-terminaux. **Peptides de fusion internes.

3.2. Effet des peptides de fusion sur la membrane

L'utilisation de marqueurs fluorescents lipidiques et solubles a permis de montrer que les peptides de fusion synthétiques des virus de la rougeole, de l'influenza A, de l'hépatite B et des virus HIV-1, Ebola et SIV induisent la fusion et la perméabilité de liposomes (Gething et al., 1986 ; Wharton et al., 1988 ; Rafalski et al., 1990, 1991 ; Martin et al., 1993, 1994, 1996 ; Rodriguez-Crespo et al., 1995, 1996, 1999 ; Ruiz-Arguello et al., 1998 ; Haque et al., 2001 ; Adam et al., 2004). Les peptides de fusion des virus de l'influenza A, de l'hépatite B et du HIV-1 induisent également l'hémolyse de cellules (Wharton et al., 1988 ; Rodriguez-Crespo et al., 1995 ; Mobley et al., 1992, 1995, 1999 ; Han et al., 1999).

La première étape de la fusion est la mise en contact de deux membranes (cf. chapitre 1.1. p.4). Les peptides de fusion des virus Sendai, de l'hépatite B et de l'influenza A induisent l'agrégation de liposomes, étape indispensable à la fusion (Rodriguez-Crespo et al., 1999 ; Haque et al., 2001 ; Ghosh et Shai, 1999). Des protrusions, endroits où se déroule la mise en contact, ont été observées par microscopie électronique au niveau de liposomes traités avec le peptide de fusion du HIV-1 (Agirre et al., 2000). Toutefois, des mutants du peptide de fusion du virus Sendai sont capables d'induire l'agrégation de liposomes sans induire leur fusion, suggérant que la capacité des peptides de fusion à induire l'agrégation de liposomes n'est pas suffisante pour induire la fusion. (Ghosh et Shai, 1999).

De nombreuses mesures expérimentales (fluorescence du tryptophane, spectroscopie infrarouge, sensibilité à une acidification,...) montrent que les peptides de fusion des virus de l'influenza A, d'Ebola, de l'hépatite B, HIV-1, SIV et ASLV pénètrent dans les membranes (Duzgunes et Gambale, 1988 ; Rafalski et al., 1990, 1991 ; Clague et al., 1991 ; Gordon et al., 1992 ; Martin et al., 1994, 1996 ; Rodriguez-Crespo et al., 1995, 1999 ; Pereira et al., 1997 ; Chang et al., 1997 ; Ruiz-Arguello et al., 1998 ; Mobley et al., 1999 ; Curtain et al., 1999 ; Schwarz et Taylor, 1999 ; Agirre et al., 2000 ; Cheng et al., 2004). Leur tendance à s'insérer dans la membrane est due à leur hydrophobicité élevée (Nir et Nieva, 2000). Par contre, des mutants des peptides de fusion du virus de l'influenza A, du HIV-1 et du ASLV avec une faible activité fusogène s'insèrent beaucoup moins dans les membranes que les peptides sauvages (Rafalski et al., 1991 ; Pereira et al., 1997 ; Mobley et al., 1999 ; Kamath et Wong, 2002 ; Maddox et Longo, 2002 ; Cheng et al., 2004). La relation entre la capacité du peptide à s'insérer dans la membrane et sa fusogénicité a également été renforcée par des études montrant que les peptides de fusion du virus Ebola et du HIV-1 induisent la fusion de membranes dans lesquelles ils s'insèrent alors qu'ils sont incapables d'induire la fusion de

membranes dans lesquelles ils ne s'insèrent pas. (Rafalski et al., 1990 ; Ruiz-Arguello et al., 1998). De nombreuses études indiquent que les peptides de fusion n'adoptent pas une orientation transmembranaire dans les membranes (Brunner, 1989 ; Ishiguro et al., 1993, 1996 ; Martin et al., 1993, 1994, 1996, Luneberg et al., 1995, Kliger et al., 1997 ; Chang et al., 1997, 2000 ; Agirre et al., 2000 ; Durell et al., 1997 ; Cheng et al., 2004). Ils ne s'inséreraient que dans la monocouche externe des membranes (Luneberg et al., 1995 ; Agirre et al., 2000). De nombreuses études suggèrent que cette insertion induirait de nombreux changements au niveau membranaire qui favoriserait la fusion :

- Le peptide de fusion de l'influenza A augmente le paramètre d'ordre des lipides membranaires (Gray et al., 1996). Selon les auteurs, ce résultat peut être relié au déplacement ou au réarrangement des molécules d'eau à l'interface de la membrane suite à la liaison du peptide avec les membranes (Gray et al., 1996). Ainsi, de par leur forte hydrophobicité, les peptides de fusion induiraient une déshydratation à la surface membranaire, favorable à la fusion.

- Les peptides de fusion du virus de l'influenza A, du SIV, du HIV-1 et du virus de la Leucémie Féline (FLV) favorisent la courbure négative des bicouches lipidiques (Eband et Eband, 1994 ; Eband et al., 1994 ; Colotto et al., 1996 ; Eband, 1998 ; Davies et al., 1998 ; Pereira et al., 1999 ; Siegel et Eband, 2000). Une augmentation de la courbure négative des monocouches externes membranaires induit une augmentation de la formation d'intermédiaires de fusion (cf. chapitre 1.2.1. p.5). L'insertion des peptides de fusion dans la monocouche externe des membranes induirait donc une augmentation de la courbure négative de celle-ci, ce qui favoriserait la fusion. Cette proposition est renforcée par une étude récente qui montre une corrélation entre la capacité du peptide de fusion de HA2 à induire une courbure négative et sa capacité à induire la fusion (Eband et al., 2001). Il a été suggéré que la courbure induite par les peptides de fusion serait due à la capacité de ces peptides à former une structure en forme de cône inversé dans les membranes avec une section plus large dans la région hydrophobe que dans la région des têtes polaires lipidiques (Tatulian et Tamm, 1996). Il est toutefois à noter que la capacité à induire une courbure membranaire négative n'est pas retrouvée pour tous les peptides de fusion. En effet, des mesures de la température de transition de bicouches de DiPoPE suggèrent que le peptide de fusion du virus Foamy n'induit pas de courbure négative au sein de la membrane et induirait donc la fusion via un autre mécanisme (Eband et Eband, 2001).

- Durant la fusion, les membranes doivent se rompre puis se reformer afin de générer le pore de fusion. Longo et al. (1997) ont montré que le peptide de fusion de HA2 induit la

rupture des membranes. Par contre, un mutant non fusogène n'induit pas de rupture. Les peptides de fusion induiraient d'abord la rupture des monocouches externes, favorisant alors l'hémifusion (Eband, 2000). Ils diminueraient ensuite la tension de rupture au sein des structures d'hémifusion en amincissant les monocouches internes (Agirre et al., 2000). L'effet des peptides de fusion sur la rupture membranaire est conforté par le fait que les peptides de fusion de HA2, de gp41 et gp32 favorisent la formation de phases non lamellaires cubiques ou hexagonales au niveau de bicouches (Eband et al., 1994 ; Colotto et Eband, 1997 ; Pereira et al., 1999 ; Eband, 2000 ; El Kirat et al., 2006). Pour se former, ces structures nécessitent une rupture membranaire.

- Il a également été montré que les peptides de fusion de gp41 et de HA2 forment des pores au sein de la membrane (Slepushkin et al., 1992 ; Schoch et Blumenthal, 1993). Cette propriété serait due à la capacité des peptides de fusion à s'auto-associer dans la membrane (Nieva et al., 1994 ; Pereira et al., 1997 ; Schwarz et Taylor, 1999 ; Pritsker et al., 1999 ; Nir et Nieva, 2000 ; Yang et al., 2001 ; Sackett et Shai, 2005). Ainsi, le mutant non fusogène V2E du peptide de fusion de gp41 est incapable de former de gros complexes, au contraire du peptide sauvage (Kliger et al., 1997). La formation de pores pourrait induire la fusion des monocouches externes, comme suggéré par Monck et Fernandez (1996).

- Enfin des études récentes suggèrent un autre rôle des peptides de fusion : ils combleraient les vides existant au sein des structures d'hémifusion et diminueraient ainsi l'énergie de formation de ces structures (cf. chapitre 1.2. p.4 ; Haque et al., 2004, 2005). La formation de ces structures intermédiaires ainsi que la conversion de ces intermédiaires en pores de fusion seraient alors favorisées.

Les différents résultats et propositions expliqués ci-dessus indiquent que l'insertion des peptides de fusion induit différents changements membranaires qui ont pour effet de diminuer l'énergie nécessaire à la formation de l'intermédiaire de fusion « stalk », et/ou du pore de fusion (Siegel et Eband, 1997 ; Siegel, 1999). Toutefois, des mutants des peptides de fusion de HA2 et gp41 capables de s'insérer dans la membrane mais incapables de la déstabiliser indiquent que d'autres paramètres que l'insertion interviennent dans le processus (Wharton et al., 1988 ; Rafalski et al., 1991 ; Gray et al., 1996 ; Kliger et al., 1997). De nombreuses études indiquent que la structure des peptides de fusion constitue un de ces paramètres.

3.3. Peptide de fusion et structure

Les peptides de fusion N-terminaux et internes sont sujets à des changements de conformation selon leur environnement (Davies et al., 1998 ; Chang et al., 2000 ; Pécheur et al., 2000 ; Suarez et al., 2003 ; Cheng et al., 2004). Par exemple, le peptide de fusion du HIV-1 adopte une structure non ordonnée dans le DMSO (Buzon et al., 2005), une structure β dans un milieu aqueux (Slepushkin et al., 1992 ; Gordon et al., 2002) alors qu'en présence de lipides, il adopte un mélange α/β dont la proportion dépend de la composition lipidique, de l'environnement, de la pression latérale membranaire et du degré d'hydratation (Nieva et al., 1994 ; Schwarz et Taylor, 1999 ; Castano et Desbat, 2005 ; Buzon et al., 2005).

Comme déjà indiqué ci-dessus (cf. chapitre 3.1. p.19), les peptides de fusion sont riches en glycines (Table 1 ; Del Angel et al., 2002). Par exemple, celui de la gp41 contient 20 % de glycines alors que celui de HA2 en contient 29 % (Tamm et al., 2002). Cette forte proportion en glycines permet d'expliquer la flexibilité structurale des peptides de fusion. De nombreuses études suggèrent que la plasticité structurale des peptides de fusion est cruciale pour le processus de fusion (Durell et al., 1997 ; Davies et al., 1998 ; Longo et al., 1998 ; Rodriguez-Crespo et al., 1999 ; Tamm et Han, 2000 ; Cheng et al., 2004 ; Wong, 2003). Il a ainsi été prédit que le peptide de fusion du HIV-1 et des mutants actifs présentent une flexibilité structurale alors que des mutants inactifs ne présentent aucune flexibilité (Wong, 2003). Les glycines présentes au sein de ce peptide de fusion fourniraient la flexibilité structurale nécessaire à l'activité fusogène de celui-ci (Wong, 2003). L'implication des glycines dans la flexibilité des peptides de fusion a également été suggérée pour les peptides de fusion d'autres virus (Tamm et Han, 2000). Le remplacement des glycines des peptides de fusion des virus de l'influenza A et du virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV) par des résidus plus volumineux diminuent l'activité fusogène de ces peptides (Rafalski et al., 1991 ; Duzgunes et Gambale, 1988 ; Zhu et al., 1998 ; Han et al. 1999).

Une des principales questions est de connaître la structure qu'adoptent les peptides de fusion lors de la fusion membranaire. Si les études réalisées à l'heure actuelle n'ont pas permis d'y répondre entièrement, elles ont tout de même permis de fournir les structures des peptides de fusion dans les membranes.

De manière générale, la proportion en hélice α des peptides de fusion N-terminaux augmente en présence de lipides (Martin et al., 1994, 1996, 1999 ; Rodriguez-Crespo et al., 1999). Une relation entre le taux d'hélicité du peptide de fusion de HA2 dans la membrane et sa fusogénicité a été montrée : sous forme majoritairement hélicoïdale, il induit la fusion alors

que sous conformation β , il en est incapable (Takahashi, 1990). De plus, des peptides mutants non fusogènes se replient majoritairement sous conformation β , au contraire du peptide de fusion sauvage (Gray et al., 1996). L'utilisation de techniques comme la résonance paramagnétique électronique (EPR), le dichroïsme circulaire (CD) ou la spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier – réflexion totale atténuée (ATR-FTIR) ont confirmé que le peptide de fusion de HA2 adopte une structure majoritairement hélicoïdale dans les membranes (Luneberg et al., 1995 ; Macosko et al. 1997 ; Han et al., 1999 ; Tamm et al., 2002). L'utilisation de ces techniques a également montré que les peptides de fusion de gp32 du SIV et de la protéine F1 du virus de la maladie canine (CDV) sont majoritairement hélicoïdaux dans les membranes (Martin et al., 1994 ; Aranda et al., 2003).

Alors que pour ces peptides de fusion N-terminaux, les études expérimentales indiquent une structure hélicoïdale membranaire, pour les peptides de fusion N-terminaux de la gp41 de HIV-1 et de la S2 du virus de l'hépatite B, les résultats divergent. Les études sur le peptide de fusion du virus de l'hépatite B montrent qu'en fonction de la souche virale, le peptide adopte une structure hélicoïdale ou β dans les membranes (Rodriguez-Crespo et al., 1996, 1999). Celles réalisées sur le peptide de fusion de gp41 montrent qu'en fonction de sa longueur, de son environnement, du rapport peptide/lipide, de la composition membranaire ou encore de la technique d'analyse utilisée, le peptide adopte une structure majoritairement hélicoïdale (Rafalski et al., 1990 ; Gordon et al., 1992, 2002, 2004 ; Martin et al., 1993, 1996 ; Nieva et al., 1994 ; Zheng et al., 2006b ; Li et Tamm, 2007), majoritairement β (Rafalski et al., 1990 ; Pereira et al., 1997 ; Yang et al., 2001 ; Sackett et Shai, 2003, 2005 ; Zheng et al., 2006b ; Qiang et al., 2007 ; Li et Tamm, 2007) ou un mélange de ces deux structures (Martin et al., 1993 ; Castano et Desbat, 2005 ; Saez-Cirion et Nieva, 2002 ; Buzon et al., 2005) dans les membranes. Des études suggèrent que la fusion est induite par le peptide de fusion de gp41 lorsqu'il adopte une structure β (Sackett et Shai, 2003, 2005 ; Buzon et al., 2005). Toutefois, il a été montré que le peptide de fusion de gp41 adopte une conformation β en présence de membranes dont il n'induit pas la fusion alors que la structure α est observée en présence de membranes dont il induit la fusion, suggérant que la structure β ne permettrait que l'agrégation des membranes alors que la structure α interviendrait dans la déstabilisation et la fusion membranaire (Rafalski et al., 1990). D'autres études suggèrent également que le peptide de fusion de gp41 induit la fusion lorsqu'il adopte une structure hélicoïdale (Martin et al., 1996 ; Gordon et al., 1992, 2002, 2004 ; Li et Tamm, 2007). Ces différences de résultats

suggèrent finalement que ces deux structures sont essentielles au bon déroulement de la fusion membranaire et renforce l'implication de la flexibilité structurale sur la fusion.

Les peptides de fusion internes sont moins étudiés que les peptides de fusion N-terminaux. En effet, seulement deux peptides de fusion internes de glycoprotéines de classe 1 ont été étudiés : ceux du virus Ebola et du ASLV.

Les études CD et IR réalisées sur le peptide de fusion interne du ASLV indiquent qu'en association avec des membranes modèles, la proportion en structure hélicoïdale de ce peptide augmente (Cheng et al., 2004). Les études RMN montrent que la région proche de la proline centrale passe d'une structure turn à une structure hélicoïdale lorsque des micelles de SDS, connues pour mimer les membranes, sont ajoutées. Ce peptide a donc des propriétés similaires à celles des peptides de fusion N-terminaux : il présente une flexibilité structurale et adopte une structure majoritairement hélicoïdale dans les membranes.

Suivant les études et les conditions expérimentales, le peptide interne du virus Ebola adopte une structure β étirée (Suarez et al., 2003), hélicoïdale (Suarez et al., 2003 ; Freitas et al., 1997) ou en boucle dans les membranes (Gomara et al., 2004). L'étude réalisée par Suarez et al. (2003) suggère que ce peptide induit la perméabilisation de liposomes mais pas de fusion lorsqu'il adopte une structure hélicoïdale alors qu'il induit la fusion sous structure β . Les études de Gomara et al. (2004) montre, quant à elles, une relation entre la fusogénicité de ce peptide et sa capacité à adopter une structure en boucle. Deux autres études suggèrent que le peptide de fusion d'Ebola adopte une structure sous forme hélicoïdale dans la membrane. La première étude, entreprise par Adam et al. (2004), suggère que la capacité du peptide à induire la fusion est reliée à sa capacité à adopter une orientation oblique dans la membrane sous forme hélicoïdale. La deuxième étude, réalisée par Freitas et ses collègues en 2007, montre par mesure RMN que la conformation du peptide de fusion d'Ebola change de la structure étendue vers la structure hélicoïdale lorsqu'il interagit avec des micelles de SDS. Dans cet environnement qui mime les propriétés des membranes, la partie centrale de ce peptide adopte alors une hélice 3-10. Ces résultats contradictoires indiquent que le peptide de fusion interne du virus Ebola présente une flexibilité structurale, comme dans le cas des autres peptides de fusion (Suarez et al., 2003 ; Gomara et al., 2004).

Toutes ces données, obtenues sur les peptides de fusion internes et N-terminaux, indiquent que les peptides de fusion sont des peptides présentant une flexibilité structurale. Elles indiquent également un rôle de la structure hélicoïdale dans leur capacité à induire la fusion membranaire.

4. Domaine transmembranaire

En plus du peptide de fusion, d'autres régions des glycoprotéines virales interviennent lors de la fusion en interagissant avec les membranes (Schroth-Diez et al., 2000 ; Shai, 2000 ; Mobley et al., 2001, 2007 ; Peisajovich et Shai, 2003 ; Moreno et al., 2004, 2006). Le domaine transmembranaire fait partie de ces régions. Les différentes stratégies mises en place pour montrer l'implication du domaine transmembranaire lors de la fusion sont expliquées dans ce chapitre. Ce chapitre regroupe également les différentes hypothèses proposées dans la littérature pour expliquer le mode d'action de ce domaine.

4.1. Substitution du domaine transmembranaire par une ancre lipidique

Les premières analyses de l'effet du domaine transmembranaire sur la fusion furent des expériences de substitution de toute l'ancre transmembranaire par une ancre lipidique, l'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Lorsque les segments transmembranaires de HA2 du virus de l'Influenza (Kemble et al., 1994), de gp41 du HIV-1 (Salzwedel et al., 1993 ; Weiss et White, 1993), de la protéines G du VSV (Odell et al., 1997) ou de gp 70 du MoMuLV (Raghd et Anderson, 1994) sont remplacés par une ancre GPI, les glycoprotéines correspondantes perdent leur capacité à induire la fusion. Dans le cas des chimères HA2-GPI, il a été montré que la fusion reste bloquée au stade hémifusion ou au stade de pores non élargis (Kemble et al., 1994 ; Melikyan et al., 1995 ; Razinkov et al., 1999 ; Markosyan et al., 2000).

Ces études de substitution ont permis de conclure que le domaine transmembranaire et/ou le domaine cytoplasmique (qui manque également au niveau de ces chimères de glycoprotéines) intervien(nen)t dans les étapes de la fusion. Dans le cas de HA2, il a été montré que la perte du domaine cytoplasmique n'affecte pas la fusion (Jin et al., 1994 ; Melikyan et al., 1997). Ce résultat suggère que l'inhibition de fusogénicité de HA2 est induite par la perte du domaine transmembranaire (Cohen et Melikyan, 2004).

4.2. Substitution du domaine transmembranaire par un autre domaine protéique

Des substitutions du domaine transmembranaire des glycoprotéines de fusion par l'ancrage transmembranaire d'autres protéines membranaires ont également été réalisées. Dans ce cas, le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine de fusion est conservé. Les résultats diffèrent selon les études. En effet, certaines études montrent qu'il suffit que les glycoprotéines virales soit ancrées via un quelconque domaine protéique pour qu'elles induisent la fusion. Ainsi, la fusion est toujours complète lorsque le domaine transmembranaire de HA2, de gp46 du virus T lymphotrope humain (HTLV) et de la protéine F du virus de Sendai est remplacé par le domaine transmembranaire d'une autre protéine virale également impliquée dans la fusion (Denesvre et al., 1995 ; Schroth-Diez et al., 1998 ; Melikyan et al., 1999 ; Kozerski et al., 2000). La fusogénicité de HA2 et de gp41 du HIV-1 est également conservée lorsque leur domaine transmembranaire est remplacé par celui d'une protéine non impliquée dans la fusion (Wilk et al., 1996 ; Melikyan et al., 1999 ; Kozerski et al., 2000). Par contre, d'autres études montrent que le domaine transmembranaire des glycoprotéines virales doit être spécifique pour que la fusion soit conservée. En effet, lorsque le domaine transmembranaire de gp41 est remplacé par celui de la protéine G du virus VSV, une autre glycoprotéine de fusion, ou par celui de la protéine GpA, une protéine non fusogène, la fusogénicité de la glycoprotéine diminue fortement (Miyachi et al., 2005). Ces résultats contradictoires indiquent donc que pour induire la fusion, certaines glycoprotéines de fusion virales doivent être ancrées via un domaine transmembranaire spécifique alors que d'autres ont seulement besoin d'être ancrées via un domaine transmembranaire protéique quelconque (Schroth-Diez et al., 2000).

4.3. Diminution de la longueur du domaine transmembranaire

Des études de délétion montrent que le domaine transmembranaire de HA2, de gp41, de gp48 du virus Foamy, de p15E du MoMuLV et de la protéine S du virus de l'hépatite murine (MHV) doit être suffisamment long pour que la fusion soit complète (Owens et al., 1994 ; Bos et al., 1995 ; Pietschmann et al., 2000 ; Melikyan et al., 2000 ; Armstrong et al., 2000). Dans le cas de HA2, il a été montré que lorsque le domaine transmembranaire de 27 résidus est raccourci à 15 résidus, la fusion est bloquée au stade d'hémifusion (Armstrong et al., 2000). Par contre, lorsque le domaine contient au moins 17 résidus, la fusion est complète.

Cette étude indique que HA2 a besoin d'un domaine suffisamment long pour induire la transition de l'hémifusion à la fusion.

4.4. Mutations au niveau du domaine transmembranaire

La substitution ou la délétion d'un seul résidu du domaine transmembranaire de gp41, de HA2, de gp48 du virus Foamy, de p15E du MoMuLV, de la protéine S du MHV ou de la protéine F du virus Measles annule l'activité fusogène des glycoprotéines (Helseth et al., 1990 ; Owens et al., 1994 ; Bos et al., 1995 ; Caballero et al., 1998 ; Taylor et Sanders, 1999 ; Melikyan et al., 1999, 2000 ; Pietschmann et al., 2000). Certaines mutations ne suppriment pas la fusogénicité des glycoprotéines mais peuvent la diminuer de manière drastique (Taylor et Sanders, 1999). D'après ces résultats, il apparaît que la présence et la localisation des résidus chargés, des glycines et des prolines au sein des domaines transmembranaires soient importantes pour le potentiel fusogène de ces glycoprotéines. Toutefois, d'autres études montrent que le remplacement de ces résidus n'a pas d'effet significatif sur la fusion induite par gp41 et HA2 (Wilk et al., 1996 ; Armstrong et al., 2000 ; Miyauchi et al., 2005). Ces résultats confirment les études de substitution des domaines transmembranaires (cf. chapitre 4.2. p.28) : la spécificité de séquence du domaine transmembranaire ne semble être requise que pour certains virus, voir certaines souches virales (Schroth-Diez et al., 2000).

4.5. Fusogénicité de peptides correspondant au domaine transmembranaire de glycoprotéines virales

Le peptide correspondant au domaine transmembranaire de la protéine G du virus VSV induit la fusion et la perméabilisation de liposomes (Langosch et al., 2001a ; Dennison et al., 2002). Des mutations qui diminuent la fusogénicité de la glycoprotéine entière induisent également une diminution de la fusogénicité du peptide (Langosch et al., 2001a). Ces résultats suggèrent que le domaine transmembranaire de cette glycoprotéine de fusion a des capacités fusogènes intrinsèques.

Des études sur le peptide correspondant au domaine transmembranaire de HA2 du virus de l'influenza A indiquent que ce peptide induit une déshydratation de la surface de la membrane dans laquelle il est ancré (Tatulian et Tamm, 2000). Les mesures d'échange d'hydrogène des amides de ce peptide indiquent également qu'une grande partie de son hélice est accessible à l'eau, suggérant que ce peptide est capable de former des pores dans la

membrane (Tatullian et Tamm, 2000). D'autres études montrent que des peptides de 15 à 18 résidus correspondant à une partie du domaine transmembranaire de gp41 et de la protéine S2 du virus du SARS induisent la perméabilisation de liposomes (Guillen et al., 2005 ; Moreno et al., 2006). La fusion de liposomes a également été mesurée en présence des peptides correspondant à une partie du domaine transmembranaire de gp41 (Moreno et al., 2006).

4.6. Hypothèses sur le mode d'action du domaine transmembranaire lors de la fusion

Les études de substitutions, de délétions et de mutations du domaine transmembranaire des glycoprotéines virales ainsi que les études sur les peptides synthétiques indiquent que le domaine transmembranaire des glycoprotéines virales intervient lors de la fusion. De nombreuses études suggèrent que le domaine transmembranaire intervient d'abord dans la fusion de manière indirecte :

- Le domaine transmembranaire interviendrait dans la conformation de la glycoprotéine de fusion. En effet, il a été montré que lorsque la glycoprotéine de fusion du virus rabique n'est pas ancrée à la membrane, elle adopte une conformation inactive (Gaudin et al., 1999). Par contre, son ancrage via son domaine transmembranaire est suffisant pour avoir une glycoprotéine active et repliée sous sa forme native.
- Le domaine transmembranaire interviendrait également dans la fusion en permettant au trimère de se former. En effet, des études de mutations sur la glycoprotéine du virus du SARS montrent que la trimérisation de ce domaine induit la trimérisation de la glycoprotéine entière alors que la perte de trimérisation de ce domaine induit la perte de trimérisation de la protéine (Arbely et al., 2006). D'autres études suggèrent également que les trimères de HA2 sont stabilisés par l'oligomérisation du domaine transmembranaire (Doms et Helenius, 1986 ; Kemble et al., 1993).
- Il a également été montré que le remplacement du domaine transmembranaire de HA2 par une autre ancre transmembranaire protéique induit une perte de la capacité de HA2 à s'associer avec les rafts (Scheiffele et al., 1997). De nombreuses données suggèrent un rôle des rafts dans le processus de fusion virale (Campbell et al., 2001 ; Liao et al., 2003; Chazal et Gerlier, 2003). Les rafts serviraient de plate-formes pour les glycoprotéines de fusion, permettant alors leur concentration dans une zone restreinte membranaire et facilitant ainsi la fusion (Takeda et al., 2003). De plus, les deux constituants principaux des rafts, le cholestérol et les sphingolipides, auraient également des propriétés physico-chimiques propices à la

fusion (Coorssen et Rand., 1990; Salaün et al., 2004). La localisation du domaine transmembranaire des glycoprotéines au niveau des rafts favoriserait donc la fusion en augmentant la concentration des glycoprotéines et de lipides propices à la fusion au niveau du site de fusion.

Il a également été proposé que le domaine transmembranaire intervienne directement dans la fusion. Différents mécanismes selon lesquels le domaine transmembranaire agirait lors de la fusion ont été suggérés :

- De par leur hydrophobicité élevée, les domaines transmembranaires des glycoprotéines virales pourraient induire une déshydratation de la surface membranaire, favorable à la fusion membranaire. (cf. chapitre 4.5. p.29; Tatulian et Tamm, 2000).

- Le domaine transmembranaire des glycoprotéines de fusion virales pourrait stabiliser les interstices vides existant au sein des intermédiaires de fusion (cf. chapitre 1.2. p.5 ; Lentz, 2006). Ce domaine diminuerait alors l'énergie nécessaire pour induire l'hémifusion.

- Le domaine transmembranaire pourrait également déstabiliser l'hémifusion, permettant la formation du pore de fusion (Melikyan et al., 1995). Dans le cas de HA2, un modèle appelé « elastic coupling » a été proposé (Figure 11). Dans ce modèle, le domaine transmembranaire est mécaniquement couplé à l'ectodomaine de HA2. Après hémifusion, l'ectodomaine de HA2 se retrouve sous conformation post-fusion. Le domaine transmembranaire va alors subir une réorientation qui va « casser » l'intermédiaire d'hémifusion et fournir le pore de fusion. Cette hypothèse est renforcée par les études montrant que le domaine transmembranaire des glycoprotéines doit être suffisamment long pour induire la fusion complète (cf. chapitre 4.3. p.28). Un domaine transmembranaire trop petit serait incapable de fournir une tension suffisante pour déstabiliser le diaphragme d'hémifusion (Armstrong et al., 2000).

Dans le cas du VSV, il a été suggéré que la flexibilité structurale du domaine transmembranaire intervient dans la déstabilisation de l'intermédiaire d'hémifusion (Langosch et al., 2001a ; Dennison et al., 2002). Cette flexibilité induirait une cassure au niveau de l'hélice transmembranaire qui déstabiliserait l'intermédiaire (Cleverley et Lenard, 1998). Les glycines joueraient un rôle dans la cassure de l'hélice transmembranaire puisque le peptide transmembranaire où les glycines sont remplacées par des alanines adopte une structure plus hélicoïdale que le peptide sauvage et induit moins de fusion (Langosch et al., 2001a ; Dennison et al., 2002). Récemment, il a été montré qu'un peptide transmembranaire modèle induit plus de fusion lorsqu'il contient des acides aminés connus pour déstabiliser la conformation hélicoïdale (Hofmann et al., 2004), confirmant le rôle de la flexibilité

structurale sur la fusogénicité des domaines transmembranaires. La forte proportion en glycines des domaines transmembranaires des glycoprotéines virales de classe 1, suggère que ces domaines ont une flexibilité intervenant dans la fusion.

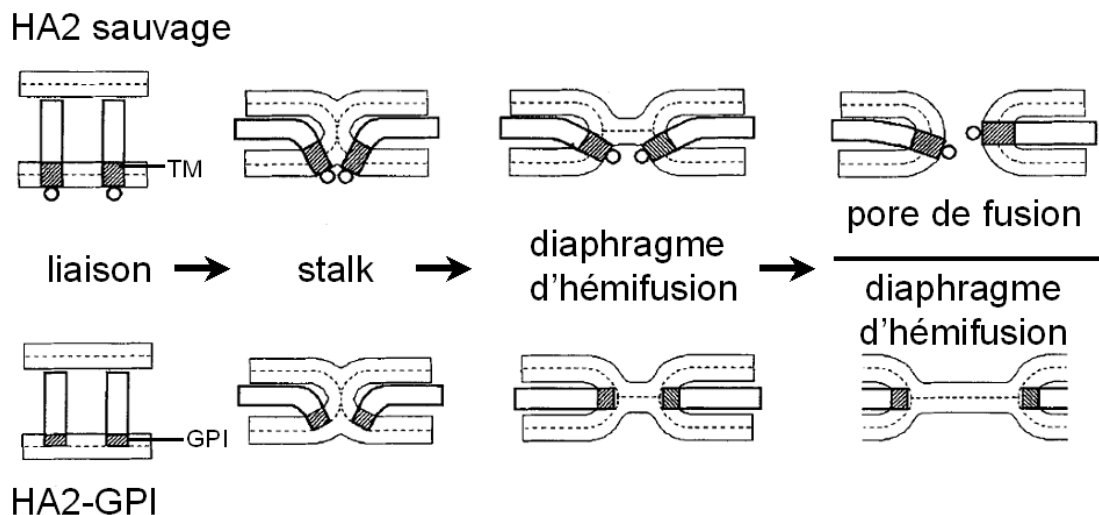


Figure 11 : Modèle « elastic coupling » pour la fusion induite par HA2. Dans le cas de HA2 sauvage (haut), le domaine transmembranaire va induire la déstabilisation du diaphragme d'hémifusion et permettre la formation du pore. Dans le cas de l'ectodomaine HA2 couplé à une ancre GPI (HA2-GPI; bas), la GPI ne peut déstabiliser le diaphragme d'hémifusion. Figure adaptée de Melikyan et al. (1995)

- Le domaine transmembranaire des glycoprotéines virales interagirait avec d'autres domaines protéiques pour que les dernières étapes de la fusion se déroulent. Des études de mutations sur HA2 suggèrent que le domaine transmembranaire interagit avec le peptide de fusion (Cohen et Melikyan, 2004). D'autres suggèrent que le domaine transmembranaire interagirait de manière spécifique avec le domaine cytoplasmique pour induire les dernières étapes de la fusion (Melikyan et al., 1999). En effet, la fusion est plus importante lorsque le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique proviennent d'une même protéine (Melikyan et al., 1999). Toutefois, cette suggestion est remise en cause par d'autres études montrant que ni la séquence spécifique ni la longueur du domaine cytoplasmique de HA2 et gp41 n'est cruciale dans la fusion (Roth et al., 1986 ; Wilk et al., 1992, 1996 ; Jin et al., 1994 ; Schroth-Diez et al., 1998 ; Kozerski et al., 2000).

Les différentes études indiquent donc que le domaine transmembranaire des glycoprotéines virales a, en plus d'un rôle d'ancrage, un rôle dans la fusion. Il favoriserait la formation et/ou la déstabilisation de l'hémifusion, étapes indispensables lors de la fusion.

5. Les peptides obliques

En 1988, Brasseur et ses collègues ont montré par modélisation moléculaire que, lorsqu'il est replié en hélice α , le peptide de fusion de la glycoprotéine virale du virus de la maladie de Newcastle adopte un angle de 55° dans une monocouche de DPPC, suggérant une insertion oblique de ce peptide dans la membrane (Brasseur et al., 1988a). Ce fût la première fois qu'une telle orientation fût prédite.

5.1. Hélices insérées obliquement dans les membranes

Quelques années plus tard, l'équipe du professeur Brasseur a également prédit une insertion membranaire oblique des peptides de fusion des virus de la rougeole, de l'influenza A, Ebola, Sendai et des virus HIV-1, SIV et BLV lorsqu'ils sont hélicoïdaux (Brasseur et al., 1988b, 1990 ; Peuvot et al., 1999 ; Lins et al., 2001 ; Adam et al., 2004). Une insertion membranaire oblique du peptide de fusion de HA2 et de gp41 a également été prédit par des études de modélisation entreprises par d'autres laboratoires (Efremov et al., 1999; Kamath et Wong, 2002 ; Maddox et Longo, 2002 ; Sammalkorpi et Lazaridis, 2007).

L'orientation oblique des peptides de fusion sous forme hélicoïdale a été confirmée par des analyses expérimentales. L'utilisation de l'ATR-FTIR a permis de mesurer un angle de 50° , 45° , 37° et 50° respectivement entre le peptide de fusion du HIV-1 (Martin et al., 1996), du virus de l'influenza A (Luneberg et al., 1995), d'ASLV (Cheng et al., 2004) du SIV (Martin et al., 1994) et la surface membranaire. D'autres techniques expérimentales ont été utilisées pour déterminer plus précisément l'interaction de peptides avec la membrane. L'analyse EPR du peptide de fusion de HA2 indique que la partie hélicoïdale s'insère à environ 15 Å des groupes phosphates avec un angle de 25° (Macosko et al., 1997). Les analyses ESR et FTIR ont montré que ce peptide se lie fortement aux membranes, et s'y insère obliquement (Luneberg et al., 1995). Enfin, l'utilisation de l'EPR et la RMN a permis de déterminer la structure complète et l'orientation de ce peptide dans un milieu mimant les membranes, des micelles de dodécyl-phosphocholine (DPC), confirmant que l'extrémité N-terminale de ce peptide adopte une structure hélicoïdale orientée obliquement (Han et al., 2001). Par diffraction de neutrons, l'équipe de Bradshaw a, quant à elle, confirmé que le peptide de fusion du SIV pouvait s'insérer dans la membrane sous forme hélicoïdale avec un angle de 35° par rapport à la surface à la bicouche (Bradshaw et al., 2000).

En plus des peptides de fusion viraux, d'autres peptides ont également été prédits ou mesurés comme obliques dans les membranes lorsqu'ils sont hélicoïdaux (Martin et al., 1998 ; Lambert et al., 1998 ; Decout et al. 1999 ; Lins et al., 2001 ; Ravault et al., 2005 ; Nguyen et al., 2006). Ces peptides ont été découverts au niveau de protéines variées, comme la fertiline, les apolipoprotéines (Apo), les enzymes lyolitiques, les séquences signal, les protéines membranaires, les protéines antiangiogénèse et les protéines neurotoxiques (Martin et al., 1998 ; Brasseur, 2000 ; Lins et al., 2001 ; Nguyen et al., 2006). Récemment, une orientation membranaire oblique a également été prédite pour un peptide *de novo* composé d'acides aminés non naturels (Lins et al., 2006), indiquant que cette orientation n'est pas spécifique à des fragments de protéines biologiques.

De par leur capacité à adopter une orientation oblique dans la membrane, tous ces peptides ont été appelés « peptides obliques ».

5.2. Peptide oblique et structure

La structure des peptides de fusion dépend fortement de son environnement (cf. chapitre 3.3. p.24). Il en est de même pour les autres peptides obliques. Par exemple, le peptide oblique de la protéine prion adopte une structure majoritairement hélicoïdale dans des micelles de SDS ; hélice qui disparaît dans un milieu aqueux (Pillot et al., 1997). Tout comme les peptides de fusion, les autres peptides obliques contiennent une proportion importante de petits résidus (alanine, glycine), expliquant leur polymorphisme structural. Lorsque les peptides obliques sont repliés sous forme hélicoïdale, une face est généralement plus riche en glycines (Bosch et al., 1989 ; White, 1990, 1992 ; Delahunty et al., 1996 ; Martin et al., 1999 ; Harris et al., 2000 ; Phoenix et al., 2002). Cette distribution asymétrique en résidus glycines a été utilisée récemment pour détecter de nouveaux peptides obliques (Daman et al., 2001).

La labilité structurale des peptides obliques semble importante pour leurs propriétés ainsi que pour celles des protéines contenant un peptide oblique. Il a ainsi été proposé que durant les processus pathologiques induits par la protéine prion (PrP), le polymorphisme structural de la zone protéique 119-137, contenant le peptide oblique, joue un rôle dans la déstabilisation membranaire et induit l'agrégation protéine-protéine à la surface membranaire (Saez-Cirion et al., 2003).

5.3. Une asymétrie hydrophobe à l'origine de l'orientation oblique

Malgré la faible homologie de séquence entre peptides obliques, ils possèdent des caractères communs, étant notamment majoritairement hydrophobes. La répartition de l'hydrophobicité des peptides obliques diffère de celle des hélices amphipatiques (adoptant une orientation parallèle par rapport à la surface membranaire) ou transmembranaires (orientation perpendiculaire par rapport à la surface membranaire) (Brasseur, 1991, 2000 ; Brasseur et al., 1997 ; Rahman et al., 1997 ; Decout et al., 1999 ; Phoenix et al., 2002 ; Thomas et Brasseur, 2006). En effet, les peptides obliques présentent un gradient d'hydrophobicité le long de l'axe de leur hélice (Figure 12 ; Brasseur, 1991, 2000 ; Lins et al., 2001). Par contre, sous forme β , les peptides obliques ne présentent pas ce gradient (Brasseur, 2000).

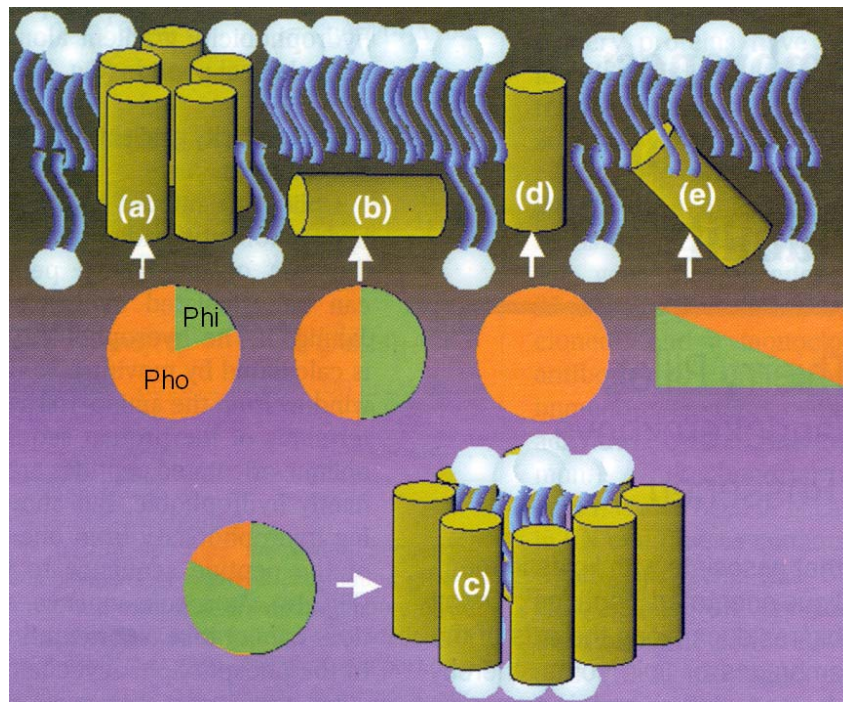


Figure 12 : Mode d'association de peptides avec la membrane.
(a) : peptides très hydrophobes formant un canal transmembranaire.

(b) : peptide amphiphile adsorbé à la surface membranaire.

(c) : peptides très hydrophiles entourant des phospholipides

(d) : peptide totalement hydrophobe formant un peptide transmembranaire.

(e) : peptide avec un gradient d'hydrophobicité le long de l'axe de son hélice s'orientant obliquement dans la membrane : peptide oblique.

Phi : hydrophile (en vert) ; Pho : hydrophobe (en orange).

Figure de Brasseur et al., 1997.

Le gradient hydrophobe est responsable de l'orientation oblique des peptides. L'extrémité la plus hydrophobe de l'hélice s'insère profondément dans le cœur apolaire membranaire alors que l'autre extrémité, plus hydrophile se localise préférentiellement au niveau des têtes polaires ou du milieu aqueux (Perez-Mendez et al., 1998). L'importance du gradient hydrophobe pour l'orientation des peptides obliques a été confirmée par des études de mutations. Des mutations modifiant le gradient d'hydrophobicité modifient l'orientation des peptides (Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2001, 2002).

Les peptides de fusion du virus Ebola, du SIV et du BLV faisant partie des peptides obliques, leur orientation membranaire est également reliée à leur profil hydrophobe. En effet, il a été prédit que la perte du gradient hydrophobe de ces peptides de fusion correspond à la perte de l'orientation oblique pour une orientation parallèle ou perpendiculaire (Horth et al., 1991 ; Vonèche et al. 1992 ; Adam et al., 2004). Par contre, l'orientation oblique de ces peptides est récupérée suite à la restauration du gradient hydrophobe.

La présence d'un gradient hydrophobe au sein d'un peptide oblique est utilisée à l'heure actuelle pour rechercher la présence de tels motifs dans les protéines. De nombreuses méthodes permettent d'identifier le profil hydrophobe d'une protéine et ainsi d'identifier la présence d'un peptide oblique. Les méthodes Jähnig et Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) reposent sur l'analyse de l'hydrophobicité de la séquence des protéines (Gaboriaud et al., 1987 ; Jähnig, 1990). La méthode Molecular Hydrophobicity Potential (MHP) permet de visualiser la répartition de l'hydrophobicité le long d'un peptide modélisé (Brasseur, 1991). Ces méthodes sont généralement associées pour prédire l'existence d'un peptide oblique dans une protéine (Adam et al., 2004).

5.4. Relation obliquité-fusogénicité

Tout comme les peptides de fusion, les autres peptides obliques induisent la fusion et la perméabilisation de liposomes (Pillot et al., 1996, 1997 ; Perez-Mendez et al., 1998 ; Lambert et al., 1998 ; Martin et al., 1998 ; Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2002 ; Lorin et al., 2004 ; Nguyen et al., 2006 ; Crowet et al., 2007). Les peptides obliques de la PrP, de α -synucléine, de la protéine prolactine et du peptide β -amyloïde ($A\beta$) provoquent également la mort cellulaire, confirmant le pouvoir déstabilisateur de ces peptides (Pillot et al., 1999, 2000 ; Haïk et al., 2000 ; Nguyen et al., 2006 ; Crowet et al., 2007).

Cette propriété n'est pas liée au simple caractère hydrophobe des peptides obliques, leur permettant de s'insérer dans les membranes. En effet, des mutants des peptides obliques

des protéines ApoC-III (Lins et al., 2002), Apo A-II (Lambert et al., 1998), lécithine cholestérol acyltransférase (Perez-Mendez et al., 1998 ; Decout et al., 1999), A β (Pillot et al., 1996) et PrP (Pillot et al., 1997) induisent moins de déstabilisation membranaire que les peptides sauvages alors que l'hydrophobicité générale est conservée. Par contre, ces études indiquent que la perte de l'orientation oblique coïncide avec la perte du pouvoir fusogène des peptides obliques (Pillot et al., 1996, 1997 ; Lambert et al., 1998 ; Perez-Mendez et al., 1998 ; Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2002). Lorsque le caractère oblique des peptides est restauré par de nouvelles mutations, sa fusogénicité est également retrouvée (Lins et al., 2002 ; Pillot et al., 1996, 1997 ; Perez-Mendez et al., 1998 ; Lambert et al., 1998). Puisque l'orientation oblique des peptides est gouvernée par la présence d'une distribution asymétrique le long de l'axe de l'hélice (cf. chapitre 5.3. p.35), la perte de ce gradient induit une perte de fusogénicité des peptides (Perez-Mendez et al., 1998 ; Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2002).

La même relation entre obliquité et fusogénicité a également été mesurée pour les peptides de fusion par modélisation moléculaire et analyses FTIR. Des peptides de fusion perdant leur orientation oblique dans la membrane suite à des mutations perdent également leur capacité à déstabiliser les liposomes (Martin et al., 1994, 1996 ; Maddox et Longo, 2002 ; Adam et al., 2004). Une relation entre l'obliquité du peptide de fusion et l'activité fusogène de la glycoprotéine entière a également été mesurée pour gp30 de BLV et gp32 de SIV (Horth et al., 1991 ; Vonèche et al., 1992). Les résultats obtenus pour ces deux peptides de fusion indiquent que plus l'hélice de ces peptides adopte un angle proche de 45° par rapport à la surface membranaire, plus la déstabilisation membranaire est grande (Brasseur, 2000).

L'orientation oblique qu'adoptent les hélices semble donc être le mécanisme responsable de la fusion membranaire. Il a été suggéré que l'insertion oblique désorganise le parallélisme des chaînes acylées lipidiques et par conséquent induit l'apparition d'une courbure négative au niveau des membranes (Brasseur, 2000 ; Bradshaw et al., 2000 ; Epan, 2000). De nombreux résultats vont dans le sens de cette hypothèse. Tout d'abord, il a été montré par modélisation moléculaire, via Hypermatrice, que les peptides obliques induisent une perturbation de l'organisation de monocouches de lipides (Brasseur et al., 1990). Les lipides, qui en l'absence de peptide s'organisent en structure lamellaire avec une courbure positive, adoptent une courbure négative lorsque des peptides obliques y sont insérés. D'autres programmes informatiques montrent également que le peptide de fusion de gp41 induit une déstabilisation membranaire lorsqu'il s'insère obliquement dans celle-ci (Kamath et Wong, 2002). De même, le peptide oblique de la protéine A β induit la formation de structures lipidiques non-lamellaires ainsi qu'une courbure négative à l'interface

membrane/eau (Mingeot-Leclercq et al. 2002, 2003). Par contre, il perd son caractère déstabilisateur lorsque du piracétam, une molécule qui induirait une courbure positive au niveau membranaire, est ajouté (Mingeot-Leclercq et al., 2003). Il a également été montré que les peptides de fusion viraux de gp32 et de HA2 ainsi que le peptide oblique de la fertiline diminuent la température de transition phase lamellaire-phase hexagonale de bicouches lipidiques (Erand et al., 1994, 2001 ; Martin et al., 1998). Par contre, des mutants des peptides de fusion de gp32 et de HA2 adoptant une orientation perpendiculaire n'ont aucun effet sur la température de transition (Erand et al., 1994, 2001). L'insertion oblique du peptide sous forme hélicoïdale élargirait plus le centre de la bicouche que la surface, ce qui favoriserait la courbure négative des membranes et la formation de phases non-lamellaires (Martin et al., 1998).

Remarques : Les informations comprises dans les chapitres 1, 2, 3 et 5 sont en grande partie reprises dans l'article intitulé « Implication des peptides de fusion des glycoprotéines de fusion virales de classe I dans la fusion membranaire » accepté pour publication dans la revue *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement (BASE)*. Les informations concernant les liposomes, leurs propriétés membranaires et leur application dans l'analyse de la fusion comprises dans les chapitres 1, 3, 5 sont reprises en partie dans l'article intitulé « Les liposomes : description, fabrication et applications » publié en 2004 dans la revue *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement (BASE)*. Ces deux articles sont localisés en annexe.

II. BUT DU TRAVAIL

La fusion est un processus impliquant la réorganisation de deux membranes en une seule. Elle se déroule lors de nombreux processus biologiques, comme lors de l'entrée de virus enveloppés dans les cellules cibles. Dans ce cas, la fusion est contrôlée par des glycoprotéines de fusion virales. Des études de mutations et de substitutions montrent que la région du peptide de fusion et le domaine transmembranaire de ces glycoprotéines interviennent directement dans la fusion. De plus, des peptides correspondant à ces deux régions sont également capables d'induire la fusion de membranes *in vitro* (cf. chapitres 3.2 p.21 et 4.5 p.29).

Malgré la découverte des régions directement impliquées dans la fusion et le développement de méthodes de plus en plus sensibles, les mécanismes de la fusion ne sont pas complètement élucidés. Le but de ce travail est de mieux caractériser les interactions entre ces régions et les membranes et leur implication dans la fusion membranaire.

Dans la première partie de ce travail, nous avons analysé l'interaction membranaire des peptides de fusion des virus HIV-1 et BLV. Ces peptides de fusion sont capables d'adopter une orientation oblique sous forme hélicoïdale dans la membrane (cf. chapitre 5.1. p.33). Ils font donc partie de la classe des peptides obliques. Une relation directe entre la capacité des peptides à s'orienter obliquement et leur fusogénicité a précédemment été observée (cf. chapitre 5.4. p.36). Lors de ce travail, nous nous sommes basés sur cette relation obliquité/fusogénicité pour développer une méthode originale permettant de prédire la région des peptides de fusion du HIV-1 et du BLV suffisante pour induire une déstabilisation membranaire significative. Nous avons également prédit l'effet de mutations sur l'insertion membranaire des peptides de fusion du HIV-1 et du BLV. Nous avons ensuite vérifié la validité de ces prédictions par des tests *in vitro*.

De nombreuses études sur les peptides obliques, dont font partie certains peptides de fusion, suggèrent que ce sont des peptides labiles d'un point de vue structural (cf. chapitre 5.2. p.34). Cette labilité serait importante dans les propriétés fusogènes de ces peptides. Dans la deuxième partie du travail, nous nous sommes intéressés à la relation entre peptide oblique et labilité structurale en nous posant la question suivante : est-ce qu'un peptide connu pour sa labilité structurale peut être un peptide oblique ? Pour répondre à cette question, nous avons analysé le peptide caméléon, un peptide *de novo* dont la structure dépend de l'emplacement dans une protéine. Dans cette partie, nous avons de nouveau combiné des approches de modélisation moléculaire et de biophysique expérimentale.

- But du travail -

Le domaine transmembranaire des glycoprotéines virales intervient lors de la fusion virale. La séquence et la longueur du domaine transmembranaire de nombreuses glycoprotéines virales semblent avoir une grande importance dans la fusogénicité de celles-ci (cf. chapitres 4.3. p.28 et 4.4. p.29). Dans la dernière partie du travail, nous avons caractérisé les propriétés membranaires et fusogènes d'un peptide transmembranaire modèle appelé KALR. De par sa séquence, KALR mime les domaines transmembranaires hélicoïdaux des protéines membranaires. En effet, ce peptide contient des résidus promoteurs de la structure hélicoïdale et est composé d'un cœur hydrophobe entouré de résidus polaires chargés positivement. Trois peptides KALRs ont été construits pour étudier l'influence de la longueur du cœur hydrophobe sur les propriétés membranaires et fusogènes de ce peptide.

III. RESULTATS

1. Le peptide correspondant aux 12 résidus N-terminaux de la gp41 du HIV est le peptide minimal suffisant pour induire la déstabilisation significative *in vitro* de membranes mimant celles des lymphocytes T.

1. Lorin, A., Charlotiaux, B., Crowet, J. M., Stroobant, V., Lins, L., Thomas, A. & Brasseur, R. (2006) The N-terminal 12 Residue Long Peptide of HIV gp41 is the Minimal Peptide Sufficient to Induce Significant T-cell-like Membrane Destabilization *in Vitro*. *Journal of Molecular Biology* **359**, 597–609

De nombreux peptides de fusion, dont celui du HIV-1, sont des peptides obliques. Ils sont capables de s'orienter obliquement dans les membranes sous forme hélicoïdale (Martin et al., 1994, 1996 ; Brasseur et al., 2000 ; Lins et al., 2001). Une relation entre la fusogénicité des peptides de fusion du HIV-1 et du SIV et leur orientation dans la membrane a précédemment été démontrée : une perte de l'obliquité de ces peptides dans les membranes correspond à une perte de leur fusogénicité (Martin et al., 1994, 1996). Cette relation a également été mise en évidence pour d'autres peptides obliques (Pillot et al., 1996, 1997 ; Lambert et al., 1998 ; Perez-Mendez et al., 1998 ; Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2002).

Malgré le nombre relativement élevé d'études sur les peptides de fusion, la région de ces peptides intervenant dans la fusion n'est pas connue. Par exemple, selon les publications, le peptide de fusion du HIV-1 correspond soit aux 16 (Martin et al., 1993 ; Kamath et Wong, 2002 ; Wong, 2003), 23 (Pereira et al., 1995, 1999 ; Delahunty et al., 1996 ; Yang et al., 2001 ; Gordon et al., 2002) ou 33 (Pritsker et al., 1999) premiers résidus de gp41. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à déterminer le peptide de fusion minimal, c'est à dire le plus petit peptide de fusion induisant une déstabilisation membranaire significative.

La relation existant entre le potentiel fusogène des peptides obliques et leur capacité à s'insérer obliquement dans la membrane a été utilisée pour développer une méthode de prédiction originale des peptides de fusion minimaux. Cette méthode considère le peptide de fusion minimal comme le plus petit peptide hélicoïdal avec une insertion membranaire oblique optimale, c'est à dire avec un angle d'insertion le plus proche de 45° par rapport à la surface membranaire. L'algorithme IMPALA qui a précédemment permis de prédire de manière correcte l'insertion de peptides dans la membrane a été utilisé pour déterminer l'angle d'insertion des peptides de fusion selon leur longueur (Ducarme et al., 1998).

Nous avons d'abord appliqué cette méthode au peptide de fusion de la souche BRU du HIV-1. Pour cette souche, Gordon et ses collaborateurs (2002) ont proposé 17 modèles de la structure du peptide de fusion de 23 résidus dans du HFIP, un milieu mimant les propriétés membranaires. La conformation de ces 17 modèles est proche, avec les deux premiers résidus ainsi que les résidus 17 à 23 qui adoptent une conformation β , et les résidus 3 à 16 qui adoptent une structure hélicoïdale (Gordon et al., 2002). Ces modèles de Gordon, ainsi que des modèles en hélice α standard, ont été utilisés pour prédire le peptide de fusion minimal de la souche BRU du HIV-1. Les résultats des simulations IMPALA réalisées sur des peptides de 8 à 23 résidus indiquent que le peptide de 12 résidus est le plus petit peptide prédit avec un angle le plus proche de 45° par rapport à la surface membranaire (Figures 1 et 2 de l'article). Il s'agirait donc du peptide de fusion minimal de la souche BRU du HIV-1. La méthode a ensuite été appliquée aux 710 autres souches de HIV-1 (Table 1 et Figure 3 de l'article). Dans ce cas, les peptides ont été modélisés en hélice α standard. Comme pour la souche BRU, le peptide de fusion de 12 résidus est prédit comme étant le peptide de fusion minimal.

L'algorithme IMPALA a également été utilisé pour prédire l'effet de mutations sur l'insertion membranaire du peptide de fusion minimal. Les mutations analysées ont été décrites dans la littérature comme ayant un effet sur la fusogénicité de la gp41 entière (Table 2 de l'article). Les résultats montrent que des mutations diminuant fortement ou annulant la fusogénicité de gp41 empêchent le peptide de fusion minimal de s'insérer obliquement dans la membrane ou induisent l'insertion de son extrémité C-terminale dans la membrane au lieu de l'extrémité N-terminale. Par contre, lorsque des mutations permettant à gp41 de conserver une fusogénicité significative sont appliquées au peptide de fusion minimal, ce dernier s'insère avec l'extrémité N-terminale dans la membrane et adopte une orientation oblique, comme cela est le cas pour le peptide sauvage (Figure 1 et Table 2).

Pour vérifier les prédictions, la déstabilisation membranaire induite par le peptide de fusion de la souche BRU prédit comme étant le peptide de fusion minimal (le peptide de 12 résidus) a été comparée à celle induite par des peptides plus grands et plus courts. Les mesures *in vitro* montrent que ce peptide induit autant de mélange lipidique et de perméabilité de liposomes que des peptides plus longs mais en induit plus que des peptides plus courts (Figure 4 de l'article). Ces tests confirment donc que le peptide de 12 résidus de la souche BRU du HIV-1 est bien le peptide de fusion minimal.

The N-terminal 12 Residue Long Peptide of HIV gp41 is the Minimal Peptide Sufficient to Induce Significant T-cell-like Membrane Destabilization *in Vitro*

B. Charlotheaux^{1†*}, A. Lorin^{1†}, J. M. Crowet¹, V. Stroobant², L. Lins¹
A. Thomas¹ and R. Brasseur¹

¹Centre de Biophysique
Moléculaire Numérique, Faculté
Universitaire des Sciences
Agronomiques, Passage des
déportés, B-5030 Gembloux
Belgium

²Ludwig Institute for Cancer
Research—Brussel Branch
74 Av. Hippocrate, B-1200
Brussels, Belgium

Here, we predicted the minimal N-terminal fragment of gp41 required to induce significant membrane destabilization using IMPALA. This algorithm is dedicated to predict peptide interaction with a membrane. We based our prediction of the minimal fusion peptide on the tilted peptide theory. This theory proposes that some protein fragments having a peculiar distribution of hydrophobicity adopt a tilted orientation at a hydrophobic/hydrophilic interface. As a result of this orientation, tilted peptides should disrupt the interface. We analysed *in silico* the membrane-interacting properties of gp41 N-terminal peptides of different length derived from the isolate BRU and from an alignment of 710 HIV strains available on the Los Alamos National Laboratory. Molecular modelling results indicated that the 12 residue long peptide should be the minimal fusion peptide. We then assayed lipid-mixing and leakage of T-cell-like liposomes with N-terminal peptides of different length as first challenge of our predictions. Experimental results confirmed that the 12 residue long peptide is necessary and sufficient to induce membrane destabilization to the same extent as the 23 residue long fusion peptide. *In silico* analysis of some fusion-incompetent mutants presented in the literature further revealed that they cannot insert into a modelled membrane correctly tilted. According to this work, the tilted peptide model appears to explain at least partly the membrane destabilization properties of HIV fusion peptide.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: HIV-1; fusion peptide; membrane fusion; tilted peptide; molecular modelling

*Corresponding author

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) penetrates T-cells through the gp120-mediated specific binding to the CD4 receptor and chemokine co-receptor, and the subsequent fusion of its

envelope with the plasma membrane. The gp41 transmembrane envelope protein is involved in the fusion between these two membranes by decreasing the activation energy barrier related to this process.^{1–8} Concomitantly with fusion, gp41 undergoes drastic structural changes that notably release the N-terminal fusion peptide (FP).^{1,3–7} Mutagenesis studies with intact gp41 show that FP sequence is important for complete cell-virus fusion.^{9–12} Experiments with synthetic peptides revealed that the gp41 FP lyses membranes, induces pore formation and leakage of lipid vesicles even in the absence of the whole protein.^{13–18}

Lipid destabilization by the FP requires its insertion into the membrane.^{13,19} Mutations preventing insertion give a non-fusogenic peptide.¹⁴ Correlation between FP ability to insert into a membrane and the capacity of the parent protein to mediate fusion has also been shown.^{13,20,21} These

† B.C. and A.L. contributed equally to this work.

Abbreviations used: FP; fusion peptide; HIV; human immunodeficiency virus; NHR; N-terminal heptad repeat; wt; wild-type; PDB; Protein Data Bank; IMPALA; Integral Membrane Protein and Lipid Association; LUV; large unilamellar vesicle; DMPC; dimirystoyl-phosphatidylcholine; DOPC; dioleoyl-phosphatidylcholine; DOPG; dioleoyl-phosphatidylglycerol; DOPE; dioleoyl-phosphatidylethanolamine; Chol; cholesterol; DPC; dodecylphosphocholine.

E-mail address of the corresponding author:
charlotheaux.b@fsagx.ac.be

results demonstrate that studies with model peptides can generally be extrapolated to the whole protein.

Many publications are dedicated to the determination of FP structure in different environments.^{13,18,20,22–40} Resulting data are confusing and somehow paradoxical. The FP structure can be predominantly α -helix,^{13,25,26,41,42} β -structures^{16,18,31,32,37,40,43} or both.^{19,26,33,44,45} These differences may have to do with the investigated peptide, its environment, sample preparation, peptide load, experimental method and even time of measurement.^{19,44} For instance, β structures in lipids are observed if oligomerization is promoted by high peptide concentration,^{13,19,25,26,41} by cross-linking,³⁹ or by linking to the first heptad repeat of gp41 ectodomain.^{31,32,46} On the opposite, low peptide concentration and SDS micelles favour the occurrence of helical structures.^{19,25,26,42}

From these studies, we can conclude that FP presents intrinsic polymorphism and can adopt several structures in its membrane-associated form. The fusogenic structure(s) must, however, be clearly established. Helical and β structures could both be relevant and serve specific purposes.^{32,33,44} It has also been proposed that α -helix to β -sheet transition could occur during the early steps of fusion and be related to formation of the fusion pore.^{19,33,44} According to Sackett & Shai, FP oligomerization into parallel β -sheet would also be required for virus-cell fusion.^{32,47}

IR and NMR measurements indicate that a helical structure of the FP inserts obliquely into a membrane.^{13,19,25,45} This tilted orientation was also shown by molecular modelling.^{27,28,48,49} Moreover, obliquity was shown to correlate to fusogenicity, since mutant peptides that are no more tilted are defective for fusion.^{13,27,28,49}

Various peptide segments have been modelled as asymmetric amphipathic alpha-helices.^{50–52} They have been named “tilted peptides”, since theoretical calculations have shown that they insert obliquely into model membranes.^{50–52} Tilted peptides are short sequence fragments (10–20 residues long) that possess an asymmetric hydrophobicity gradient along their sequence when they are helical.^{50–52} Due to this gradient, they adopt a tilted orientation with respect to a lipid/water interface inducing lipid destabilization. In the past decade, we have detected those peptides in several proteins with various functions.^{50–52} To assist those predictions, we have developed IMPALA. This method allows us to study the interactions between a compound and a lipid bilayer using simple restraint functions designed to mimic the major properties of the membrane.⁵³ IMPALA was used to analyse peptide and protein interactions with the membrane,^{53–55} and predict tilted peptides.^{56,57} Recently, IMPALA was used to design a *de novo* fusogenic peptide made of non-natural amino acids.⁵⁸

To date, no precise definition of the fusion peptide has been proposed in the literature.²⁴ Furthermore, there are some disagreements on

which gp41 region corresponds to the FP. Some authors study a 16 residue,^{27,45,49} others, a 23 residue^{10,26,37,59,60} or even a 33 residue long FP.¹²

Here, we looked for the minimal peptide sufficient to induce significant membrane destabilization. We call it the “minimal FP”. We tried to find out which gp41 fragment of sequence corresponds to the minimal FP on the basis of the tilted peptide theory. Using IMPALA, we searched for the shortest N-terminal peptide with an optimal tilted insertion as helix into a modelled membrane. This study was performed for the HIV-1 BRU isolate and for 710 other HIV strains. From these results, we predicted that the minimal FP should include only the first 12 residues. Liposome fusion and leakage assays were then used to check the validity of our prediction. These results are discussed with respect to the current data on the FP structure and the gp41-mediated fusion model.

Results

In silico prediction of the minimal FP for the HIV BRU isolate

In order to predict the minimal gp41 FP, we first analysed peptides of different length from the BRU isolate. Two types of structure were investigated: canonical helical models and models derived from the Protein Data Bank (PDB) structure proposed by Gordon *et al.*²⁵ For helical models, α -helices of different length were constructed with Hyperchem as described in Materials and Methods. For the Gordon’s model, all the 17 structures of the PDB file were used. The Gordon’s model contains 23 residues. Shorter peptide 3-D models were created by deleting the C-terminal residues.

Membrane interaction properties of N-terminal peptides from eight to 23 residues were predicted using IMPALA (FP8 to FP23). The lower limit of eight residues was fixed to have at least two helix turns. We determined the minimal FP on the basis of the tilted peptide theory. That is to say that we searched for the shortest helical peptide able to insert into the membrane with an oblique angle as close as possible to 45°. Figures 1 and 2 present the results of these simulations for both investigated 3-D models.

No peptide lays parallel to the membrane surface (angle between 0° and 30°) in IMPALA simulations. All peptides insert in the membrane with an angle between 30° and 80°. As shown in Figure 1, all peptides have their N terminus in the membrane hydrophobic core and their C terminus in the aqueous phase or around the lipid polar head groups. IMPALA results are similar for helical peptides and Gordon’s model up to 18 residues. For the 17 Gordon’s models, standard deviation is between 5° and 15° depending on peptide length.

According to the literature, the helix axis of tilted peptides makes an angle between 30° and 60° with respect to the membrane plane.⁵⁰ Only six peptides

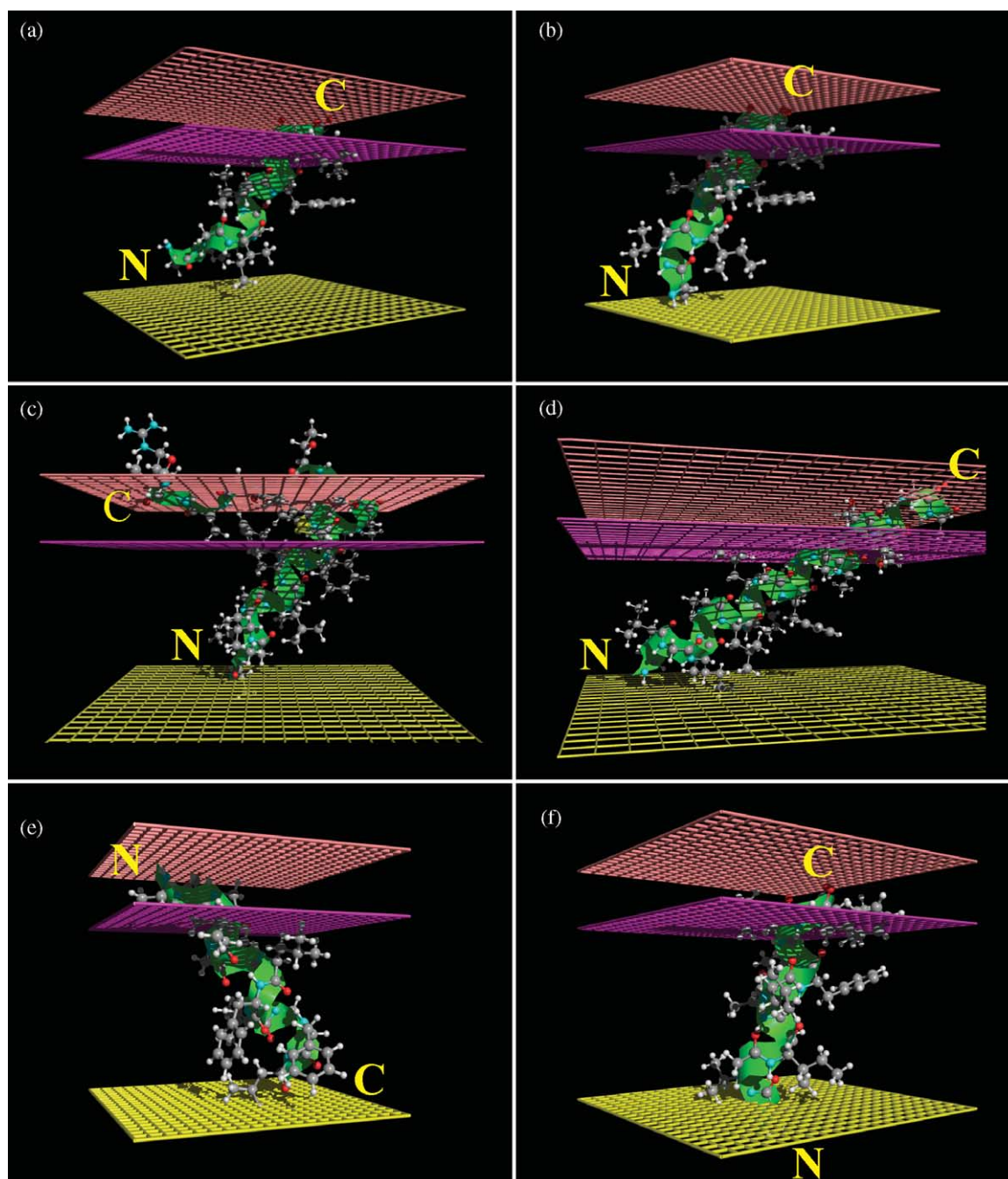


Figure 1. Most stable position in the membrane as predicted by IMPALA for FP12 with structure from the Gordon's model (a) or in canonical helical structure (b), for FP23 with structure from the Gordon's model (c) or in canonical helical structure (d), for FP12 V2E mutant (e) and FP12 G10V mutant with helical structure (f). N-terminal and C-terminal extremities are indicated. Only one layer of the membrane is represented. Bottom plane (yellow), bilayer centre ($z=0$); first upper plane (mauve), lipid chain/polar headgroups interface at 13.5 Å from the centre; second upper plane (pink), lipid/water interface ($z=18$ Å).

have a tilted insertion for canonical helical structures and the Gordon's models: FP8, FP12, FP13, FP21, FP22 and FP23 (Figure 2). For FP8, the predictions based on the helical and Gordon's models gave divergent results. Hence, FP8 was discarded. FP12 has the optimal oblique angle in IMPALA simulation since its tilt is the closest to 45°.

The predicted angle is 55° for the helical model and $48(\pm 5)^\circ$ for Gordon's models. For both models, FP12 penetrates significantly into the membrane (Figure 1). Small differences between the results obtained using the canonical helical structure or the 17 Gordon's models further support that FP12 should be the minimal FP.

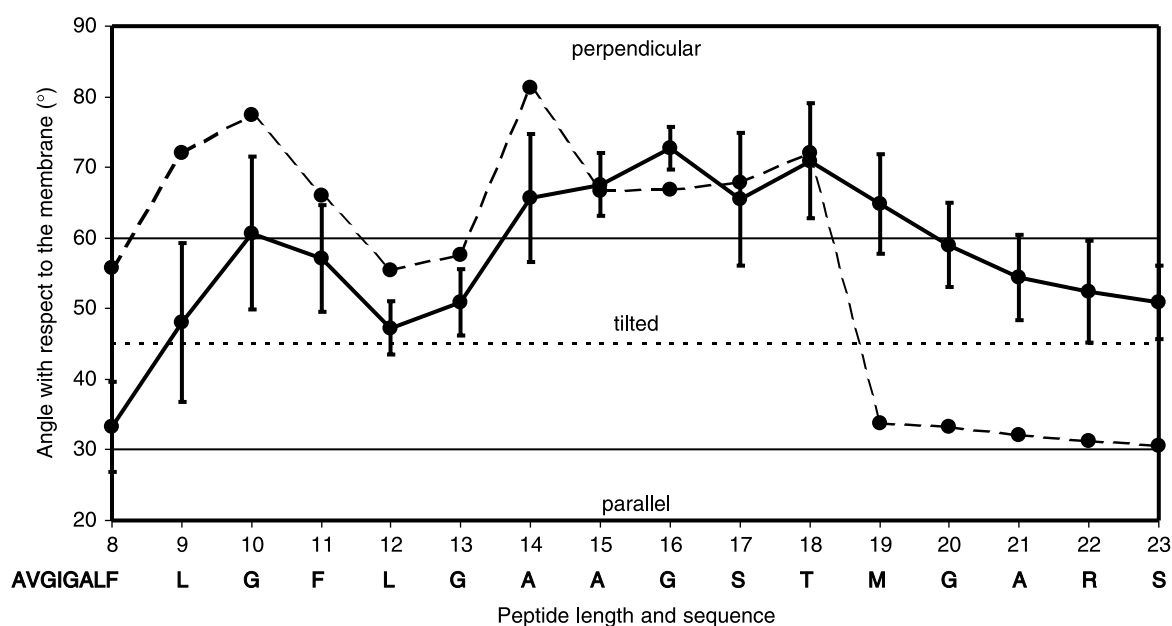


Figure 2. Optimal angle with respect to the membrane plane predicted by IMPALA for FPs of different length. The dotted line corresponds to the peptides with canonical helical structure. The continuous line corresponds to the mean angle for peptides derived from Gordon's model. Standard deviation for the 17 structures is represented.

***In silico* prediction of the minimal FP for 710 HIV strains**

We analysed FP sequences from 710 HIV strains. The gp41 sequence alignment was downloaded from the HIV sequence database from the Los Alamos National Laboratory†. On the basis of the alignment, we extracted sub-databases of peptides corresponding to the eight to 18 residue long reference peptides from the isolate BRU. This analysis was done with respect to the alignment rather than length itself since fusogenic properties are supposed to be coded by FP sequence. For each sub-database, all non-redundant peptides were constructed as canonical helices and studied with IMPALA.

Table 1 indicates the number of non-redundant peptides of the same length, shorter or longer than the aligned reference peptide from the BRU isolate. Sequences with the same length as the reference peptide of the BRU isolate account for 70% or more excepted for the eight residue long reference peptide (64%).

We performed IMPALA simulations for all non-redundant peptides. Some peptides insert with their C-terminal extremity in the membrane hydrophobic core of the membrane (Table 1). They were discarded for further analyses. These peptides correspond for example to mutants with a Glu or Ser residue in the second position (data not shown). Figure 3 presents the results for all remaining peptides. They are similar to those obtained for the BRU isolate using helical and Gordon's models.

Tilted insertion is observed for peptides aligned with 12 and 13 residue long peptides of the BRU isolate (Figure 3). Again, from these results, we selected the 12 residue long peptide as minimal FP since it is the shortest peptide predicted tilted in the membrane. It makes an angle with respect to the membrane plane equal to $55(\pm 6)^\circ$. For this peptide, the standard deviation is furthermore the smallest.

***In silico* analysis of mutant FP**

The last step of our *in silico* analysis consisted of the characterization of mutant FP described in the literature.⁹⁻¹² Most of these mutations have been shown to be associated with a significant reduction of gp41-mediated cell-cell fusion (Table 2). These mutations were introduced into the 12 residue long FP, since it was the predicted minimal FP. Using canonical helical structures, we then investigated if the tilted insertion was maintained. Table 2 and Figure 1 present the IMPALA results obtained for these mutants.

IMPALA results reveal some correlation between a correct tilted insertion in the membrane and the behaviour of the corresponding gp41 in cell-cell fusion assays. The non-fusogenic V2E and V2R mutants insert in the modelled membrane with their C terminus in the hydrophobic core instead of their N terminus. L9R and G10V mutants are not tilted. Both mutations correspond to mutants unable to induce syncytia. Two other mutants induce around 10% of syncytia formation. Their predicted insertion angle is equal to the 60° cutoff value for tilted peptides. IMPALA predicts that the seven last mutants correctly penetrate the membrane with their N terminus and are tilted. These

† <http://www.hiv.lanl.gov/>

Table 1. Analysis of non-redundant FP of different length derived from the alignment of 710 HIV strains

Reference sequence	AVGIGALF	F	L	G	F	L	G	A	A	G	S	T
	Length	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Shorter peptides		16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Peptides with reference length		97	123	125	126	127	134	152	152	152	152	154
Longer peptides		36	36	36	39	39	44	44	44	44	44	44
Non-inserted peptides (%) ^a		14.1	16	3.9	6.6	4.9	3.2	2.4	0.5	0.5	0.5	0.5
Tilted peptides (%)		13.4	2.9	2.8	2.2	89	92	4.2	20.7	22.6	22.2	23.2
Average angle (°)		61	69	76	65	55	56	74	63	61	64	66
Standard deviation (°)		19	12	10	10	6	6	10	7	10	10	13

Results are presented with respect to the length of the corresponding reference peptide. Number of peptides shorter than the reference peptide, with the same length or longer.

^a Non-inserted peptides are peptides that do not insert into the membrane or insert their C terminus instead of their N terminus. These peptides are not taken into account for the calculation of the average angle. Peptides are considered tilted if their angle is between 30° and 60° with respect to the membrane.

mutants are fusogenic and induce at least 15% of syncytia with respect to the wild-type (wt).

Lipid-mixing and leakage assays

According to our *in silico* analyses, the 12 residue long peptide should be the minimal FP for membrane destabilization. In order to validate our prediction, we carried out lipid-mixing assays with nine to 14, 16 and 23 residue long gp41 N-terminal peptides corresponding to the sequence of the isolate BRU. The ApoE peptide was used as negative control.⁶¹ The induction of vesicular lipid mixing by the different peptides was tested with LUVs mimicking the composition of T-cell membrane since it is the target membrane of gp41 FP. The R18-labelled and R18-free liposomes were mixed and the time-course

increase of fluorescence intensity due to the dequenching of the probe was measured to follow-up lipid fusion.

Figure 4(a) clearly shows that the 12 residue peptide induces fusion to the same extent as the 23 residue long peptide. In both cases, the process is dose-dependent. For peptide/lipid ratio of 0.2 or higher, both peptides induce more than 30% of lipid-mixing. Figure 4(b) shows the lipid-mixing induced by all tested peptides at a peptide/lipid ratio of 0.4. While the nine and ten residue long peptides do not induce significant fusion, peptides of 12 residues or more induce fusion to the same extent as the 23 residue long FP. Fusogenic activity of the 11 residue long peptide is approximately half of the longer peptides.

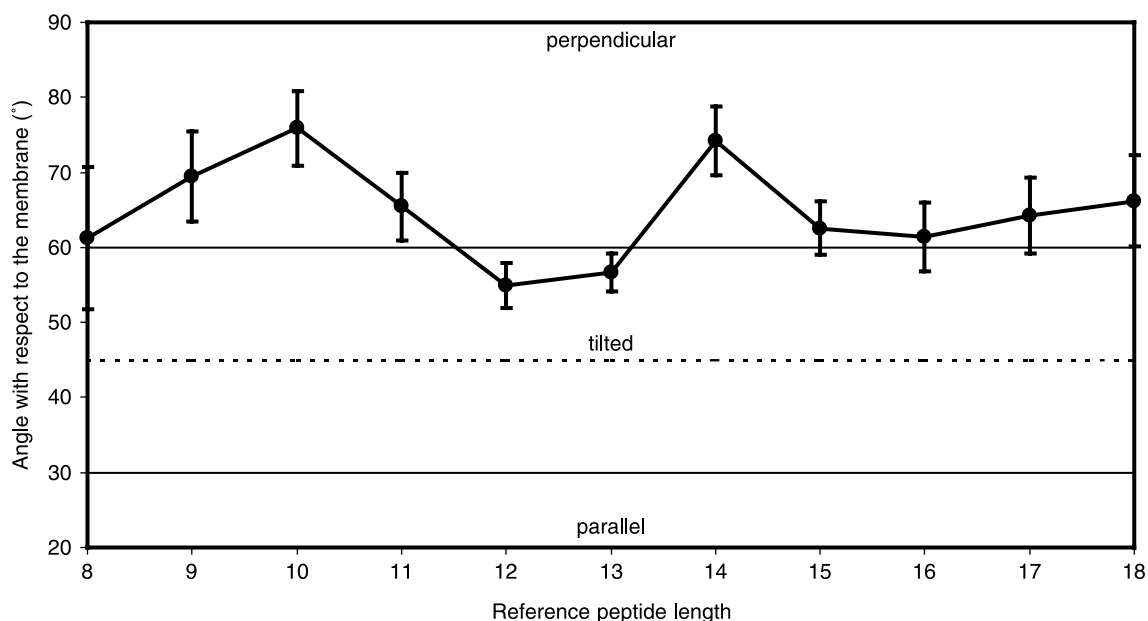


Figure 3. Optimal angle with respect to the membrane plane predicted by IMPALA for FP derived from the alignment. Results are presented as a function of the length of the reference peptide from the BRU isolate. Standard deviation for the different sequences is represented.

Table 2. IMPALA analysis of 12 residue FP with mutations described in the literature (see references in the Table)

Reference	Literature		IMPALA	
	Mutation	% Syncytia	Inserted ter.	Angle
WT	/	100	N-ter.	56
Buchschacher <i>et al.</i> ⁹	V2A	96	N-ter.	57
	V2R	<1	C-ter.	44
	V2G	56	N-ter.	56
	G3V	34	N-ter.	55
Delahunty <i>et al.</i> ¹⁰	G5V	45	N-ter.	56
	F8V	33	N-ter.	53
	G10V	0	N-ter.	73
	F11V	15	N-ter.	58
	A1E	8	N-ter.	61
Freed <i>et al.</i> ¹¹	V2E	<2	C-ter.	56
	L9R	<2	N-ter.	27
	A1VF8L	56	N-ter.	56
Pritsker <i>et al.</i> ¹²	F11G	10	N-ter.	60

The column Inserted ter. indicates if the N terminus or the C terminus is inserted in the membrane hydrophobic core. The column Angle gives the angle between the helix axis and the membrane plane (°).

We then performed leakage assays to further assess the lipid-destabilizing properties of the peptides. As in lipid-mixing, the 12 residue long peptide induces permeability comparable to that induced by the 23 residue long peptide and the process is dependent on the peptide concentration (data not shown). The highest response is obtained for a peptide/lipid ratio of 0.8. Figure 4(c) presents a comparison of the liposome permeability induced by the peptides as a function of peptide length. Again, FP9 and FP10 do not induce significant membrane-destabilization. FP11 causes 35–40% leakage and FP12 or longer, around 85%.

From these results, we can conclude that the gp41 12 residue peptide is able to induce significant lipid-mixing and leakage of T-cell-like liposomes. Moreover, it is the smallest peptide with membrane-destabilizing properties similar to that of the 23 residue peptide.

Discussion

Understanding viral fusion is a major challenge for public health to develop drugs and vaccines that prevent virus entry into cells. This is also a subject of choice to unravel the general mechanism of membrane fusion. Here, we combined molecular modelling with biophysical approaches to find out the minimal part of the gp41 FP that induces significant membrane-destabilization.

We used the tilted peptide theory to predict the minimal FP. We made *in silico* simulations of peptides of different length inserted in an implicit membrane model. These simulations were performed with several 3-D models and various gp41 sequences. We predicted that the 12 residue long peptide would insert in the membrane with an angle between 45° and 55° with respect to the membrane plane depending on the sequence and the 3-D model used for the calculations. According to the tilted peptide theory, this peptide would have fusogenic properties. Our predictions furthermore

revealed that this peptide is the shortest one that would have membrane-destabilizing properties. The tilted peptide theory was also able to partly explain the phenotype of some mutants presented in the literature. Results of lipid-mixing and leakage assays are in agreement with the calculations. The 12 N-terminal residues of gp41 correspond to the smallest peptide able to destabilize the membrane to the same extent as the 23 residue long FP.

Are the membrane destabilizing properties of the FP related to helical structure?

The use of helical representation of protein sequence has already been shown to give valuable information about its properties even for regions that do not adopt helical conformation in the 3-D structure. This was emphasized in the early eighties by Eisenberg, who developed the concept of the helical hydrophobic moment.^{62–64} Another example is the hydrophobic cluster analysis method that uses a flattened projection of an α -helix for secondary structure prediction and sequence comparison.^{65–68} Similarly the use of helical FP models could allow the prediction of fusogenic and non-fusogenic peptides even for non-helical peptides. However, some data suggest that a helical structure of gp41 FP could be relevant for membrane destabilization.

Fusion peptides from several other viruses like Ebola, NDV, BLV and SIV have been proposed to adopt a helical oblique conformation when inserted in lipids.^{56,69–72} In all cases, experimental data assessed the prediction of helical conformation and for some, of tilted insertion.^{56,73–76} Furthermore, mutational analyses confirmed the relationship between the oblique orientation and fusogenic properties of WT peptides.^{56,70–72} This was not only shown for peptides *in vitro* but also with complete fusion glycoproteins in cell–cell fusion assays.^{56,70–72} Tilted peptides with membrane-destabilizing properties have been detected in various other proteins like fertilin,⁷⁷ lipase,⁵⁷ yeast invertase⁷⁸ and A β

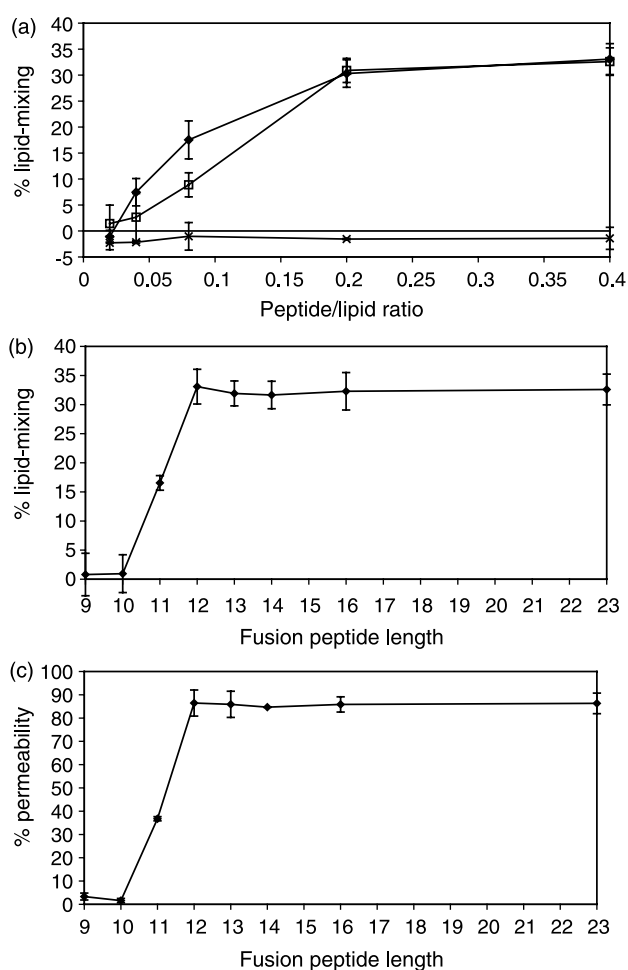


Figure 4. (a) Percentage of lipid-mixing of LUVs mimicking T-cell membrane induced by the 12 residue FP (◆), 23 residue FP (□) and the ApoE peptide (X, negative control) as a function of peptide/lipid molar ratio. (b) Percentage of lipid-mixing of LUVs mimicking T-cell membrane induced by FPs of different length at a peptide/lipid ratio of 0.4 (optimal fusion). (c) Percentage of leakage using LUVs mimicking T-cell membrane induced by FPs of different length at a peptide/lipid ratio of 0.8 (optimal leakage).

peptide.^{79,80} Recently, we designed a tilted *de novo* peptide made of non-natural residues that was shown to destabilize membranes *in vitro*.⁵⁸ Tilted peptides appear thus to be more than a simple theoretical concept.

In the context of this study, we predicted a tilted orientation of gp41 helical FP in agreement with previous studies.^{13,19,27,48} Very recently, Castano & Desbat used PMIRRAS and polarized ATR spectroscopy coupled with Brewster angle microscopy and spectral simulations to determine the structure and orientation of a 23 residue long gp41 FP in lipids.¹⁹ They showed that, at low concentration, the FP forms an α -helix with a tilted angle of $53.5(\pm 3.0)^\circ$ with respect to the membrane plane in

multibilayers of DOPC/Chol/DOPE/DOPG (P/L ratio = 0.005), and a tilted angle of $51.0(\pm 5.0)^\circ$ in DMPC bilayers (P/L ratio = 0.01). This correlates well with the results of the IMPALA simulations.

Furthermore, analysing several mutant peptides, we predicted that the FP V2E mutant should not be able to correctly insert into the membrane. Preliminary results indicate that a 12 residue long peptide with this mutation does not induce lipid-mixing in our conditions (data not shown). Morris *et al.* used a number of NMR techniques to characterize the differences between the WT and V2E peptides in the presence of DPC micelles as membrane mimics.²⁸ They showed that differences in activity are not correlated to different conformational characteristics. Both peptides are at least in an α -helical conformation between the Ile4 to Leu12. Spin-label studies provided clear indication that the wt FP inserts its N terminus into the micelles. On the opposite, the V2E mutant does not insert into the micelles while its membrane affinity is not impaired. They concluded from the spin-label results and deuterium amide proton exchange experiments that the oblique insertion of the FP correlates with its fusogenic activity.

Since (1) tilted peptides have been evidenced for several other viruses and various proteins, (2) the gp41 FP has been determined to adopt an α -helix structure in some conditions, (3) the predicted angle correlates well with the angle determined experimentally, and (4) we were able to predict the effect of some mutants, it is likely that our prediction method owes its success to some significance of the helical structure for membrane-destabilization. How could this proposal be in agreement with the growing body of evidence indicating that a β -structure is important for fusion?^{26,32,38,44}

How is the FP structure related to fusion?

A lot of publications have been dedicated to the study of the gp41 fusion peptide in various conditions.^{13,18,20,22–25,27–30,32,35,37,40,47} According to these studies, the peptide is either helical,^{13,25,41,42} extended,^{16,18,32,37,40,43,47} or even a combination of both structures.^{19,26,33,44,45} This leads to the conclusion that the gp41 FP present some structural flexibility and is able to adopt various structures depending on its environment.

In the native envelope complex, the gp41 FP is buried into the hydrophobic core of the gp41–gp120 oligomer.^{1,3–7} After gp120 shedding, it becomes accessible to the aqueous environment and would be projected towards the target membrane with the formation of the pre-hairpin structure of the gp41 ectodomain. It would then interact with the membrane inducing its dehydration, and inserts to mediate fusion and the formation of the pore. These events expose the FP to a variety of environments. It is probable that due to its structural flexibility, the FP fluctuates between coil, α and β -structure along its way from the centre of the native gp120–gp41 complex to the fusion pore.

We propose that during the first step of the fusion process, the FP would adopt a transient helical structure that would induce destabilization of the membrane and prime it for fusion. The monomeric α -helix would then reorganize into oligomeric β structures. This second step would induce fusion and formation of the pore.

The significance of the FP structure determined experimentally is somehow limited due to practical constraints. Indeed, these results have generally been obtained after incubation with lipids while the fusion process is a relatively fast phenomenon.^{13,37} Recently, Buzon *et al.* used FTIR measurements to follow the structural modifications encountered by the FP that moves from water phase to lipids.⁴⁴ They showed that FP23 with a free N terminus forms a mixture of unordered, β and α -structures in aqueous buffer. Upon interaction with a model membrane, slow conformational change leads to the formation of aggregated β -structures. Helical structures persist during the first 50 s. As indicated by their results, the fusion process depends on the α to β transition rather than β structure itself. The importance of such conformational changes was also stated previously.^{26,33} Furthermore, distinct roles have been proposed for helical and extended FP conformations.^{26,29,33} This is in agreement with Castano & Desbat, who showed using FTIR spectroscopy that the α -conformation induces lipid acyl chain disorder while the β -conformation induces a complete disorganization of the lipid chains.¹⁹ The requirement of two distinct conformations and transition should account for the peculiar composition of viral FP, which are for example particularly rich in glycine residues.⁸¹

Similarities between the gp41 FP and amyloid peptide of Alzheimer's disease have already been mentioned in the literature.^{26,32,82} A β 29-42 is implicated in the formation of senile plaques of Alzheimer's disease.⁸³⁻⁸⁵ This peptide is also known to have several conformations, from random coil to helix and β -extended forms.^{86,87} Because of its hydrophobicity, the latter is responsible for the peptide aggregation often observed in NMR experiments.⁸⁸ Beta aggregates are considered as a denatured stable structural conformation. It has been proposed that before peptide aggregation, a transient helical form might have peculiar biological properties related to membrane-destabilization. This peptide has been shown to belong to the tilted peptide class.^{50,80} Recently, we designed peptides that inhibit the fusogenicity of the A β 29-42 peptide *in vitro*.⁸⁹ Since the design of the inhibitors was based on helical 3-D models, these results point out the correlation between helicity and fusogenicity in the case of the amyloid peptide.

A crucial point related to the significance of α and β -structure for fusion is oligomerization. Oligomerization, promoted by high peptide load,^{13,19,25,26,41} FP cross-linking³⁹ or linking of the FP to oligomerization motives,^{32,47} is always related to an increase of lipid-mixing with respect to monomeric forms. In addition to the α to β transition, oligomerization appears to be

another key factor governing the fusion process. It has also been suggested that the FP could form higher order oligomers consecutively to the clustering of gp41 trimers at the fusion pore.^{32,44,90}

In vivo, FP is part of the whole gp41 protein. Its oligomeric state depends thus on the structure and clustering of gp41 trimers. A model for conformational transitions of the gp41 ectodomain is proposed in the literature.^{1,3-7} This model is based on numerous experimental data and on homologies with the haemagglutinin fusion protein. According to this model, the N-terminal heptad repeat (NHR) region should form a trimeric coiled-coil structure in the pre-hairpin intermediate and post-fusion structures but not in the native gp41-gp120 complex. Mutations that affect the helicity and/or the oligomerization of the NHR impair fusogenicity while they have no detectable effect on the structure of the native envelope complex, for example.⁹¹⁻⁹⁷ Oligomerization of the FP before the formation of the pre-hairpin intermediate is thus unlikely. Indeed, it has been shown that the formation of FP β -sheet is driven by oligomerization of the NHR or GCN4 motives.^{32,47} Oligomerization is required to mask the polar backbone of β -strand FP and to allow its insertion into the membrane. The first conformation adopted by gp41 FP in *in vivo*-like conditions could be an α -helix. In the case of HA2-mediated fusion, FP insertion into the target membrane occurs before the formation of the pre-hairpin structure.³ Moreover, inserted FPs have a helical conformation with a tilted angle.⁹⁸

In conclusion, this work is another piece of evidence that the tilted peptide theory can predict fusogenic properties of peptides using helical 3-D models. We show that the 12 N-terminal residues of the HIV gp41 are necessary and sufficient to induce membrane destabilization of T-cell-like membranes to the same extent as the 23 residue long peptide. We propose that the gp41 FP inserts transiently into the target membrane as an α -helix to induce a first destabilization and prime the membrane for fusion. A transition from monomeric α -conformation to oligomeric β -sheet would then be responsible for fusion and pore formation. The proposed model reconciles conflicting data presented in the literature. Data related to gp41 fusion peptide as well as conformational modifications of the gp41 ectodomain, and viral fusion correlate well with our proposal. This model needs further experiments to be validated or invalidated.

Materials and Methods

In silico

Materials

All calculations were performed on Pentium 4 processors. Molecular views were drawn using WinMGM (Ab Initio technology, Obernai, France).

Peptide sequence and structure

HIV-1 BRU isolate gp41 sequence corresponds to Swissprot entry P03377. The first 23 residues are AVGIGALFLGFLGAAGSTMGARS. The gp41 sequence alignment of 710 HIV strains was extracted from the HIV sequence database of the Los Alamos National Laboratory†. Mutant peptide sequences were generated introducing the corresponding mutation into the 12 residue sequence of BRU isolate.

Structures of the Gordon's model were extracted from the PDB, accession code 1ERF. Gordon *et al.* combined experimental studies and molecular simulations to provide 17 structures representative of the 23 residue peptide structure in HFIP solvent. These structures are mainly folded in α -helix (residues 3 to 16) and are very close to the structure of the peptide in a POPG membrane.²⁵

Canonical helical peptides were constructed using Hyperchem (release 6.1 for windows-Hypercube) assigning values of phi/psi angles of -58° and -47° corresponding to classical α -helical structure.⁹⁹ The conformation of backbone and side-chains was optimized with Hyperchem by a conjugated gradient procedure using AMBER force field.

Membrane insertion

We inserted peptides into an implicit bilayer using the IMPALA (Integral Membrane Protein and Lipid Association) algorithm developed by Ducarme *et al.*⁵³ It simulates the insertion of any molecule (protein, peptide, drug) into a bilayer by adding energy restraint functions to the usual energy description of molecules.^{100,101}

The lipid bilayer is defined by $C(z)$, which represents and empirical function describing membrane properties. This function is constant in the membrane plane (x and y -axes) but varies along the bilayer thickness (z -axis) and more specifically, at the lipid/water interface corresponding to the transition between lipid acyl chains (no water = hydrophobic core) and the hydrophilic aqueous environment:

$$C(z) = 1 - \frac{1}{1 + e^{\alpha(z-z_0)}}$$

where α and z_0 are constant parameters such that $C(|z| \geq 18 \text{ \AA}) = 1$ and $C(|z| \leq 13.5 \text{ \AA}) = 0$. The value of the function is constant from $-\infty$ to -18 \AA (hydrophilic phase), from -13.5 \AA to 13.5 \AA (hydrophobic core), and from 18 \AA to ∞ (hydrophilic phase).

Two restraints simulate the membrane, one the bilayer hydrophobicity (E_{int}), and the other, the lipid perturbation (E_{lip}).

The hydrophobicity of the membrane is simulated by E_{int} :

$$E_{\text{int}} = - \sum_{i=1}^N S_{(i)} E_{\text{tr}(i)} C_{(z_i)}$$

where N is the total number of atoms, $S_{(i)}$ the solvent accessible surface of atom i , $E_{\text{tr}(i)}$ its transfer energy per unit of accessible surface area, and $C_{(z_i)}$ the value of $C(z)$ with respect to its position.

The perturbation of the bilayer by insertion of the molecule is simulated by the lipid perturbation restraint

(E_{lip}):

$$E_{\text{lip}} = a_{\text{lip}} \sum_{i=1}^N S_{(i)} (1 - C_{(z_i)})$$

where a_{lip} is an empirical factor of $0.018 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.

The interaction of the peptide with the bilayer is analyzed by a Monte Carlo (MC) simulation of 100,000 steps at 298 K. Three degrees of freedom are tested (two rotations and one translation along the z -axis). Maximal rotations of 2° and translations of 1 \AA are allowed per step. No modification of the peptide structure is allowed, so that the Coulomb, van der Waals, and torsion energies are considered as constants. The environment restraint applied on the peptide that inserts into the membrane is the sum of E_{int} and E_{lip} . The position of the structure with the lowest restraint value is considered as the most stable conformation in the bilayer. Here, calculations were repeated three times for each peptide. All repeats gave similar results.

In vitro assays

Materials

1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*rac*-(1-glycerol) sodium salt (DOPG) and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), cholesterol (CHOL), and bovine brain sphingomyelin (SM) were purchased from Sigma (St Louis MO, USA).

Trifluoroethanol (TFE) was purchased from Sigma (St Louis). Octadecylrhodamine chloride B (R18), acid *N*-*N'*-*p*-xylylenbis (DPX) and 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) were from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). Hepes, Triton X-100 were from Sigma (St Louis MO, USA). NaCl was from Merck Eurolab (Leuven, Belgium).

Lipid-mixing buffer used for liposome preparation is 5 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM NaCl.

The nine to 14, 16 and 23 residue long gp41 fusion peptides from the BRU isolate were synthesized by conventional solid phase peptide synthesis, using Fmoc for transient NH_2 -terminal protection, and were characterized using mass spectrometry. These peptides have free N terminus and amidated C terminus. Peptide purity is more than 85%, as indicated by analytical HPLC. The 288–304 fragment of human ApoE peptide (EDMQRQ-WAGLVEKVVQAA) was synthesized by Epytop (Nîmes, France).

Liposome preparation

In vitro assays were performed with LUVs mimicking the composition of T-cell membrane:¹⁰² DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM 34/33/16/10/7 (Mol/Mol). Lipids were dissolved in a chloroform/methanol (2:1, v/v) solution. Lipid film was obtained after evaporation under vacuum obtained with a rotovapor (Van Der Heyden Büchi, Switzerland). The lipid film, dried for one night, was then dispersed in 2 ml of lipid-mixing buffer (see above) and was incubated for 1 h at 37°C .

To obtain LUVs, the hydrated lipid dispersion was exposed to five freeze-thaw cycles ($-180^\circ\text{C}/+25^\circ\text{C}$) and extruded ten times through a polycarbonate membrane ($0.1 \mu\text{m}$) under 20 bars pressure (Extruder Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada).

† <http://www.hiv.lanl.gov/>

Liposome concentration was determined by phosphorus analysis.¹⁰³

Lipid-mixing assays

Mixing of liposome membranes was followed by measuring the fluorescence increase of R18, a lipid-soluble probe, after the fusion of labelled and unlabelled liposomes. Labelled liposomes were obtained by incorporating R18 in the dry lipid film at a concentration 5% of the total lipid weight. Labelled and unlabelled liposomes were mixed at a weight ratio 1:4, respectively and a final concentration of 12.5 μ M in lipid-mixing buffer. The 100% of fusion is determined by adding Triton X-100 at 2% to labelled/unlabelled (1:4, w/w) LUVs. Fluorescence was recorded at room temperature (λ_{exc} , 560 nm; λ_{em} , 590 nm) on an LS-50B PerkinElmer fluorimeter. The pH value was fixed to 7.4.

Leakage assays

The HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid)/DPX (*p*-xylylenebis[pyridinium] bromide) assay of Ellens *et al.* was used to monitor vesicle leakage.¹⁰⁴ The assay is based on the quenching of HPTS by DPX. HPTS and DPX are encapsulated together in liposomes. Leakage of vesicles was followed by the dequenching of HPTS released into the medium. Fluorescence was recorded at room temperature (λ_{exc} , 360 nm; λ_{em} , 520 nm) on a LS-50B PerkinElmer fluorimeter.

Liposomes (LUVs) were prepared as described above in 12.5 mM HPTS (45 mM NaCl), 45 mM DPX (20 mM NaCl), 10 mM Hepes (pH 7.4) buffer. Vesicles containing encapsulated HPTS and DPX were eluted in the void volume of Sephadex G-75 column, with 10 mM Hepes buffer (pH 7.4).

For lipid-mixing and leakage experiments, assays were performed with LUVs that mimic the composition of the T-cell membrane (see liposome preparation) and were repeated three times with different batches of peptides. The peptide/lipid ratio varied from 0.04 to 0.8.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministère de la Région Wallonne contract no. 14540 (PROTMEM). The work of A.L. was supported by the National Fund for Scientific Research of Belgium (grant F.N.R.S.-Televie no. 7.4.527.05.F). The work of J.-M.C. was supported by a grant from the Funds for Industrial and Agricultural Research (FRIA). L.L. and R.B. thank the National Funds for Scientific Research (FNRS) of Belgium where they are Research Associate and Research Director, respectively. A.T. is Research Director at INSERM (France).

References

- Colman, P. M. & Lawrence, M. C. (2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 309–319.
- Eckert, D. M. & Kim, P. S. (2001). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 777–810.
- Gallo, S. A., Finnegan, C. M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S. S. *et al.* (2003). The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1614**, 36–50.
- Greenberg, M., Cammack, N., Salgo, M. & Smiley, L. (2004). HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev. Med. Virol.* **14**, 321–337.
- Jiang, S., Zhao, Q. & Debnath, A. K. (2002). Peptide and non-peptide HIV fusion inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 563–580.
- Root, M. J. & Steger, H. K. (2004). HIV-1 gp41 as a target for viral entry inhibition. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1805–1825.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1999). Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Mol. Membr. Biol.* **16**, 3–9.
- White, J. M. (1992). Membrane fusion. *Science*, **258**, 917–924.
- Buchsacher, G. L., Jr, Freed, E. O. & Panganiban, A. T. (1995). Effects of second-site mutations on dominant interference by a human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutant. *J. Virol.* **69**, 1344–1348.
- Delahunty, M. D., Rhee, I., Freed, E. O. & Bonifacino, J. S. (1996). Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology*, **218**, 94–102.
- Freed, E. O., Myers, D. J. & Risser, R. (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 4650–4654.
- Pritsker, M., Rucker, J., Hoffman, T. L., Doms, R. W. & Shai, Y. (1999). Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe11 in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes. *Biochemistry*, **38**, 11359–11371.
- Martin, I., Schaal, H., Scheid, A. & Ruyschaert, J. M. (1996). Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J. Virol.* **70**, 298–304.
- Mobley, P. W., Waring, A. J., Sherman, M. A. & Gordon, L. M. (1999). Membrane interactions of the synthetic N-terminal peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs. *Biochim. Biophys. Acta*, **1418**, 1–18.
- Nir, S. & Nieva, J. L. (2000). Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Prog. Lipid Res.* **39**, 181–206.
- Pereira, F. B., Goni, F. M., Muga, A. & Nieva, J. L. (1997). Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects. *Biophys. J.* **73**, 1977–1986.
- Pereira, F. B., Goni, F. M. & Nieva, J. L. (1997). Membrane fusion induced by the HIV type 1 fusion peptide: modulation by factors affecting glycoprotein 41 activity and potential anti-HIV compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **13**, 1203–1211.
- Rafalski, M., Lear, J. D. & DeGrado, W. F. (1990). Phospholipid interactions of synthetic peptides representing the N-terminus of HIV gp41. *Biochemistry*, **29**, 7917–7922.

19. Castano, S. & Desbat, B. (2005). Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multibi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1715**, 81–95.
20. Chang, D. K., Cheng, S. F. & Chien, W. J. (1997). The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate micelle primarily as a helix with a conserved glycine at the micelle–water interface. *J. Virol.* **71**, 6593–6602.
21. Schaal, H., Klein, M., Gehrman, P., Adams, O. & Scheid, A. (1995). Requirement of N-terminal amino acid residues of gp41 for human immunodeficiency virus type 1-mediated cell fusion. *J. Virol.* **69**, 3308–3314.
22. Curtain, C., Separovic, F., Nielsen, K., Craik, D., Zhong, Y. & Kirkpatrick, A. (1999). The interactions of the N-terminal fusogenic peptide of HIV-1 gp41 with neutral phospholipids. *Eur. Biophys. J.* **28**, 427–436.
23. Durell, S. R., Martin, I., Ruysschaert, J. M., Shai, Y. & Blumenthal, R. (1997). What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion (review). *Mol. Membr. Biol.* **14**, 97–112.
24. Epand, R. M. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, **1614**, 116–121.
25. Gordon, L. M., Mobley, P. W., Pilpa, R., Sherman, M. A. & Waring, A. J. (2002). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using ¹³C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1559**, 96–120.
26. Gordon, L. M., Mobley, P. W., Lee, W., Eskandari, S., Kaznessis, Y. N., Sherman, M. A. & Waring, A. J. (2004). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in lipid detergent and aqueous environments using ¹³C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Protein Sci.* **13**, 1012–1030.
27. Kamath, S. & Wong, T. C. (2002). Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain by molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* **83**, 135–143.
28. Morris, K. F., Gao, X. & Wong, T. C. (2004). The interactions of the HIV gp41 fusion peptides with zwitterionic membrane mimics determined by NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1667**, 67–81.
29. Nieva, J. L., Nir, S., Muga, A., Goni, F. M. & Wilschut, J. (1994). Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage. *Biochemistry*, **33**, 3201–3209.
30. Nieva, J. L. & Agirre, A. (2003). Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion? *Biochim. Biophys. Acta*, **1614**, 104–115.
31. Sackett, K. & Shai, Y. (2003). How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain. *J. Mol. Biol.* **333**, 47–58.
32. Sackett, K. & Shai, Y. (2005). The HIV fusion peptide adopts intermolecular parallel beta-sheet structure in membranes when stabilized by the adjacent N-terminal heptad repeat: a ¹³C FTIR study. *J. Mol. Biol.* **350**, 790–805.
33. Saez-Cirion, A. & Nieva, J. L. (2002). Conformational transitions of membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochim. Biophys. Acta*, **1564**, 57–65.
34. Waring, A. J., Mobley, P. W. & Gordon, L. M. (1998). Conformational mapping of a viral fusion peptide in structure-promoting solvents using circular dichroism and electrospray mass spectrometry. *Proteins: Struct. Funct. Genet. Suppl.* **2**, 38–49.
35. Wasniewski, C. M., Parkanzky, P. D., Bodner, M. L. & Weliky, D. P. (2004). Solid-state nuclear magnetic resonance studies of HIV and influenza fusion peptide orientations in membrane bilayers using stacked glass plate samples. *Chem. Phys. Lipids*, **132**, 89–100.
36. Yang, J., Parkanzky, P. D., Khunte, B. A., Canlas, C. G., Yang, R., Gabrys, C. M. & Weliky, D. P. (2001). Solid state NMR measurements of conformation and conformational distributions in the membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 129–135.
37. Yang, J., Gabrys, C. M. & Weliky, D. P. (2001). Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for an extended beta strand conformation of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochemistry*, **40**, 8126–8137.
38. Yang, J. & Weliky, D. P. (2003). Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for parallel and antiparallel strand arrangements in the membrane-associated HIV-1 fusion peptide. *Biochemistry*, **42**, 11879–11890.
39. Yang, R., Yang, J. & Weliky, D. P. (2003). Synthesis, enhanced fusogenicity, and solid state NMR measurements of cross-linked HIV-1 fusion peptides. *Biochemistry*, **42**, 3527–3535.
40. Yang, R., Prorok, M., Castellino, F. J. & Weliky, D. P. (2004). A trimeric HIV-1 fusion peptide construct which does not self-associate in aqueous solution and which has 15-fold higher membrane fusion rate. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14722–14723.
41. Gordon, L. M., Curtain, C. C., Zhong, Y. C., Kirkpatrick, A., Mobley, P. W. & Waring, A. J. (1992). The amino-terminal peptide of HIV-1 glycoprotein 41 interacts with human erythrocyte membranes: peptide conformation, orientation and aggregation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1139**, 257–274.
42. Jaroniec, C. P., Kaufman, J. D., Stahl, S. J., Viard, M., Blumenthal, R., Wingfield, P. T. & Bax, A. (2005). Structure and dynamics of micelle-associated human immunodeficiency virus gp41 fusion domain. *Biochemistry*, **44**, 16167–16180.
43. Peisajovich, S. G., Epand, R. F., Pritsker, M., Shai, Y. & Epand, R. M. (2000). The polar region consecutive to the HIV fusion peptide participates in membrane fusion. *Biochemistry*, **39**, 1826–1833.
44. Buzon, V., Padros, E. & Cladera, J. (2005). Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: a time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study. *Biochemistry*, **44**, 13354–13364.
45. Martin, I., Defrise-Quertain, F., Decroly, E., Vandenbranden, M., Brasseur, R. & Ruysschaert, J. M. (1993). Orientation and structure of the NH₂-terminal HIV-1 gp41 peptide in fused and aggregated liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1145**, 124–133.
46. Sackett, K. & Shai, Y. (2002). The HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat plays an essential role in membrane fusion. *Biochemistry*, **41**, 4678–4685.
47. Wexler-Cohen, Y., Sackett, K. & Shai, Y. (2005). The role of the N-terminal heptad repeat of HIV-1 in the

- actual lipid mixing step as revealed by its substitution with distant coiled coils. *Biochemistry*, **44**, 5853–5861.
48. Maddox, M. W. & Longo, M. L. (2002). Conformational partitioning of the fusion peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs in bilayer membranes. *Biophys. J.* **83**, 3088–3096.
 49. Wong, T. C. (2003). Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion peptide by molecular dynamics simulation. II. The glycine mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1609**, 45–54.
 50. Brasseur, R. (2000). Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis). *Mol. Membr. Biol.* **17**, 31–40.
 51. Lins, L., Charlotheaux, B., Thomas, A. & Brasseur, R. (2001). Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **44**, 435–447.
 52. Peuvot, J., Schanck, A., Lins, L. & Brasseur, R. (1999). Are the fusion processes involved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes? *J. Theor. Biol.* **198**, 173–181.
 53. Ducarme, P., Rahman, M. & Brasseur, R. (1998). IMPALA: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **30**, 357–371.
 54. Basyn, F., Charlotheaux, B., Thomas, A. & Brasseur, R. (2001). Prediction of membrane protein orientation in lipid bilayers: a theoretical approach. *J. Mol. Graph. Model.* **20**, 235–244.
 55. Basyn, F., Spies, B., Bouffieux, O., Thomas, A. & Brasseur, R. (2003). Insertion of X-ray structures of proteins in membranes. *J. Mol. Graph. Model.* **22**, 11–21.
 56. Adam, B., Lins, L., Stroobant, V., Thomas, A. & Brasseur, R. (2004). Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide. *J. Virol.* **78**, 2131–2136.
 57. Thomas, A., Allouche, M., Basyn, F., Brasseur, R. & Kerfelec, B. (2005). Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 40074–40083.
 58. Lins, L., Charlotheaux, B., Heinen, C., Thomas, A. & Brasseur, R. (2006). “De novo” design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophys. J.* **90**, 470–479.
 59. Pereira, F. B., Goni, F. M. & Nieva, J. L. (1995). Liposome destabilization induced by the HIV-1 fusion peptide effect of a single amino acid substitution. *FEBS Letters*, **362**, 243–246.
 60. Pereira, F. B., Valpuesta, J. M., Basanez, G., Goni, F. M. & Nieva, J. L. (1999). Interbilayer lipid mixing induced by the human immunodeficiency virus type-1 fusion peptide on large unilamellar vesicles: the nature of the nonlamellar intermediates. *Chem. Phys. Lipids*, **103**, 11–20.
 61. El Kirat, K., Lins, L., Brasseur, R. & Dufrene, Y. F. (2005). Fusogenic tilted peptides induce nanoscale holes in supported phosphatidylcholine bilayers. *Langmuir*, **21**, 3116–3121.
 62. Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. (1982). The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*, **299**, 371–374.
 63. Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. & Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125–142.
 64. Eisenberg, D., Weiss, R. M. & Terwilliger, T. C. (1984). The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **81**, 140–144.
 65. Callebaut, I., Labesse, G., Durand, P., Poupon, A., Canard, L., Chomilier, J. *et al.* (1997). Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): current status and perspectives. *Cell Mol. Life Sci.* **53**, 621–645.
 66. Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T. & Mornon, J. P. (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Letters*, **224**, 149–155.
 67. Lemesle-Varloot, L., Henrissat, B., Gaboriaud, C., Bissery, V., Morgat, A. & Mornon, J. P. (1990). Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie*, **72**, 555–574.
 68. Woodcock, S., Mornon, J. P. & Henrissat, B. (1992). Detection of secondary structure elements in proteins by hydrophobic cluster analysis. *Protein Eng.* **5**, 629–635.
 69. Brasseur, R., Lorge, P., Goormaghtigh, E., Ruysschaert, J. M., Espion, D. & Burny, A. (1988). The mode of insertion of the paramyxovirus F1 N-terminus into lipid matrix, an initial step in host cell/virus fusion. *Virus Genes*, **1**, 325–332.
 70. Horth, M., Lambrecht, B., Khim, M. C., Bex, F., Thiriart, C., Ruysschaert, J. M. *et al.* (1991). Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J.* **10**, 2747–2755.
 71. Martin, I., Dubois, M. C., Defrise-Quertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R. & Ruysschaert, J. M. (1994). Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH₂-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J. Virol.* **68**, 1139–1148.
 72. Voneche, V., Portetelle, D., Kettmann, R., Willems, L., Limbach, K., Paoletti, E. *et al.* (1992). Fusogenic segments of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **89**, 3810–3814.
 73. Bradshaw, J. P., Darkes, M. J., Harroun, T. A., Katsaras, J. & Epanand, R. M. (2000). Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffraction. *Biochemistry*, **39**, 6581–6585.
 74. Colotto, A., Martin, I., Ruysschaert, J. M., Sen, A., Hui, S. W. & Epanand, R. M. (1996). Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry*, **35**, 980–989.
 75. Luneberg, J., Martin, I., Nussler, F., Ruysschaert, J. M. & Herrmann, A. (1995). Structure and topology of the influenza virus fusion peptide in lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **270**, 27606–27614.
 76. Schanck, A., Peuvot, J. & Brasseur, R. (1998). Influence of the mode of insertion of SIV peptides into membranes on the structure of model membrane as studied by ³¹P NMR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250**, 12–14.
 77. Martin, I., Epanand, R. M. & Ruysschaert, J. M. (1998). Structural properties of the putative fusion peptide of fertilin, a protein active in sperm-egg fusion, upon interaction with the lipid bilayer. *Biochemistry*, **37**, 17030–17039.

78. Talmud, P., Lins, L. & Brasseur, R. (1996). Prediction of signal peptide functional properties: a study of the orientation and angle of insertion of yeast invertase mutants and human apolipoprotein B signal peptide variants. *Protein Eng.* **9**, 317–321.
79. Mingeot-Leclercq, M. P., Lins, L., Bensliman, M., Van Bambeke, F., Van Der, S. P., Peuvot, J. *et al.* (2002). Membrane destabilization induced by beta-amyloid peptide 29–42: importance of the amino-terminus. *Chem. Phys. Lipids*, **120**, 57–74.
80. Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talusnot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J. *et al.* (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **271**, 28757–28765.
81. Del Angel, V. D., Dupuis, F., Mornon, J. P. & Callebaut, I. (2002). Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1153–1160.
82. Tamm, L. K. & Han, X. (2000). Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes. *Biosci. Rep.* **20**, 501–518.
83. Galasko, D. (1998). Cerebrospinal fluid levels of A beta 42 and tau: potential markers of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* **53**, 209–221.
84. Gooch, M. D. & Stennett, D. J. (1996). Molecular basis of Alzheimer's disease. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **53**, 1545–1557.
85. Shoji, M. (2002). Cerebrospinal fluid Abeta40 and Abeta42: natural course and clinical usefulness. *Front. Biosci.* **7**, d997–d1006.
86. Fernandez, A. & Berry, R. S. (2003). Proteins with H-bond packing defects are highly interactive with lipid bilayers: implications for amyloidogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 2391–2396.
87. Soto, C. & Frangione, B. (1995). Two conformational states of amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters*, **186**, 115–118.
88. Ravault, S., Soubias, O., Saurel, O., Thomas, A., Brasseur, R. & Milon, A. (2005). Fusogenic Alzheimer's peptide fragment Abeta (29–42) in interaction with lipid bilayers: secondary structure, dynamics, and specific interaction with phosphatidyl ethanolamine polar heads as revealed by solid-state NMR. *Protein Sci.* **14**, 1181–1189.
89. Decaffmeyer, M., Lins, L., Charlotiaux, B., Vaneyck, M. H., Thomas, A. & Brasseur, R. (2006). Rational design of complementary peptides to the betaAmyloid 29–42 fusion peptide: an application of PepDesign. *Biochim. Biophys. Acta*, in the press.
90. Ugolini, S., Mondor, I. & Sattentau, Q. J. (1999). HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol.* **7**, 144–149.
91. Bernstein, H. B., Tucker, S. P., Kar, S. R., McPherson, S. A., McPherson, D. T., Dubay, J. W. *et al.* (1995). Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J. Virol.* **69**, 2745–2750.
92. Chen, S. S., Lee, S. F., Hao, H. J. & Chuang, C. K. (1998). Mutations in the leucine zipper-like heptad repeat sequence of human immunodeficiency virus type 1 gp41 dominantly interfere with wild-type virus infectivity. *J. Virol.* **72**, 4765–4774.
93. Dubay, J. W., Roberts, S. J., Brody, B. & Hunter, E. (1992). Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J. Virol.* **66**, 4748–4756.
94. Lu, M., Ji, H. & Shen, S. (1999). Subdomain folding and biological activity of the core structure from human immunodeficiency virus type 1 gp41: implications for viral membrane fusion. *J. Virol.* **73**, 4433–4438.
95. Pombourios, P., Wilson, K. A., Center, R. J., El Ahmar, W. & Kemp, B. E. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein oligomerization requires the gp41 amphipathic alpha-helical/leucine zipper-like sequence. *J. Virol.* **71**, 2041–2049.
96. Shugars, D. C., Wild, C. T., Greenwell, T. K. & Matthews, T. J. (1996). Biophysical characterization of recombinant proteins expressing the leucine zipper-like domain of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J. Virol.* **70**, 2982–2991.
97. Wild, C., Dubay, J. W., Greenwell, T., Baird, T., Jr, Oas, T. G., McDanal, C. *et al.* (1994). Propensity for a leucine zipper-like domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 to form oligomers correlates with a role in virus-induced fusion rather than assembly of the glycoprotein complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 12676–12680.
98. Han, X., Bushweller, J. H., Cafiso, D. S. & Tamm, L. K. (2001). Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nature Struct. Biol.* **8**, 715–720.
99. Creighton, T. E. (1997). In *Proteins: Structures and Molecular Properties, Library of Congress Cataloging-in-Publication Data* (Creighton, T. E., ed.), 2nd edit, p. 507, W. H. Freeman and Company, New York.
100. Lins, L., Ducarme, P., Breukink, E. & Brasseur, R. (1999). Computational study of nisin interaction with model membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **1420**, 111–120.
101. Vogt, B., Ducarme, P., Schinzel, S., Brasseur, R. & Bechinger, B. (2000). The topology of lysine-containing amphipathic peptides in bilayers by circular dichroism, solid-state NMR, and molecular modeling. *Biophys. J.* **79**, 2644–2656.
102. Aloia, R. C., Tian, H. & Jensen, F. C. (1993). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **90**, 5181–5185.
103. Barlett, G. R. (1959). Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids. *J. Biol. Chem.* **65**, 2146–2156.
104. Ellens, H., Bentz, J. & Szoka, F. C. (1985). H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry*, **24**, 3099–3106.

Edited by J. Karn

(Received 17 February 2006; accepted 3 April 2006)
Available online 25 April 2006

2. Détermination du peptide de fusion minimal de la gp30 du virus de la leucémie bovine.

2. Lorin, A., Lins, L., Stroobant, V., Brasseur, R. & Charlotiaux, B. (2007) Determination of the minimal fusion peptide of bovine leukemia virus gp30. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**, 649–653.

L'étude précédente a montré que le peptide de fusion minimal du HIV-1 a pu être déterminé en prédisant le plus petit peptide hélicoïdal avec une insertion membranaire oblique optimale. Dans cette étude, nous avons appliqué la même méthode pour prédire le peptide de fusion minimal du virus BLV. Dans ce cas, aucun modèle de la structure du peptide de fusion de la gp30 du BLV n'existe. La prédiction a donc été réalisée en modélisant les peptides en hélice α standard.

L'analyse IMPALA du peptide de fusion de 8 à 20 résidus prédit une orientation oblique optimale pour les peptides de 15 et 16 résidus (Figures 1 et 2A de l'article). Le peptide de 15 résidus serait donc le peptide de fusion minimal. Pour vérifier cette prédiction, des tests sur liposomes ont été réalisés. Les mesures de fusion de phase lipidique et de perméabilité *in vitro* indiquent que ce peptide induit autant de mélange lipidique (Figure 2B de l'article) et de perméabilité (Figure 2C de l'article) de liposomes que des peptides plus longs mais en induit plus que des peptides plus courts. Ce peptide est donc le peptide de fusion minimal de gp30. Ces résultats montrent également pour la première fois que le peptide de fusion synthétique de gp30 induit la déstabilisation et la fusion de membranes *in vitro*.

L'analyse *in silico* de mutations montre une corrélation entre la fusogénicité de gp30 et l'angle d'insertion du peptide de fusion de 16 résidus (Table 1 de l'article). Comme dans le cas du HIV-1, des mutations diminuant drastiquement la fusogénicité de gp30 rendent le peptide de fusion non oblique alors que des mutations ne modifiant pas significativement la fusogénicité de gp30 n'affectent pas l'orientation oblique du peptide de fusion. Les mesures *in vitro* montrent qu'un peptide mutant prédit comme adoptant un angle perpendiculaire n'induit pas de déstabilisation significative de liposomes alors qu'un peptide mutant adoptant un angle oblique induit la fusion et la perméabilisation de liposomes. Cette différence de fusogénicité n'est pas due à une différence de structure dans les membranes. En effet, les

- Résultats -

études FTIR indiquent que le peptide sauvage ainsi que les peptides mutants adoptent une structure similaire, majoritairement hélicoïdale (Figure 3 et Table 1 de l'article).

En résumé, les études sur les peptides de fusion des virus HIV-1 et BLV confirment la relation entre le peptide de fusion à adopter un angle oblique dans la membrane et la fusogénicité de ce peptide mais également la fusogénicité de la glycoprotéine entière. Elles montrent également que le peptide de fusion minimal d'un virus peut être prédit via la méthode mise au point lors de ce travail.

Determination of the minimal fusion peptide of bovine leukemia virus gp30

Aurélien Lorin ^a, Laurence Lins ^a, Vincent Stroobant ^b, Robert Brasseur ^{a,*},
Benoit Charlotteaux ^a

^a Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, 2 Passage des déportés, B-5030 Gembloux, Belgium

^b Ludwig Institute for Cancer Research—Brussels Branch, 74 Avenue Hippocrate, B-1200 Brussels, Belgium

Received 26 January 2007

Available online 8 February 2007

Abstract

In this study, we determined the minimal N-terminal fusion peptide of the gp30 of the bovine leukemia virus on the basis of the tilted peptide theory. We first used molecular modelling to predict that the gp30 minimal fusion peptide corresponds to the 15 first residues. Liposome lipid-mixing and leakage assays confirmed that the 15-residue long peptide induces fusion *in vitro* and that it is the shortest peptide inducing optimal fusion since longer peptides destabilize liposomes to the same extent but not shorter ones. The 15-residue long peptide can thus be considered as the minimal fusion peptide. The effect of mutations reported in the literature was also investigated. Interestingly, mutations related to glycoproteins unable to induce syncytia in cell–cell fusion assays correspond to peptides predicted as non-tilted. The relationship between obliquity and fusogenicity was also confirmed *in vitro* for one tilted and one non-tilted mutant peptide.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: BLV; Membrane fusion; Fusion peptide; Tilted peptide; Molecular modelling; HIV-1; Infrared spectroscopy; ATR-FTIR; Lipid-mixing; Leakage

The bovine leukemia virus (BLV) is a retrovirus resembling the Human T-cell lymphotropic virus (HTLV). Similarly to other retroviruses like HIV, the envelope of BLV contains a protein anchored in the membrane by its C-terminal domain. This protein, named gp30, is involved in the fusion process taking place during the early stages of target cell infection. Like for many other enveloped viruses, the N-terminal extremity of gp30 corresponds to a fusion peptide (FP) [1]. The implication of this region in the fusogenicity of the whole glycoprotein has been shown by mutagenesis [1]. To date, peptides equivalent to the gp30 FP were not shown to induce liposome fusion *in vitro*. Anyway, molecular modelling indicated that a helical peptide corresponding to the 12 N-terminal residues adopts a tilted orientation at a hydrophilic/hydrophobic interface [1].

A correlation between FP obliquity and gp30 fusogenicity was also shown. Mutations that suppress the tilt of the FP drastically decrease gp30 fusogenicity [1]. These observations were at the starting point of the “tilted peptide” theory [2–4]. According to this theory, tilted peptides are peptides that present a hydrophobicity gradient when they fold into an α -helix structure. Due to this gradient, they insert into a membrane with a tilted orientation that induces the destabilization of the phospholipid acyl chains and catalyses fusion.

Recently, we used molecular modelling simulations in the context of an implicit membrane model to predict successfully the minimal FP of HIV gp41 [4]. The minimal FP corresponds to the shortest peptide able to induce significant membrane fusion. It was predicted as the shortest peptide with an optimal tilted angle in the membrane. Here, we used the same strategy to predict the region of the BLV FP necessary and sufficient to induce optimal fusion. We searched for the shortest N-terminal peptide tilted into an

* Corresponding author. Fax: +32 81 62 25 22.

E-mail address: brasseur.r@fsagx.ac.be (R. Brasseur).

implicit membrane using the IMPALA algorithm. Liposome lipid-mixing and leakage assays were then carried out to check the validity of the prediction. Furthermore, IMPALA was used to evaluate the impact of the mutations reported in the literature [1] and to predict retrospectively their effect on fusogenicity. One functional and one defective mutant peptides were assayed for lipid-mixing and leakage of liposomes mimicking the B-cell membrane.

Materials and methods

Materials

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), cardiolipin (CL) from bovine heart, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), cholesterol (CHOL), and bovine brain sphingomyelin (SM) were purchased from Sigma (St. Louis MO, USA).

Trifluoroethanol (TFE) was purchased from Sigma (St. Louis MO, USA). Octadecylrhodamine chloride B (R18), *N,N'*-*p*-xylylenebis(pyridinium bromide) (DPX) and 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) came from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). Hepes, Triton X-100 came from Sigma (St. Louis MO, USA). NaCl came from Merck Eurolab (Leuven, Belgium).

The wild-type (WT) 12- to 16- and 21-residue long FPs, and the MU0 and MU4 mutant peptides were synthesized by conventional solid phase peptide synthesis, using Fmoc for transient NH₂-terminal protection, and

were characterized using mass spectrometry. These peptides have free N-termini and amidated C-termini. Peptide purity is more than 75%, as indicated by analytical HPLC.

In silico analysis

Peptide sequence and structure. The sequence of the FP corresponds to the American VDM isolate (SwissProt Accession Code: P25505). Peptides were constructed as α -helices using Hyperchem 6.0 (Hypercube Inc.) assigning phi/psi values of -58° and -47° that correspond to the classical α -helical structure [5]. Backbone and side chains conformation was then optimized with Hyperchem by a Polak–Ribiere conjugate gradient procedure using the AMBER force field. The termination conditions were fixed to a RMS gradient of 0.01 kcal/(Å mol).

Insertion of the peptides into membrane. The insertion of the peptides into an implicit bilayer was predicted using the IMPALA algorithm (Integral Membrane Protein and Lipid Association) developed by Ducarme et al. [6]. The parameters of the lipid bilayer and of the calculations were the same as previously [4]. The position of the structure with the lowest energy is the most stable in the bilayer. Calculations were repeated three times for each peptide. All repeats gave similar results.

In vitro analysis

Liposome preparation. DOPC/DOPE/CHOL/SM/CL (34/27/20/13/6 m/m) LUVs were prepared as described previously [4] to mimic B-cell composition [7]. LUVs used in lipid-mixing experiments were prepared in 5 mM Hepes and 100 mM NaCl at pH 7.4. LUVs used in leakage

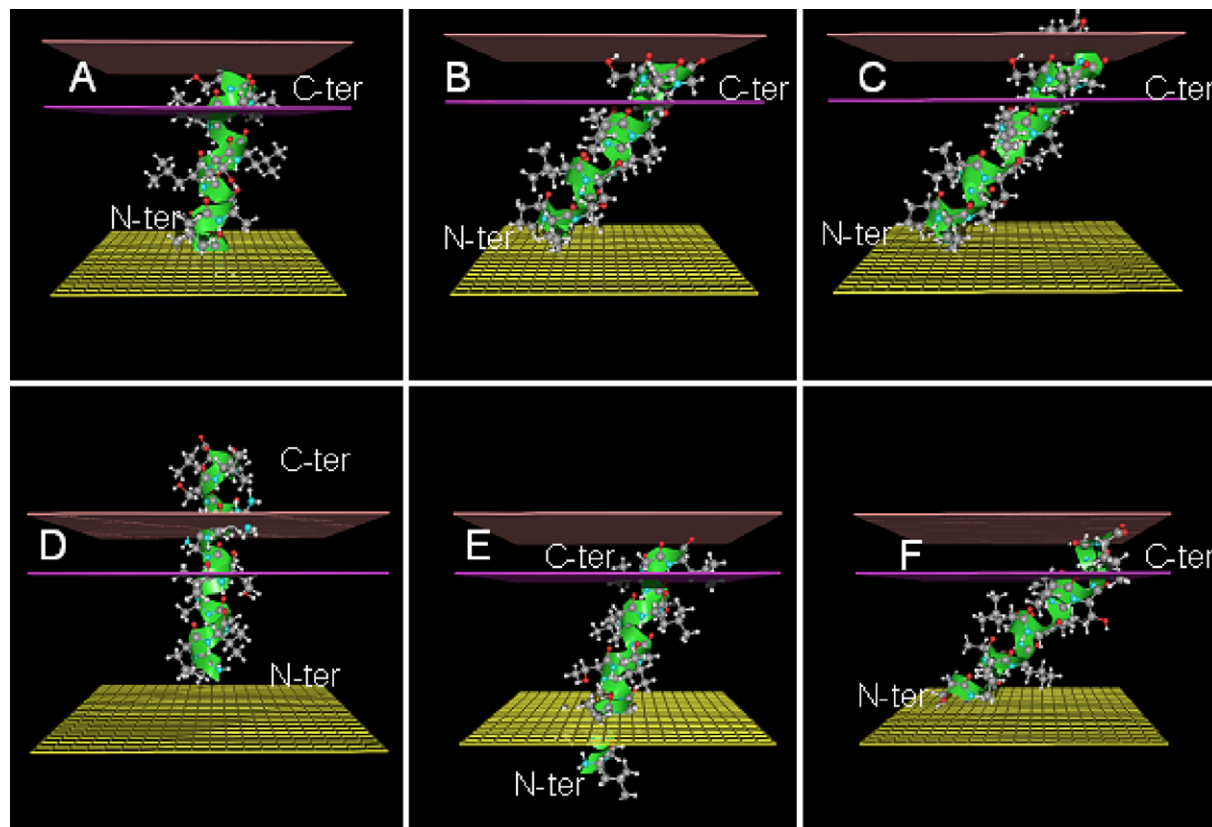


Fig. 1. Best position in the IMPALA membrane for (A) 13-residue FP, (B) 15-residue FP, (C) 16-residue FP, (D) 16-residue peptide MU0 mutant, (E) 16-residue peptide MU1 mutant, (F) 16-residue peptide MU4 mutant. N- and C-terminal extremities are indicated. Only one layer of the membrane is represented. Bottom plane (yellow), bilayer centre; first upper plane (mauve), lipid chain/polar headgroups interface at 13.5 Å from the centre; second upper plane (pink), lipid/water interface at 18 Å from the centre. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

experiments were prepared in 12.5 mM HPTS (45 mM NaCl), 45 mM DPX (20 mM NaCl), 10 mM Hepes buffer at pH 7.4. Phospholipid concentration was determined by phosphorus analysis [8].

Lipid-mixing and leakage experiments. Lipid-mixing and leakage of LUVs were measured as described previously [4]. The buffer used for LUVs dilution was 5 mM Hepes and 100 mM NaCl at pH 7.4. Fluorescence was recorded at room temperature on a LS-50B Perkin-Elmer fluorimeter with a $\lambda_{exc} = 560$ nm and $\lambda_{em} = 590$ nm for lipid-mixing experiments, and a $\lambda_{exc} = 450$ nm and $\lambda_{em} = 512$ nm for leakage experiments. The assays were repeated three times with different batches of peptide.

Infrared spectroscopy. Spectra were recorded at room temperature on a Brüker Equinox 55 equipped with a liquid nitrogen-cooled mercury–cadmium–telluride (MCT) detector at a resolution of 2 cm^{-1} , by averaging 512 scans. Samples were obtained as described [9]. Briefly, DOPC with peptide (peptide/lipid ratio = 1/50) was deposited onto a Germanium plate where the solvents were allowed to evaporate under a nitrogen flux. The plate was sealed in an universal sample holder and rehydrated by flushing the holder with N_2 saturated with D_2O for 3 h at room temperature. The secondary structure determination was carried out as described previously [10].

Results

In silico prediction of the gp30 minimal FP

To predict the minimal FP, we searched for the shortest peptide that inserts into the membrane with an optimal tilted orientation (around 45°). N-terminal helical peptides with a length from 8 to 21 residues were analyzed with IMPALA. All peptides insert into the implicit membrane with the N-terminus in the membrane hydrophobic core, and the C-terminus around the lipid headgroups or in water (Fig. 1). The insertion angle is between 45° and 75° with respect to the membrane plane (Fig. 2A). The 15- and 16-residue long peptides are similarly inserted with an angle close to the optimal tilted angle (48° and 47° , respectively). The 15-residue long peptide is thus the minimal FP predicted.

In vitro validation of the gp30 minimal FP

Lipid-mixing and leakage assays with liposomes mimicking the composition of the B-cell membrane were used to check the prediction. Peptides of 12, 13, 14, 15, 16, and 21 residues were tested. The 15-residue long peptide induces lipid-mixing and leakage to the same extent than the 16- and than the 21-residue long peptides (Figs. 2B and C). Lipid-mixing and leakage induced by these three peptides are dose-dependent (data not shown) and reach a maximum of 45% of lipid-mixing and 80% of leakage at a peptide/lipid ratio of 0.8. Peptides shorter than 15 residues induce significantly less membrane destabilization. The 12- and 13-residue long peptides do not induce lipid-mixing nor leakage, whereas the 14-residue long peptide induces 20% of leakage and no significant lipid-mixing (Figs. 2B and C). Hence, the 15-residue long FP is the minimal FP because it is the shortest one that induces optimal membrane destabilization. The 16-residue long peptide has very similar properties.

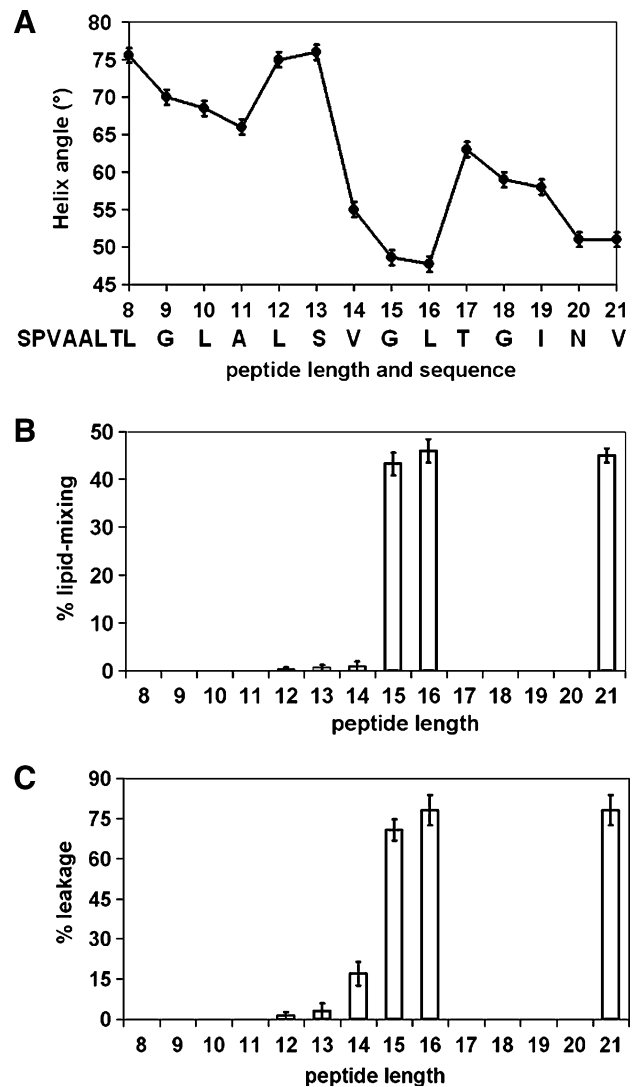


Fig. 2. (A) Optimal angle with respect to the membrane surface predicted by IMPALA for N-terminal FPs of different length. (B) Percentage of lipid-mixing of LUVs mimicking B-cell membrane induced by FPs of different length at a peptide/lipid ratio of 0.8. (C) Percentage of leakage of LUVs mimicking B-cell membrane induced by FPs of different length at a peptide/lipid ratio of 0.8.

In order to investigate the structure of the 15-residue long peptide in bilayers, we used infrared spectroscopy. The 15-residue long peptide adopts mainly a helical structure in lipid bilayers, characterized by a major peak at 1658 cm^{-1} (Fig. 3A). Estimation of the secondary structure by Fourier self-deconvolution and curve fitting confirmed the predominance of α -helix structure (46% α ; 22% β ; 7% coil; 25% turn). In the simulations, FPs were folded as α -helices. This is in accordance with infrared measurements.

In silico analysis of mutant FPs

Vonèche et al. have previously analyzed the effect of mutations of the N-terminal domain of gp30 on the fusogenicity of the whole glycoprotein in cell–cell fusion assays

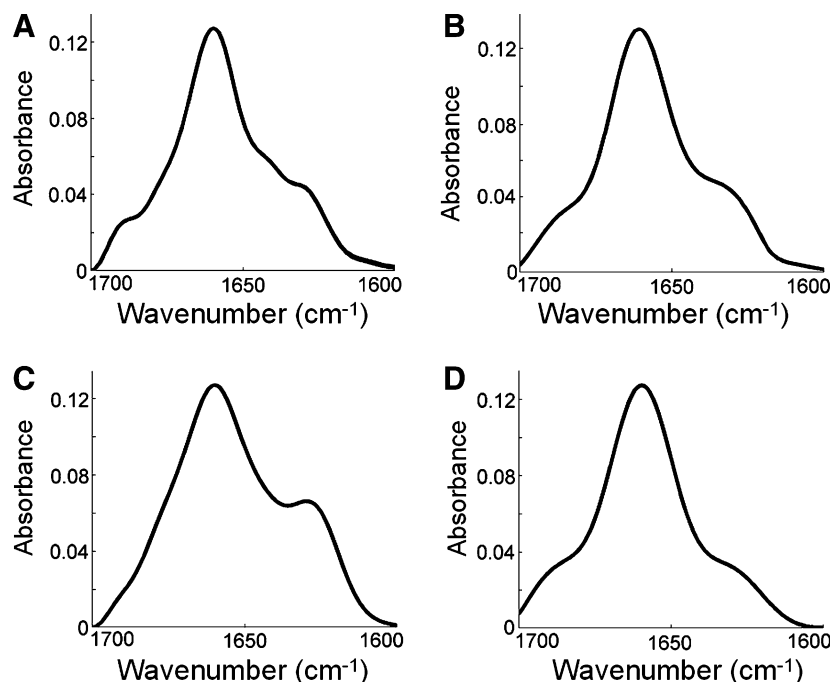


Fig. 3. Infrared spectra of 15-residue FP (A), 16-residue FP (B), MU0 (C), MU4 (D) in presence of DOPC. Only the amide I band ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) is shown.

[1]. Sixteen-residue long FP's containing these mutations were analyzed with IMPALA (Table 1 and Fig. 1). MU0, MU1, MU2, and MU3 mutants adopt a perpendicular orientation whereas the MU4 mutant remains tilted. Unlike the other perpendicular mutants, the C-terminal domain of the MU0 mutant does not penetrate into the membrane (Fig. 1D). Interestingly, the perpendicular mutants correspond to glycoproteins with low fusogenicity whereas the WT and tilted MU4 correlate to highly fusogenic glycoproteins (Table 1).

In vitro analysis of mutant FPs

Fusogenicity of 16-residue long peptides corresponding to MU0 and MU4 mutants was tested in lipid-mixing and leakage assays (Table 1). MU0 peptide does not induce significant lipid-mixing nor leakage of liposomes whatever the peptide/lipid ratio (data not shown). MU4 peptide

induces fusion of liposomes, in a dose dependent fashion (data not shown). The maximum of fusion is observed at a peptide/lipid ratio of 0.8 and corresponds to 33% of liposome lipid-mixing and 59% of liposome leakage (Table 1). This activity is lower than that of the wild-type, which is slightly more tilted.

The secondary structures of 16-residue long WT and mutant peptides were determined by infrared spectroscopy (Figs. 3B–D). Infrared spectra of the three peptides contain a major peak around 1658 cm^{-1} . Estimation of the secondary structure confirmed that they are mainly helical (Table 1). The secondary structure of the two mutants peptides is thus highly similar to that of the WT peptide.

Discussion

The present study combines molecular modelling simulations and biophysical approaches to study the membrane

Table 1
IMPALA and experimental analyses of 16-residue FP with mutations described in the literature [1]

Sequence	Syncytia* (%)	Angle** (°)	Lipid-mixing***	Leakage***	Secondary structures (+/–5%) in DOPC			
					α (%)	β (%)	Coil (%)	Turn (%)
WT SPVAALTLGLALSVGL	100	48	46% (+/–3)	78% (+/–5)	44	22	8	26
MU0 SPVAALTLGRDRSVGL	17	79	2% (+/–2)	5% (+/–4)	41	29	6	24
MU1 <u>L</u> PV <u>L</u> ALTLGLALSVGL	15	70	—	—	—	—	—	—
MU2 <u>L</u> PV <u>L</u> ALTLGLALSVGL	23	70	—	—	—	—	—	—
MU3 SPV <u>L</u> AL <u>S</u> LGLALSVGL	18	68	—	—	—	—	—	—
MU4 SPV <u>L</u> <u>L</u> <u>S</u> LGLALSVGL	86	51	33% (+/–3)	59% (+/–3)	48	20	7	25

Underlined residues = mutated residues.

* Corresponds to the percentage of syncytial number induced by whole gp30 (WT gp30 arbitrarily at 100%) [1].

** Angle with respect to the membrane surface determined from IMPALA simulation.

*** At a peptide/lipid ratio of 0.8.

activity of gp30 FPs of different lengths. As stated by the tilted peptide theory, the lipid destabilizing activity of a helical peptide is related to its tilted orientation [2,10]. The IMPALA results show that the 12- and 13-residue long peptides are not tilted in the membrane. Fluorescence measurements confirm that these peptides do not destabilize membranes. On the opposite, the 14-, 15-, 16-, and 21-residue long peptides are tilted and induce membrane destabilization. The 15- and 16-residue long peptides adopt an angle close to 45°. They both destabilize liposomal membranes to the same extent than the 21-residue long peptide, and more than shorter peptides. The 15-residue long peptide is thus the minimal FP, i.e. the shortest peptide with optimal fusogenicity. This is consistent with previous results reviewed in [2], the more tilted the peptide is, the more important the destabilization of phospholipids is.

IMPALA was also used to study mutations known to alter gp30 fusogenicity in cell–cell fusion assays [1]. Mutations that greatly decrease the gp30 fusogenicity suppress the tilt of the peptide in the membrane whereas the mutations that conserve gp30 fusogenicity maintain the tilt. Fusogenicity of tilted versus non-tilted mutants was also confirmed in liposome lipid-mixing and leakage assays. Hence, there is a relationship between the oblique orientation of the peptide in the membrane, the membrane-destabilizing properties of this peptide and the fusogenicity of the glycoprotein.

Recently, we used IMPALA and the tilted peptide theory to predict successfully the minimal FP of HIV gp41 [4]. Here, the same strategy was used to define the region of BLV gp30 necessary and sufficient to induce an optimal fusion. Together, these works strongly suggest that the tilted peptide theory can be used to determine the minimal peptide of other viral fusion proteins. Indeed, the sequences of the N-terminal extremity of many other viral fusion proteins present highly similar properties [11]. Moreover, experimental and molecular modelling analyses showed that the FPs of the fusion protein of SIV [12,13], of Influenza A [14,15], of NDV [2,16,17], of MuLV [17], of Hepatitis B virus [2,17], of Sendai virus [17] and of Ebola [15,17,18] are tilted peptides.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministère de la Région Wallonne contract No. 14540 (PROTMEM) and contract No. 215140 (α BUSTEC). The work of A. Lorin was supported by the National Fund for Scientific Research of Belgium (Grant FNRS-Televie No. 7.4.527.05.F). R. Brasseur and L. Lins are Research Director and Research Associate at the National Funds for Scientific Research (FNRS) of Belgium, respectively. The work of B. Charlotiaux was supported by the Interuniversity Poles of Attraction Programme—Belgian State, Prime Minister's Office—Federal

Office for Scientific, Technical and Cultural Affairs (PAI contract Phase 6).

References

- [1] V. Voneche, D. Portelle, R. Kettmann, L. Willems, K. Limbach, E. Paoletti, J.M. Ruyschaert, A. Burny, R. Brasseur, Fusogenic segments of bovine leukemia-virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target-cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 3810–3814.
- [2] R. Brasseur, Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis), *Mol. Membr. Biol.* 17 (2000) 31–40.
- [3] A. Thomas, R. Brasseur, Tilted peptides: the history, *Curr. Protein Pept. Sci.* 7 (2006) 523–527.
- [4] B. Charlotiaux, A. Lorin, J.M. Crowet, V. Stroobant, L. Lins, A. Thomas, R. Brasseur, The N-terminal 12 residue long peptide of HIV gp41 is the minimal peptide sufficient to induce significant T-cell-like membrane destabilization in vitro, *J. Mol. Biol.* 359 (2006) 597–609.
- [5] T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, second ed., W.H. Freeman Inc., New York, 1993.
- [6] P. Ducarme, M. Rahman, R. Brasseur, IMPALA: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies, *Proteins* 30 (1998) 357–371.
- [7] R. Wubbolts, R.S. Leckie, P.T.M. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Mobius, J. Hoernschemeyer, J.W. Slot, H.J. Geuze, W. Stoorvogel, Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes—potential implications for their function and multivesicular body formation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10963–10972.
- [8] R.J. Mrsny, J.J. Volwerk, O.H. Griffith, A simplified procedure for lipid phosphorus analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure, *Chem. Phys. Lipids* 39 (1986) 185–191.
- [9] E. Gazit, I.R. Miller, P.C. Biggin, M.S.P. Sansom, Y. Shai, Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes, *J. Mol. Biol.* 258 (1996) 860–870.
- [10] A. Lorin, A. Thomas, V. Stroobant, R. Brasseur, L. Lins, Lipid-destabilising properties of a peptide with structural plasticity, *Chem. Phys. Lipids* 141 (2006) 185–196.
- [11] V.D. Del Angel, F. Dupuis, J.P. Mornon, I. Callebaut, Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 1153–1160.
- [12] J.P. Bradshaw, M.J.M. Darkes, T.A. Harroun, J. Katsaras, R.M. Eppard, Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffraction, *Biochemistry* 39 (2000) 6581–6585.
- [13] I. Martin, M.C. Dubois, F. Defrisequentain, T. Saermark, A. Burny, R. Brasseur, J.M. Ruyschaert, Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the N-terminal extremity of simian immunodeficiency virus Gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer—an infrared-spectroscopy study, *J. Virol.* 68 (1994) 1139–1148.
- [14] L.K. Tamm, X. Han, Y.L. Li, A.L. Lai, Structure and function of membrane fusion peptides, *Biopolymers* 66 (2002) 249–260.
- [15] J. Peuvot, A. Schanck, L. Lins, R. Brasseur, Are the fusion processes involved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes? *J. Theor. Biol.* 198 (1999) 173–181.
- [16] R. Brasseur, Differentiation of lipid-associating helices by use of 3-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 16120–16127.
- [17] L. Lins, B. Charlotiaux, A. Thomas, R. Brasseur, Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides, *Proteins* 44 (2001) 435–447.
- [18] B. Adam, L. Lins, V. Stroobant, A. Thomas, R. Brasseur, Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide, *J. Virol.* 78 (2004) 2131–2136.

3. Propriétés déstabilisatrices d'un peptide présentant une plasticité structurale.

3. Lorin, A., Thomas, A., Stroobant, V., Brasseur, R. & Lins, L. (2006) Lipid-destabilising properties of a peptide with structural plasticity. *Chemistry and Physics of Lipids* **141**, 185–196

Les études précédentes ont confirmé la corrélation entre la capacité des peptides obliques, dont font partie les peptides de fusion du HIV-1 et du BLV, à s'orienter obliquement dans les membranes et leur capacité à induire la fusion. Il a été suggéré que la labilité structurale de ces peptides intervient également dans leur propriété fusogène (cf. chapitres 3.3. p.24 et 5.2. p.34). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé les propriétés membranaires et fusogènes d'un peptide avec une flexibilité structurale : le peptide caméléon. Ce peptide *de novo* adopte selon sa position dans la protéine GB1 une structure α ou β (Minor et Kim, 1996).

L'analyse de la séquence du peptide caméléon montre que ce peptide est compris dans la fourchette d'hydrophobicité des peptides obliques. De plus, les analyses HCA, Jähnig et MHP indiquent que sous conformation hélicoïdale, ce peptide présente un gradient hydrophobe le long de son axe (Figures 1 et 2 de l'article). Sous conformation β , aucun gradient n'est, par contre, observé (Figure 2 de l'article). L'analyse par spectroscopie FTIR montre que le peptide caméléon adopte une structure majoritairement β dans le DMSO et le TFE alors que dans les membranes, il adopte une structure majoritairement en hélice α (Figure 3 et Table 3 de l'article). La plasticité structurale de ce peptide est donc confirmée. Ces résultats montrent également que la proportion en hélice α de ce peptide est majoritaire lorsqu'il est en présence de lipides, comme cela a précédemment été mesuré pour certains peptides de fusion et peptides obliques (Martin et al., 1994, 1996, 1999 ; Pillot et al., 1997 ; Rodriguez-Crespo et al., 1999). L'algorithme IMPALA prédit que le peptide caméléon s'insère dans la membrane sous forme majoritairement hélicoïdale avec un angle de 56° entre la normale à la membrane et l'axe de l'hélice (Figure 2 de l'article). L'analyse ATR-FTIR du peptide caméléon dans les bicouches de liposomes confirme l'insertion oblique du peptide ($50^\circ \pm 10^\circ$; Table 4 de l'article). Enfin, les mesures de fusion de phase lipidique ainsi que

- Résultats -

de la perméabilité de liposomes montrent que ce peptide déstabilise les membranes (Figures 4, 5, 6 et Table 5 de l'article).

Tous ces résultats montrent donc que le peptide caméléon est un peptide oblique et induit la fusion de liposomes. Cette étude renforce donc l'hypothèse d'une relation entre la fusogénicité d'un peptide et sa labilité structurale. Cette labilité structurale serait nécessaire à certains peptides pour adopter, en interaction avec les membranes, une structure hélicoïdale avec un caractère fusogène.

Lipid-destabilising properties of a peptide with structural plasticity

A. Lorin^a, A. Thomas^a, V. Stroobant^b, R. Brasseur^{a,*}, L. Lins^a

^a *Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, B-5030 Gembloux, Belgium*

^b *Unité de Pharmacologie, Cellulaire et Moléculaire, Université Catholique de Louvain, Avenue E. Mounier, 73, Bt 7370, B-1200 Brussels, Belgium*

Received 22 December 2005; accepted 20 February 2006

Available online 23 March 2006

Abstract

The Chameleon peptide (Cham) is a peptide designed from two regions of the GB1 protein, one folded as an α -helix and the other as a β structure. Depending on the environment, the Cham peptide adopts an α or a β conformation when inserted in different locations of GB1. This environment dependence is also observed for tilted peptides. These short protein fragments, able to destabilise organised system, are mainly folded in β structure in water and in α helix in a hydrophobic environment, like the lipid bilayer. In this paper, we tested whether the Cham peptide can be qualified as a tilted peptide. For this, we have compared the properties of Cham peptide (hydrophobicity, destabilising properties, conformation) to those of tilted peptides. The results suggest that Cham is a tilted peptide. Our study, together the presence of tilted fragments in transconformational proteins, suggests a relationship between tilted peptides and structural lability.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Hydrophobicity; Lipid fusion/molecular modelling; Structural lability; Tilted peptide

1. Introduction

Tilted peptides are short protein fragments able to induce lipid fusion, with lengths ranging from 11 to 18 residues (Brasseur, 2000). The first tilted peptide was discovered in the fusion protein of the newcastle disease virus (Brasseur et al., 1988). It was suggested that this protein fragment is involved in the fusion process of the virus. Since then, many other tilted peptides have been evidenced in viral fusion proteins (Martin et al., 1991, 1993, 1994; Horth et al., 1991; Voneche et al., 1992; Rahman and Brasseur, 1994; Peuvot et al., 1999; Han et al., 2001; Adam et al., 2004). Their implication

in the fusion process has been confirmed by deletion and mutation studies on the whole fusion protein and by in vitro tests with the sole peptide (Lear and Degrado, 1987; Takahashi, 1990; Horth et al., 1991; Voneche et al., 1992; Martin et al., 1994, 1996; Qiao et al., 1999; Cladera et al., 1999). Tilted peptides have also been discovered in other proteins and seem play an important role in the protein function by the destabilisation of the hydrophobic/hydrophilic interface of the target. They are notably present in signal sequences (implicated in the membrane destabilisation to allow protein secretion), in lipid transport proteins (involved in the destabilisation of the hydrophobic core of lipid complexes), in lipolytic enzymes (destabilises acyl chains, enabling the transfer of lipids into the active site of enzyme), in neurotoxic proteins (have a neurotoxic effect on cells)... (Vantilbeurgh et al., 1994; Talmud et al., 1996; Pillot et al., 1996, 1997; Peelman et al., 1997; Brasseur et

* Corresponding author. Tel.: +32 81 62 25 21;

fax: +32 81 62 25 22.

E-mail address: brasseur.a@fsagx.ac.be (R. Brasseur).

al., 1997; Lambert et al., 1998; Brasseur, 2000). All tilted peptides tested induce the fusion of membranes *in vitro* (Primakoff et al., 1987; Pillot et al., 1996, 1997; Lambert et al., 1998; Perez-Mendez et al., 1998; Lins et al., 2002; Mingeot-Leclercq et al., 2003; Adam et al., 2004).

Tilted peptides are hydrophobic (Brasseur et al., 1997; Brasseur, 2000; Lins et al., 2002). When helical, they present an asymmetric gradient of hydrophobicity along their axis (Brasseur, 1991, 2000; Decout et al., 1999). When β -folded, no hydrophobic asymmetry is observed (Brasseur, 2000). As indicated by their name, the main feature of tilted peptides in helical conformation is their oblique orientation at a hydrophobic/hydrophilic interface (Brasseur, 1991; Brasseur et al., 1997; Gordon et al., 2002). This orientation is due to the hydrophobicity gradient, the most hydrophobic extremity being localised in the hydrophobic phase. Tiltedness has been confirmed by neutron diffraction, nuclear magnetic resonance (NMR) and attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) experiments (Bradshaw et al., 2000; Han et al., 2001; Gordon et al., 2002). This peculiar insertion is thought to disrupt a hydrophobic/hydrophilic interface. In the case of the membrane, this oblique insertion destabilises the parallelism of the phospholipid acyl chains and induces lipid fusion and permeability of membranes (Horth et al., 1991; Voneche et al., 1992; Cladera et al., 1999; El Kirat et al., 2005).

Another property of tilted peptides is that they adopt different conformations according to their environment (Wharton et al., 1988; Takahashi, 1990; Martin et al., 1991, 1994; Gallaher et al., 1992; Nieva et al., 1994; Saez-Cirion and Nieva, 2002). In a polar solvent, they mainly adopt a coil or β -sheet structure whereas in the presence of a hydrophobic/hydrophilic interface, they adopt a α -helical conformation (Martin et al., 1991, 1999).

This structural lability is also observed for other peptides described in literature. One of them is the Chameleon peptide (Cham). This fragment, designed by Minor and Kim (1996) is able to adopt an α or a β structure according its environment in a same protein. The Cham peptide is a combination of two fragments of the GB1 protein: the 23–33 sequence and the 42–52 sequence. The GB1 protein is a small compact protein, which contains four β strands and one α helix. The 23–33 sequence (AATAEKVFKQY) is helical while the 42–52 sequence (AWTYDDATKTF) adopts a β conformation. The sequence of Cham (AWTVEKAFKTF) was constructed in such a way as to preserve the hydrophobic residues located at the hydrophobic core/protein surface

interface. The Chameleon peptide adopts an α structure when inserted at position 23–33 of the GB1 and a β structure when at 42–52 (Minor and Kim, 1996). Mihara et al. (1998) have also confirmed that the secondary structure of the Cham peptide depends on its environment.

In this paper, we test whether the Cham peptide, described as a structurally labile fragment like tilted peptides, shares their other properties, notably lipid fusion, and hence can be qualified as “tilted”.

2. Material and methods

2.1. Material

Egg phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) were purchased from lipid products (Redhill, Surrey, UK). Egg phosphatidylcholine (PC), egg phosphatidylglycerol (PG) were obtained from Sigma (St. Louis MO, USA).

Trifluoroethanol (TFE), deuterium oxide (D_2O) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma (St. Louis). Octadecylrhodamine chloride B (R18), *N-N'*-*p*-xylenebis(pyridinium bromide) (DPX) and 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) come from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

The Chameleon peptide (AWTVEKAFKTF) was synthesised by conventional solid phase peptide synthesis, using Fmoc for transient NH_2 -terminal protection, and was characterised using mass spectrometry. Cham peptide purity is higher than 75% and Simian immunodeficiency virus (SIV) peptide (GVFVLGFLGFLA) purity is higher than 85%.

Lipid-mixing buffers:

- Tris pH 7.4: 10 mM Tris–HCl (Sigma St. Louis, USA), 150 mM NaCl (Merck Eurolab, Leuven, Belgium), 0.5% EDTA (Merck KgaA, Darmsatdt, Germany) and 1 mM NaN_3 (Sigma St. Louis, USA).
- Acetate pH 6: 1 mM NaN_3 , 10 mM sodium acetate (Merck KgaA, Darmstadt, Germany), 0.01% EDTA and 150 mM NaCl.
- Acetate pH 4: 10 mM sodium acetate and 57 mM acetic acid (Sigma St. Louis, USA).

2.2. Methods

2.2.1. Sequence analysis

2.2.1.1. *The hydrophobic cluster analysis (HCA)*. This method is based on the analysis of the shape and position of hydrophobic clusters in a given protein sequence (Gaboriaud et al., 1987). Schematically, the sequence

is coiled around a cylinder, simulating an α -helix. The cylinder is then cut along the axis, projected on a plane and finally duplicated to restore the environment of each amino acid. Hydrophobic residues are blackened. Some residues such as alanine are considered as having peculiar properties. Due to its amphipathic property, alanine is only considered as hydrophobic when at least three hydrophobic residues surround it. This method enables to detect secondary structure patterns (Gaboriaud et al., 1987; Brasseur, 2000).

2.2.1.2. The Jähnig profile. The Jähnig profile allows the detection of amphipathic patterns in a sequence (Jähnig, 1990). The mean hydrophobicity is calculated by moving a 17-residue window along the sequence, attributing the value to the central residue. The equation is as follows:

$$\langle H\alpha(i) \rangle = \frac{h(i \pm 8) + h(i \pm 7) + \frac{1}{4}h(i \pm 5) + h(i \pm 4) + \frac{3}{4}h(i \pm 3) + \frac{1}{2}h(i \pm 1) + h(i)}{10}$$

2.2.1.3. 3D construction of peptide by the stereoalphabet method. In order to explore a huge number of backbone conformations for Cham peptide, we used the stereoalphabet method (Lins et al., 1995). In this method, all the combinatory possibilities of six $\phi\psi$ angle couples are tested using the stereoalphabet code described in Table 1. These couples correspond to minimal energy states on the Van der Waals and electrostatic maps of an alanine ' $C_{i-1}^a - C_{i+1}^a$ ' unit. For each combinatory conformation, the energy of the corresponding structure was computed. For the Cham peptide which contains 11 residues, 6^{11} conformational energies are computed. The 20 structures exhibiting the lowest energy were kept as the most probable and undergo a subsequent energy minimisation by a Simplex procedure (Nelder and Mead, 1965) before the insertion in a modelled membrane using the IMPALA algorithm.

Table 1
Code of six $\phi\psi$ couples of angles used in the Stereoalphabet procedure

ϕ	ψ	Letter
-60	-40	a
-160	160	b
-140	80	c
-80	160	d
-50	-30	e
60	40	g

(a) Right-handed α -helix, (b) β -strand, (c) intermediary structure between β -strand and 2–10 helix, (d) helix of the polyproline or collagen type, (e) 3–10 helix, and (g) left-handed α -helix.

2.2.1.4. The IMPALA method. We inserted peptides into an implicit bilayer using the IMPALA method (Integral Membrane Protein and Lipid Association) developed by Ducarme et al. (1998). It simulates the insertion of any molecule (protein, peptide or drug) into a bilayer by adding energy restraint functions to the usual energy description of molecules

$$C(z) = 1 - \frac{1}{1 + e^{\alpha(z-z_0)}}$$

where z is perpendicular to the membrane and has its origin at the centre of the bilayer. α and z_0 are fixed parameters in such a way that $C(|z| \geq 18 \text{ \AA}) = 1$ and $C(|z| \leq 13.5 \text{ \AA}) = 0$. The value of the function is approximately constant from $-\infty$ to -18 \AA (hydrophilic phase), from -13.5 to 13.5 \AA (hydrophobic core), and from 18 \AA to ∞ (hydrophilic phase).

Two energetic terms simulate the interaction between the peptide and the bilayer. The first term accounts for the effect that pushes hydrophobic atoms into the membrane (hydrophobic restraint)

$$E_{\text{int}} = - \sum_{i=1}^N S_{(i)} E_{\text{tr}(i)} C_{(z_i)}$$

where N is the total number of atoms, $S_{(i)}$ the solvent accessible surface of atom i , $E_{\text{tr}(i)}$ its transfer energy by unit of accessible surface area and $C_{(z_i)}$ the value of $C_{(z)}$ at the position z_i of the atom i .

The perturbation of the bilayer due to the insertion of the molecule is simulated by the lipid perturbation restraint (E_{lip})

$$E_{\text{lip}} = a_{\text{lip}} \sum_{i=1}^N S_{(i)} (1 - C_{(z_i)})$$

where a_{lip} is an empirical factor fixed to 0.018 (Ducarme et al., 1998).

The interaction of peptides with the bilayer is analysed by a Monte Carlo (MC) simulation of 1,000,000 steps at 298 K. Calculations are repeated 10 times. The position of the structure with the lowest restraint values is considered as the most stable in the bilayer. No modification of the peptide structure is allowed, so that the Coulomb, Van der Waals, and torsion energies are considered as constants. Three freedom degrees are tested (two rotations and one translation along the z -axis). Maximal rotations of 2° and translations of 1 \AA are allowed per step.

2.2.2. Molecular hydrophobicity potential (MHP) calculations

MHP is a three-dimensional plot of the hydrophobicity potential of a molecule in order to visualise its amphipathy.

We postulate that the hydrophobicity induced by an atom i and measured at a point M of space decreases exponentially with the distance between this point M and the surface of the atom i according to the equation (Brasseur, 1991)

$$\text{MHP}_M = \sum_{i=1}^N E_{\text{tri}} \exp(r_i - d_i)$$

where N are all atoms of the molecule, E_{tri} is the transfer energy of atom i , r_i is the Van der Waals radius of the atom i , d_i is the distance between atom i centre and the point M. E_{tri} is the energy required to transfer an atom i from a hydrophobic to a hydrophilic medium. Atomic E_{tri} were calculated from the molecular transfer energies compiled by Tanford (Tanford, 1973) assuming that molecular E_{tr} are the sum of their atomic E_{tr} . Atomic E_{tr} values were derived for seven different atom types (Brasseur, 1991).

The hydrophobic and hydrophilic isopotential surfaces were calculated by a cross-sectional computational method. A 1 Å mesh-grid plane was set to sweep across the molecule by step of 1 Å. At each step, the sum of the hydrophobicity and hydrophilicity values at all grid nodes were calculated. The hydrophobic and hydrophilic MHP surfaces were then drawn by joining the isopotential values. Calculations are performed on an Intel® Pentium® 4, CPU 3.80 GHz, 4.00 Go of RAM. Graphs were drawn using WinMGM (Rahman and Brasseur, 1994).

2.2.3. Liposome preparation

Lipids were dissolved in a chloroform/methanol (2/1, v/v) solution. Lipid film was obtained after evaporation under vacuum obtained with a rotovapor (Van Der Heyden Büchi, Switzerland). The lipid film, dried for one night, was then dispersed in 2 ml of lipid-mixing buffer and incubated for one hour at 37 °C.

To obtain LUV (large unilamellar vesicles), the hydrated lipid dispersion was exposed to five freeze–thaw cycles and passed 10 times through a polycarbonate membrane (0.1 nm) under 20 bars pressure with an extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada).

To obtain small unilamellar vesicles (SUV), the hydrated film was sonicated (High Intensity Ultrasonic Processor, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 5 min at 50 W. A 10,000 × g centrifugation for 2 min

(Biofuge Pico, Van der Heyden, Heraeus, Germany) eliminates Titanium deposit and residual multilamellar vesicles.

The phospholipid concentration were determined by phosphorus analysis (Mrsny et al., 1986).

2.2.4. Lipid-mixing experiments

Mixing of liposome membranes was followed by measuring the fluorescence increase of R18, a lipid soluble probe, after the fusion of labelled and unlabelled liposomes. Labelled liposomes were obtained by incorporating R18 in the dry lipid film at a concentration 6.3% of the total lipid weight. Labelled and unlabelled liposomes were mixed at a weight ratio 1:4, respectively and a final concentration of 50 μM in lipid-mixing buffer. Fluorescence was recorded at room temperature (λ_{exc} : 560, λ_{em} : 590 nm) on an LS-50B Perkin-Elmer fluorimeter.

2.2.5. Leakage of liposome vesicle contents

The HPTS (8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid)/DPX (*p*-xylylenebis[pyridinium] bromide) assay of Ellens et al. (Ellens et al., 1985) was used to monitor vesicle leakage. The assay is based on the quenching of HPTS by DPX. HPTS and DPX are both encapsulated in the aqueous phase of the same liposomes. Leakage of vesicles was followed by the measure of the dequenching of HPTS released into the medium. Fluorescence was recorded at room temperature (λ_{exc} : 360, λ_{em} : 520 nm) on a LS-50B Perkin-Elmer fluorimeter.

Liposomes (SUVs) were prepared as described above in 12.5 mM HPTS (45 mM NaCl), 45 mM DPX (20 mM NaCl), 10 mM Tris–HCl at pH 7.4. Vesicles containing encapsulated HPTS and DPX were eluted in the void volume of Sephadex G-75 column, with 10 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl (pH 7.4).

For leakage and lipid-mixing experiments, assays were repeated at least three times, with different batches of peptide.

2.2.6. Infrared spectroscopy (FTIR) measurements

Attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy was used to determine the secondary structure of Chameleon peptide in solution and in lipids.

Spectra were recorded at room temperature on a Brüker Equinox 55 equipped with a liquid nitrogen-cooled mercury–cadmium–telluride (MCT) detector at a resolution of 2 cm⁻¹, by averaging 512 scans. Free peptide samples (20 μg peptide) and the lipid-bound peptides (see preparation below) were spread out on a germanium ATR plate (50 mm × 20 mm × 2 mm, Aldrich Chimica) with an aperture of 45° yielding 25 internal

reflections. Reference spectra of the Germanium plate were automatically recorded after purge for 15 min with dry air and subtracted to the recently run sample spectra. Peptide/lipid complexes (1/5, w/w ratio) were spread out on the plate and slowly dried under a stream of N₂. The plate was sealed in an universal sample holder and rehydrated by flushing the holder with N₂ saturated with D₂O for 3 h at room temperature.

2.2.7. Sample preparation

Amounts of 250 µg peptides were added to 1250 µg liposomes (1/5 peptide/lipid, w/w ratio) prepared as described above. Lipid–peptide incubations were performed for 1 h at room temperature in a 10 mM sodium acetate 10 mM/acetic acid 57 mM buffer pH 4. After incubation, the lipid–peptide mixture was filtered through an anisotropic hydrophilic YM 30 membrane (cutoff 10 kDa) of a centrifree micropartition system (Amicon) with a 13,000 × g centrifugation for 45 min to separate lipid-associated from free peptides. Phospholipid concentration was determined as mentioned above.

2.2.8. Secondary structure determination

Vibrational bands, especially the amide I band (1600–1700 cm⁻¹), are sensitive to the secondary structures of the proteins. The C=O vibration is representative of 80% of the amide I band and accounts for all the secondary structures. The combination of resolution-enhancement methods with curve-fitting procedures allow to quantitatively assign different secondary structures such as α-helix, β-sheets and unordered structures. Each band was assigned according to the frequency of its maximum. The area of each band was then divided by the sum of all areas. This gives the relative ratio of each secondary structure. The bands are assigned as follows (Goormaghtigh et al., 1999): α-helix: 1662–1645 cm⁻¹, β-sheets: 1689–1682 and 1637–1613 cm⁻¹, random 1644.5–1637 cm⁻¹, β-turns: 1681–1662 cm⁻¹. It should be noted that the proteins spread on the plate are deuterated to avoid an overlap of α-helix and random-coil structures, as previously described (Goormaghtigh et al., 1999).

2.2.9. Orientation of the peptide in the vesicles

When orientation has to be evaluated, spectra are recorded at two orthogonal linear polarisations (90° and 0°) of the incident light. A dichroic spectrum is obtained by subtracting the spectrum recorded with polarised light at 0° from that at 90°. The angle between a normal to the Ge crystal and the dipole is calculated from the dichroic ratio R_{ATR} : $R_{ATR} = A(90^\circ)/A(0^\circ)$ where $A(90^\circ)$ is the absorbance of the selected dipole from a spec-

trum recorded with polarised light at 90° and $A(0^\circ)$ the absorbance of the same dipole from a 0° polarised spectrum.

The bands chosen to characterise the protein and phospholipid orientation are those described in Goormaghtigh et al. (1999).

3. Results

3.1. Sequence analysis

To be considered as tilted, a peptide has to be hydrophobic enough to interact with a hydrophobic/hydrophilic interface, such as a membrane. The mean hydrophobicity of tilted peptides, calculated on the basis of the Eisenberg consensus hydrophobicity scale, is between 0.16 (for lipoprotein lipase tilted peptide) and 0.93 (for Simian immunodeficiency virus tilted peptide) (Brasseur et al., 1997). The mean hydrophobicity of Cham is 0.16, like the lipoprotein lipase (LPL) peptide.

The Jähnig method allows to calculate a mean hydrophobicity for a residue taking into account its neighbouring residues in terms of secondary structure. The Jähnig profile of the GB1 protein with Cham sequence in 23–33 is presented Fig. 1A. Using this method, a curve with an oscillation of three to four amino acids periodicity is usually obtained for amphipathic helices (Brasseur, 2000). For a tilted peptide, the oscillating curve decreases or increases according to the hydrophobic gradient. In the case of Cham peptide, a decreasing oscillation is observed, suggesting the existence of a hydrophobic gradient, the N-terminal domain being more hydrophobic than the C-terminal end.

The HCA method gives a 2D helical representation of the sequence, allowing the detection of hydrophobic clusters whose shape and length can be related to the secondary structure and the hydrophobic properties of the sequence. The HCA representation of the GB1 protein with Cham sequence in 23–33 is presented in Fig. 1B. By considering that the alanine in position 29 is hydrophobic as described in Section 2.2, a triangular hydrophobic cluster for the Cham sequence is observed, in agreement with the existence of a hydrophobic gradient along the sequence (Brasseur, 2000).

Molecular hydrophobic potential (MHP) calculation allows to visualise hydrophobic and hydrophilic domains of a molecule. Fig. 2A shows the MHP of the Cham peptide when helical and beta-structured. A hydrophobicity gradient exists along the helix axis of the Cham peptide, with N-terminal end being more hydrophobic than the C-terminal one. When it is beta-structured (Fig. 2A), there is no amphipathic segregation

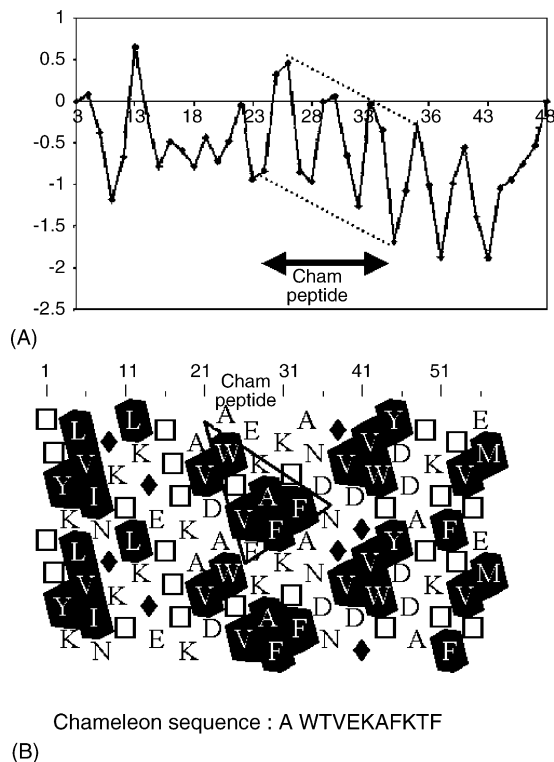


Fig. 1. (A) Jähniq profile of the GB1 with Cham peptide in position 23–33. (B) Hydrophobic cluster analysis of the GB1 with Cham peptide in position 23–33. V (valine), F (phenylalanine), W (tryptophane), Y (tyrosine), M (methionine), L (leucine) and I (isoleucine) are hydrophobic. K (lysine), E (glutamic acid), D (aspartic acid), N (asparagine), □ (threonine) and ◆ (glycine) are hydrophilic. By default, A (alanine) is hydrophilic but when three or more hydrophobic residues surround it, alanine is hydrophobic.

of the hydrophobic and hydrophilic envelopes along the peptide.

3.2. Interaction of the Cham peptide with bilayer

Since the sequence analysis of Cham suggests that the peptide presents a hydrophobicity gradient that should allow a tilted orientation at a hydrophobic/hydrophilic interface, we have studied the interaction of the peptide with membranes (a model of hydrophobic/hydrophilic interface), by molecular modelling, ATR-FTIR and liposome fusion assays.

3.3. Molecular modelling analysis

The conformation of the peptide was analysed using the stereoalphabet procedure (see Section 2). The 20 best structures are conserved and presented in Table 2, using the stereoalphabet code (see Table 1). All peptides are mainly conformed as an α -helix (from 45 to 65%). At

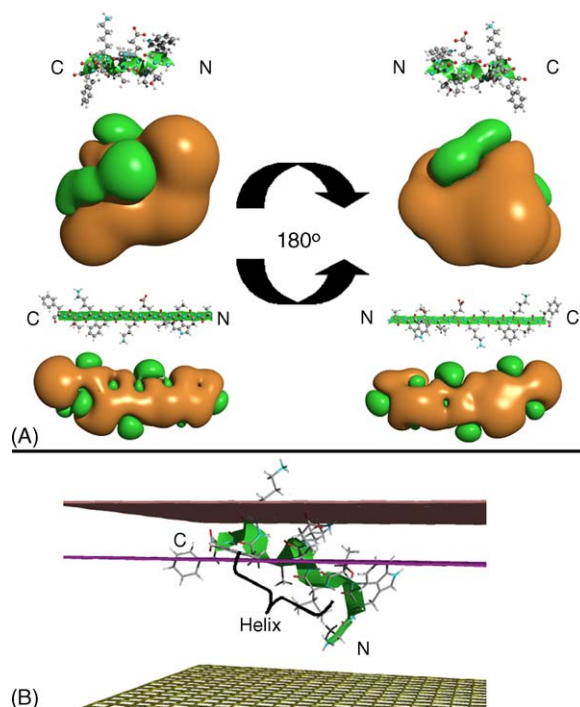


Fig. 2. (A) Molecular hydrophobicity potential (MHP) plot showing the hydrophilic (green) and the hydrophobic (orange) envelopes around the peptide. N and C ends of the peptide are indicated. Top: α -helix folded Cham peptide with, at the right, a 180° rotation compared to the left representation. Below, MHP around the helices. Bottom: β -strand folded Cham peptide with, at the right, a 180° rotation compared to the left representation. Below, MHP around the β structures. (B) Best position of the mean structure of the Chameleon peptide in the IMPALA bilayer. Bottom plane (yellow): bilayer centre ($z=0$); first upper plane (purple): lipid acyl chain/polar headgroups interface at 13.5 \AA from the centre; second upper plane (pink): lipid/water interface ($z=18 \text{ \AA}$). The helix structure and the N and C ends of the peptide are indicated.

their extremities, they present other structures which are generally beta and coil conformations. The mean structure of the Cham peptide is obtained by preserving the most represented structure at each position (Table 2, last line). Like the structures conserved after the stereoalphabet procedure, the mean structure has a central α -helix. The N-terminal extremity is beta conformed whereas the C-terminal end is in coil.

We simulated the interaction of these 20 Cham structures with a modelled bilayer by a Monte Carlo procedure. The interaction of the mean structure of the Cham peptide in the IMPALA membrane is presented in Fig. 2B. Like that peptide structure, the nineteen others insert into the membrane, as suggested by the mean hydrophobicity of Cham peptide. The mass centre of the different structures of Cham peptide inserts at 13.5 \AA from the bilayer centre, i.e. at the interface between the

Table 2

Stereoalphabet code of the 20 best structures and the mean structure of Cham (last line) obtained after the stereoalphabet procedure

b b g a a a a a e c
b b e a a a a a e c
b d g e a a a a e c
b d g a a a a a e c
b c b e a a a a e c
b b g a a a a a e c
b b g e a a a a e c
b d g e a a a a e c
b d g a a a a a e c
b b g d a a a a e c
b b g b a a a a e c
b b g a a a a a e a
b b g e a a a a e a
b d g e a a a a e a
b d g a a a a a e a
b c b e a a a a e c
b b g a e a a a e c
b d e a a a a a e c
b b e a a a a a e c
b d e a a a a a e c
b b g a a a a a e c

phospholipid polar headgroups and the acyl chains. The helix angle of is 56° relative to the membrane normal, as tilted peptides do. The other structures have also a tilted orientation of their helix relative to the membrane normal (data not shown). Their most hydrophobic N-end interacts with the hydrophobic core of the membrane.

The IMPALA simulations indicate that Cham peptide is able to insert obliquely in the membrane when mainly α -structured. Biophysical assays were carried out to assess the secondary structure and lipid-interacting properties of Cham.

3.4. Conformation of the Cham peptide

The secondary structure of the Cham peptide was assayed with ATR-FTIR in different solvents including TFE and DMSO and in the presence of liposomes. In organic solvents, the peptide conformation is 18–21% helix and 41–48% β conformation. When water is added, the helix percentage slightly decreases to the benefit of the β structure. This tendency is reversed when liposomes are added. After 1 h of incubation with liposomes and the elimination of free peptides, 49% are helical, while only 15% correspond to β conformations (Table 3, Fig. 3).

These data indicate that Cham preferentially adopts a β conformation in solution and is mainly helical into membranes. So, like for tilted peptides, the Cham peptide inserts into the membrane under the helical form.

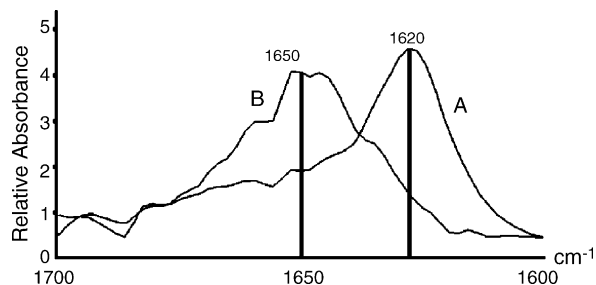


Fig. 3. Infrared spectra of Cham peptide in TFE (A) and in the presence of liposomes (B) between 1700 and 1600 cm^{-1} , corresponding to the amide I absorption. The maximal absorbance is around 1620 cm^{-1} when peptide is dissolved in the TFE and is around 1650 cm^{-1} in the presence of liposomes, which correspond to β and α conformations, respectively.

3.5. Orientation of the Cham peptide in the liposome bilayer

We tested the orientation of the Cham peptide in liposomes by recording the ATR-FTIR spectra obtained with 0° and 90° polarised light beams. When liposomes are spread on a Germanium plate, they form oriented multibilayers (Goormaghtigh et al., 1999). Dichroic ratios allow to determine the angle of the Cham peptide and the phospholipid acyl chains towards the Germanium plate. The mean relative angle between the phospholipid tails and the helix axis is around 50° (Table 4). The ATR-FTIR analysis indicated that the Cham α -helix inserts in the bilayer, obliquely towards the membrane surface, as predicted by the IMPALA method.

3.6. Fusion of liposomes

Since molecular modelling and infrared spectroscopy assays indicate that the Chameleon fragment is obliquely oriented into lipids, we tested its hydrophobic/hydrophilic interface destabilising capacities on liposomes. We checked the fusogenic properties by lipid-mixing and permeability experiments.

In the lipid-mixing assays, R18-quenched and R18-free liposomes were mixed. When there is fusion between the two populations, a mixing of lipids occurs.

Table 3

Secondary structure ($\pm 5\%$) of Chameleon peptide in different solvents and in presence of lipids as determined by ATR-FTIR measurements

Cham peptide in	Beta	Total alpha	Coil	Turn
100% TFE	41	21	9	29
50% TFE	51	13	5	31
100% DMSO	48	18	8	26
Lipids	15	49	15	21

Table 4
Dichroic ratios of the phospholipid acyl chains and Cham peptide α -helix

	Phospholipid (PL) acyl chains		α -Helix		Relative orientation helix axis/PL chains Angle ($^{\circ}$)
	R_{ATR}^*	Angle ($^{\circ}$)**	R_{ATR}^*	Angle ($^{\circ}$)**	
Cham peptide/SUV (PE/PC/PG)	1.06	30	0.99	80	50

* Calculated as mentioned in Section 2. The angles are determined with a precision of $\pm 5^{\circ}$.

** Angle between the phospholipid CH_2 dipole moment or the helix axis and the normal to the Germanium plate.

R18 is subsequently diluted and dequenched, inducing a fluorescence increase. In our assays, the fluorescence increased upon addition of the Cham peptide, indicating lipid fusion. No fluorescence change occurred when the unlabelled liposomes were omitted, nor in the absence of the peptide. The fluorescence signal was optimal in the presence of negatively-charged liposomes at pH 4.0 (Table 5). Small unilamellar vesicles (SUV) gave a better dequenching signal than LUV. The fusion conditions were optimal using SUV made up of PE/PC/PG (6/3/1

mol/mol) at pH 4.0 (Table 5 and Fig. 4). When the peptide/lipid ratio was increased, the dye dequenching signal also increased and reached a plateau (Fig. 5). Under our conditions, the responses are optimal for a peptide/lipid molar ratio of 0.8. The signal obtained with this ratio is equal to the signal obtained with the SUV fusion peptide, at a 0.02 peptide/lipid ratio, used here as a positive control.

In the liposome leakage assays, HPTS and its quencher DPX were encapsulated together in liposomes.

Table 5
Percentage of lipid mixing of charged and uncharged liposomes induced by Chameleon peptide after 15 min (0.8 peptide/lipid mol/mol ratio), in different experimental conditions, 100% is the maximal response

	pH 4	pH 6	pH 7.4
PE/PC/PI/SM/CHOL: 3/3/1.25/0.5/2.25 (m/m)	SUV: 97%, LUV: 67%	LUV: 1%	LUV: 8%
PE/PC/SM/CHOL: 3.15/3.35/1.8/1.7 (m/m)	LUV: 38%	LUV: 8%	LUV: 5%
PE/PC/PG: 6/3/1 (m/m)	SUV: 100%	n.d.	SUV: 81%

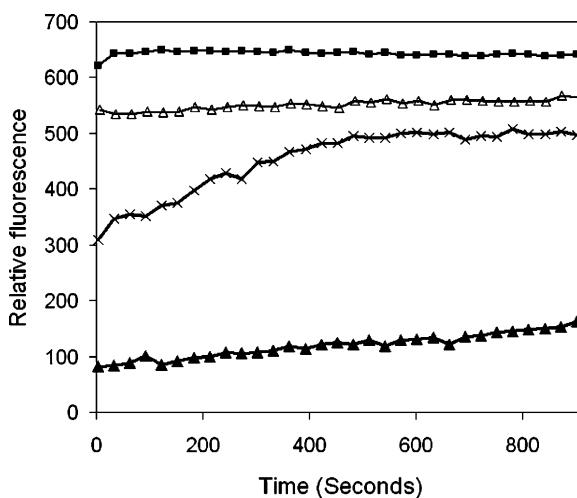


Fig. 4. Time course of lipid mixing of PE/PC/PG (6/3/1; m/m/m) SUVs induced by the Chameleon peptide dissolved in 100% DMSO. Increased R18 relative fluorescence due to probe dilution is followed at room temperature and measured at 590 nm. (■) Cham peptide/lipid molar ratio of 0.8, pH 4; (×) Cham peptide/lipid molar ratio of 0.8, pH 7.4; (Δ) SUV peptide/lipid molar ratio of 0.02 (pH 4); (▲) DMSO.

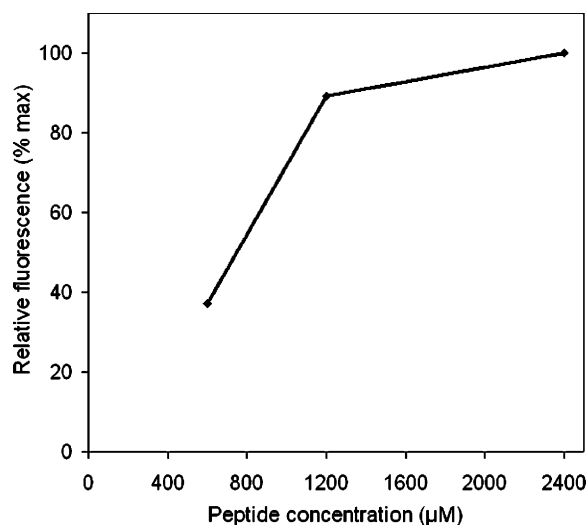


Fig. 5. Influence of the Chameleon peptide concentration on the extent of lipid mixing of PE/PC/PG SUVs. The relative fluorescence of the R18 probe is measured after 15 min of incubation. One hundred percent is the relative fluorescence obtained with the peptide at 2.4 mM (corresponding to a peptide/lipid molar ratio of 0.8).

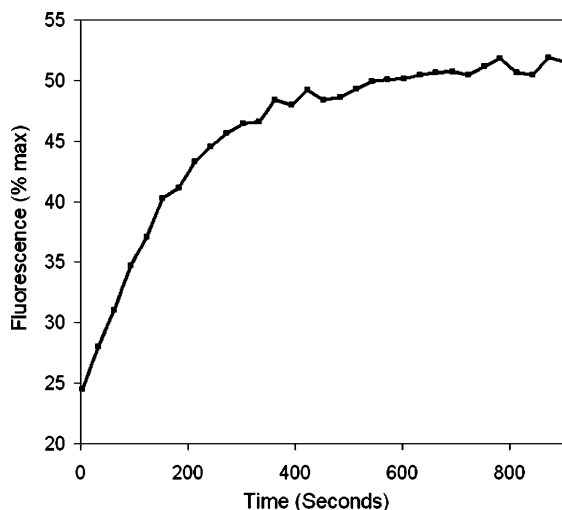


Fig. 6. Leakage of PE/PC/PG SUV contents induced by the Chameleon peptide. The peptide (dissolved in 100% TFE) is added to the liposome suspension in a 0.4 mol/mol ratio as described under Section 2. One hundred percent is the relative fluorescence obtained after adding Triton X 100. The fluorescence of TFE alone was subtracted from the fluorescence induced by the peptide. The HPTS fluorescence is measured at 512 nm (excitation at 450 nm).

On destabilisation of the HPTS-DPX liposomes, the two probes are released into the medium. The distance separating HPTS and DPX increases causing a subsequent increase in HPTS fluorescence. At the same peptide/lipid ratio as for the lipid mixing assays, addition of Cham causes a fluorescence increase, due to HPTS release into the solvent (Fig. 6).

These results show that the Cham peptide is able to induce the destabilisation of liposomes, like tilted peptides. The fusion of liposomes includes bilayer mixing (lipid mixing) and the fracture of membrane integrity (leakage).

4. Discussion

Since few years tilted peptides have been described in literature (for a review, see Brasseur, 2000). Such peptides insert obliquely towards a hydrophobic/hydrophilic interface, such as a lipid bilayer, and induce destabilisation when they are in a helical conformation. They also show structural plasticity since their secondary structure depends on their environment (Ishiguro et al., 1993; Martin et al., 1993, 1994, 1996; Rapaport and Shai, 1994). The latter behaviour is comparable to the structural duality of the Chameleon peptide described by Minor and Kim (1996).

By comparing the properties of the Chameleon peptide with those of known tilted peptides, we suggest that the Cham peptide is a tilted peptide. When helical, the Cham peptide presents an asymmetric hydrophobicity profile, a feature shared by all tilted peptides and responsible for their oblique orientation (Brasseur, 1991; Brasseur, 2000; Lins et al., 2001). The IMPALA simulations hence predict that Cham is able to insert in a tilted fashion into a modelled membrane. The insertion into the bilayer occurs when the peptide adopts a mainly helical stable conformation. The structural reorganisation of the more hydrophobic N-terminal domain allows a deeper interaction of hydrophobic residues with the bilayer core that should disturb the phospholipid acyl chain parallelism. By infrared spectroscopy we showed that the Cham peptide is predominantly β in solvent and mainly helical in presence of liposomes, like for most tilted peptides (Wharton et al., 1988; Takahashi, 1990; Martin et al., 1991, 1994; Gallaher et al., 1992; Nieva et al., 1994; Han et al., 2001; Saez-Cirion and Nieva, 2002). The polarised ATR-FTIR experiments indicated that the Cham peptide adopts a tilted orientation towards a lipid bilayer, in agreement with the modelling approaches. Furthermore, the biophysical assays confirmed the destabilising properties of Cham, since the peptide is able to induce liposome fusion and leakage.

Compared to other tilted peptides, the Cham peptide is relatively hydrophilic. This can be related to the fact that the Cham peptide induces less fusion than the SIV fusion peptide (taken as positive control) at the same peptide/lipid ratio. This was already observed for the apo CIII tilted fragment (Lins et al., 2002).

We observed that Cham induces more fusion in the presence of charged liposomes, at pH 4 as compared to pH 6 or 7.4. At those pH's, the lysine amine group is positively charged (pK_a of 10.4–11.1) and the glutamic acid carboxyl group (pK_a of 4.3–4.5), negative. At pH 4, only lysines are charged, creating two positively charges located on the same helix side (residues 6 and 9). When the liposomes are negatively charged by the presence of PG or PI, we assume that an attraction occurs between the positively-charged peptide and negative lipids, which increases the interaction of the peptide with the membrane. More peptides should insert into the membrane, inducing more liposome fusion.

In earlier studies, it was shown that fusogenic peptides (like fusion peptides), classified into the tilted peptides group, have structural plasticity (Wharton et al., 1988; Takahashi, 1990; Martin et al., 1991, 1994; Gallaher et al., 1992; Nieva et al., 1994; Saez-Cirion and Nieva, 2002). In this study, we have shown that a

peptide, known for its structural plasticity, behaves as a tilted peptide. This suggests that a relatively hydrophobic sequence, which shows different conformations according to the environment, can be a tilted peptide when having an asymmetric distribution of hydrophobic residues in the helical structure. This also suggests that a link should exist between the structural plasticity and the destabilising properties of a peptide. It was notably suggested that the fusogenic properties of tilted peptides of gp41 (the protein involved in the HIV-1 virus/cell fusion process) and of PrP (the protein involved in prion diseases) are related to their structural polymorphism. Indeed, it was shown that the conformational flexibility of the gp41 fusion peptide of HIV-1 appears to be an important factor for the fusion process: inactive mutants possess no conformational flexibility whereas active peptides do (Wong, 2003). Gallaher's team proposed that during the pathological processes, the conformational polymorphism displayed by the 119–137 PrP region (containing the tilted peptide) may play a role in the perturbation of the general architecture of the membrane lipid bilayer (Pillot et al., 1997). Moreover, this team suggests the existence of common mechanisms underlying cytotoxicity by PrP and HIV-1 gp41. According to our study, one of these could be structural flexibility.

All these data suggest that the structural flexibility of tilted peptides is implicated in their destabilising properties. Furthermore, the detection of tilted peptides in proteins which undergo transconformation, such as the 118–135 fragment of PrP or the C-terminal domain of A β (protein responsible for Alzheimer's disease) raises the question whether those destabilising fragments could be related to transconformation (Pillot et al., 1996, 1997). This could be achieved either by their own conformational lability or by their ability to destabilise the interface between the protein hydrophobic core and the more hydrophilic surface. In both cases, the tilted peptide should help to decrease the energy barrier needed to switch from one stable state (the native one) to another (the pathological one), as suggested (Brasseur, 2000). Further investigations are needed to assess the role of tilted peptides in transconformational processes.

Acknowledgements

LL and RB are, respectively Research Associate and Research Director at the National Funds for Scientific Research (FNRS) of Belgium. AT is Research Director at the Institut National de la Santé et de la recherche Médicale (INSERM, France). This work was supported

by Region Wallonne and the National Fund for Scientific Research of Belgium (grant F.N.R.S.-Televie no. 7.4.527.05.F to AL).

References

- Adam, B., Lins, L., Stroobant, V., Thomas, A., Brasseur, R., 2004. Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide. *J. Virol.* 78, 2131–2136.
- Bradshaw, J.P., Darkes, M.J.M., Harroun, T.A., Katsaras, J., Epanand, R.M., 2000. Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffractions. *Biochemistry* 39, 6581–6585.
- Brasseur, R., Lorge, P., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.M., Espion, D., Burny, A., 1988. The mode of insertion of the paramyxovirus F1 N-terminus into lipid matrix, an initial step in host cell/virus fusion. *Virus Genes* 1, 325–332.
- Brasseur, R., 1991. Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J. Biol. Chem.* 266, 16120–16127.
- Brasseur, R., Pillot, T., Lins, L., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., 1997. Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability. *TIBS* 22, 167–171.
- Brasseur, R., 2000. Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis). *Mol. Membr. Biol.* 17, 31–40.
- Cladera, J., Martin, I., Ruyschaert, J.M., O'Shea, P., 1999. Characterization of the sequence of interactions of the fusion domain of the simian immunodeficiency virus with membranes—role of the membrane dipole potential. *J. Biol. Chem.* 274, 29951–29959.
- Decout, A., Labeur, C., Vanloo, B., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Brasseur, R., Rosseneu, M., 1999. Contribution of the hydrophobicity gradient to the secondary structure and activity of fusogenic peptides. *Mol. Membr. Biol.* 16, 237–246.
- Ducarme, P., Rahman, M., Brasseur, R., 1998. IMPALA: a simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins* 30, 357–371.
- El Kirat, K., Lins, L., Brasseur, R., Dufrene, Y.F., 2005. Fusogenic tilted peptides induce nanoscale holes in supported phosphatidylcholine bilayers. *Langmuir* 21, 3116–3121.
- Ellens, H., Bentz, J., Szoka, F.C., 1985. H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry* 24, 3099–3106.
- Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T., Mornon, J.P., 1987. Hydrophobic cluster-analysis—an efficient new way to compare and analyze amino-acid-sequences. *Febs Lett.* 224, 149–155.
- Gallaher, W.R., Segrest, J.P., Hunter, E., 1992. Are fusion peptides really sided insertional helices. *Cell* 70, 531–532.
- Goormaghtigh, E., Raussens, V., Ruyschaert, J.M., 1999. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1422, 105–185.
- Gordon, L.M., Mobley, P.W., Lee, W., Eskandari, S., Kaznessis, Y.N., Sherman, M.A., Waring, A.J., 2002. Conformation mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in lipid detergent and aqueous environments using ¹³C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Protein Sci.* 13, 1012–1030.
- Han, X., Bushweller, J.H., Cafiso, D.S., Tamm, L.K., 2001. Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the

- fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* 8, 715–720.
- Horth, M., Lambrecht, B., Khim, M.C., Bex, F., Thiriart, C., Ruyschaert, J.M., Burny, A., Brasseur, R., 1991. Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide. *EMBO J.* 10, 2747–2755.
- Ishiguro, R., Kimura, N., Takahashi, S., 1993. Orientation of fusion-active synthetic peptides in phospholipid bilayers: determination by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 32, 9792–9797.
- Jahnig, F., 1990. Structure predictions of membrane-proteins are not that bad. *TIBS* 15, 93–95.
- Lambert, G., Decout, A., Vanloo, B., Rouy, D., Duverger, N., Kalopisis, A., Vadekerckhove, J., Chambaz, J., Brasseur, R., Rosseneu, M., 1998. The C-terminal helix of human apolipoprotein AII promotes the fusion of unilamellar liposomes and displaces apolipoprotein AI from high-density lipoproteins. *Eur. J. Biochem.* 253, 328–338.
- Lear, J.D., Degrad, W.F., 1987. Membrane-binding and conformational properties of peptides representing the NH₂-terminus of influenza Ha-2. *J. Biol. Chem.* 262, 6500–6505.
- Lins, L., Brasseur, R., Depauw, M., Vanbiervliet, J.P., Ruyschaert, J.M., Rosseneu, M., Vanloo, B., 1995. Helix-helix interactions in reconstituted high-density-lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta Lipid Lipid Metabol.* 1258, 10–18.
- Lins, L., Charlotiaux, B., Thomas, A., Brasseur, R., 2001. Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins* 44, 435–447.
- Lins, L., Flore, C., Chapelle, L., Talmud, P.J., Thomas, A., Brasseur, R., 2002. Lipid-interacting properties of the N-terminal domain of human apolipoprotein C-III. *Protein Eng.* 15, 513–520.
- Martin, I., Defrise-Quertain, F., Mandieau, V., Nielsen, N.M., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M., Vandenbranden, M., 1991. Fusogenic activity of SIV (simian immunodeficiency virus) peptides located in the GP32 NH₂-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 872–879.
- Martin, I., Defrise-Quertain, F., Decroly, E., Vandenbranden, M., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M., 1993. Orientation and structure of the NH₂-terminal HIV-1 gp41 peptide in fused and aggregated liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1145, 124–133.
- Martin, I., Dubois, M.C., Defrise-Quertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., Ruyschaert, J.M., 1994. Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH₂-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J. Virol.* 68, 1139–1148.
- Martin, I., Schaal, H., Scheid, A., Ruyschaert, J.M., 1996. Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J. Virol.* 70, 298–304.
- Martin, I., Ruyschaert, J.M., Eband, R.M., 1999. Role of the N-terminal peptides of viral envelope proteins in membrane fusion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 38, 233–255.
- Mihara, H., Takahashi, Y., Ueno, A., 1998. Design of peptides undergoing self-catalytic alpha-to-beta transition and amyloidogenesis. *Biopolymers* 47, 83–92.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Lins, L., Bensliman, M., Thomas, A., Van Bambeke, F., Peuvot, J., Schanck, A., Brasseur, R., 2003. Piracetam inhibits the lipid-destabilising effect of the amyloid peptide A beta C-terminal fragment. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1609, 28–38.
- Minor Jr., D.L., Kim, P.S., 1996. Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature* 380, 730–734.
- Mrsny, R.J., Volwerk, J.J., Griffith, O.H., 1986. A simplified procedure for lipid phosphorus analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure. *Chem. Phys. Lipids* 39, 185–191.
- Nelder, J.A., Mead, R., 1965. A simplex method for function minimization. *Comput. J.* 7, 308–313.
- Nieva, J.L., Nir, S., Muga, A., Goni, F.M., Wilschut, J., 1994. Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage. *Biochemistry* 33, 3201–3209.
- Peelman, F., Goethals, M., Vanloo, B., Labeur, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., 1997. Structural and functional properties of the 154–171 wild-type and variant peptides of human lecithin-cholesterol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 249, 708–715.
- Perez-Mendez, O., Vanloo, B., Decout, A., Goethals, M., Peelman, F., Vandekerckhove, J., Brasseur, R., Rosseneu, M., 1998. Contribution of the hydrophobicity gradient of an amphipathic peptide to its mode of association with lipids. *Eur. J. Biochem.* 256, 570–579.
- Peuvot, J., Schanck, A., Lins, L., Brasseur, R., 1999. Are the fusion processes involved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes? *J. Theor. Biol.* 198, 173–181.
- Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talussot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Lins, L., 1996. Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* 271, 28757–28765.
- Pillot, T., Lins, L., Goethals, M., Vanloo, B., Baert, J., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Brasseur, R., 1997. The 118–135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion. *J. Mol. Biol.* 274, 381–393.
- Primakoff, P., Hyatt, H., Tredick-Kline, J., 1987. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J. Cell. Biol.* 104, 141–149.
- Qiao, H., Armstrong, R.T., Melikyan, G.B., Cohen, F.S., White, J.M., 1999. A specific point mutant at position 1 of the influenza hemagglutinin fusion peptide displays a hemifusion phenotype. *Mol. Biol. Cell* 10, 2759–2769.
- Rahman, M., Brasseur, R., 1994. WinMGM: a fast CPK molecular graphics program for analyzing molecular structure. *J. Mol. Graph.* 12, 212–8, 198.
- Rapaport, D., Shai, Y., 1994. Interaction of fluorescently labeled analogues of the amino-terminal fusion peptide of Sendai virus with phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 15124–15131.
- Saez-Cirion, A., Nieva, J.L., 2002. Conformational transitions of membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochim. Biophys. Acta* 1564, 57–65.
- Takahashi, S., 1990. Conformation of membrane fusion-active 20-residue peptides with or without lipid bilayers. Implication of alpha-helix formation for membrane fusion. *Biochemistry* 29, 6257–6264.
- Talmud, P., Lins, L., Brasseur, R., 1996. Prediction of signal peptide functional properties: a study of the orientation and angle of insertion of yeast invertase mutants and human apolipoprotein B signal peptide variants. *Protein Eng.* 9, 317–321.
- Tanford, C., 1973. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. John Wiley and Sons, New York.

- Vantilbeurgh, H., Roussel, A., Lalouel, J.M., Cambillau, C., 1994. Lipoprotein-lipase—molecular-model based on the pancreatic lipase X-ray structure, consequences for heparin-binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* 269, 4626–4633.
- Voneche, V., Portetelle, D., Kettmann, R., Willems, L., Limbach, K., Paoletti, E., Ruysschaert, J.M., Burny, A., Brasseur, R., 1992. Fusogenic segments of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 3810–3814.
- Wharton, S.A., Martin, S.R., Ruigrok, R.W., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1988. Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus haemagglutinin. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 8), 1847–1857.
- Wong, T.C., 2003. Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion peptide by molecular dynamics simulation II. The glycine mutants. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1609, 45–54.

4. Le mode d'interaction membranaire et les propriétés fusogènes d'un peptide transmembranaire modèle *de novo* dépendent de la longueur du cœur hydrophobe.

Lorin, A., Charloreaux, B., Fridmann-Sirkis, Y., Thomas, A., Shai, Y. & Brasseur, R. (2007) Mode of Membrane Interaction and Fusogenic Properties of a *de novo* Transmembrane Model Peptide Depend on the Length of the Hydrophobic Core. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 18388-18396

Les études précédentes ont permis de déterminer le peptide de fusion minimal des virus HIV-1 et BLV. Elles montrent également que la fusogénicité de cette classe de peptides, celle des peptides obliques, est liée à leur capacité à s'insérer obliquement dans la membrane sous forme hélicoïdale. Enfin, elles renforcent l'hypothèse selon laquelle la flexibilité structurale des peptides obliques et en particulier des peptides de fusion est importante pour leur potentiel fusogène.

Le peptide de fusion n'est pas la seule région des glycoprotéines à intervenir directement dans la fusion membranaire. De nombreuses études indiquent que le domaine transmembranaire des glycoprotéines de nombreux virus, dont celui du HIV-1, intervient également dans le mécanisme de la fusion (cf. chapitre 4. p.27). Des mutations au sein du domaine transmembranaire peuvent annuler ou diminuer la fusogénicité de certaines glycoprotéines. La diminution de la longueur de ce domaine peut également empêcher la fusion de se dérouler correctement. Le rôle des domaines transmembranaires dans la fusion est aussi mise en évidence par des études montrant que des peptides correspondant au domaine transmembranaire de la protéine G du VSV ou à une partie du domaine transmembranaire de gp41 du HIV-1 induisent la fusion de liposomes (Langosch et al., 2001a ; Dennison et al., 2002 ; Moreno et al., 2006). Il a été proposé que la flexibilité structurale des domaines transmembranaires intervienne dans la fusogénicité des glycoprotéines (Langosch et al., 2001a). Afin de tester cette hypothèse, Hofmann et al. (2004) ont analysé les propriétés fusogènes de peptides transmembranaires modèles dont la proportion en résidus promoteurs d'hélice α et en résidus promoteurs de feuillet β varie. Leurs résultats montrent que les peptides contenant des résidus promoteurs d'hélice α et des résidus promoteurs de feuillet β induisent plus de fusion que les peptides composés seulement de

résidus promoteurs d'hélice. L'utilisation de ces peptides modèles a permis de renforcer le lien flexibilité/fusogénicité des domaines transmembranaires hélicoïdaux.

Dans cette partie du travail, nous avons également utilisé des peptides transmembranaires modèles, appelés KALRs, pour étudier l'effet de la séquence et de la longueur des domaines transmembranaires sur leurs propriétés membranaires dont la fusion. Le cœur hydrophobe de ces peptides est principalement composé de leucines et d'alanines. Ces deux résidus favorisent la structure hélicoïdale (Chakrabarty et al., 1994 ; Pace et Scholtz, 1998 ; Rohl et al., 1999). Un tryptophane est présent au centre du cœur, ce qui permet d'avoir un marqueur fluorescent. Le cœur des peptides est entouré par des résidus polaires chargés positivement : des lysines du côté N-terminal et des arginines du côté C-terminal. Comme l'alanine et la leucine, ces résidus favorisent la formation d'hélice (Pace et Scholtz, 1998). Les peptides KALRs sont donc composés de résidus promoteurs d'hélices.

Afin de mesurer l'effet de la longueur hydrophobe de ce peptide sur ses propriétés membranaires, trois KALRs ont été conçus. KALR₁₄, KALR₁₈ et KALR₂₂ contiennent respectivement 14, 18 et 22 résidus hydrophobes centraux. Les propriétés membranaires de ces trois KALRs ont été analysées par modélisation moléculaire et approches expérimentales.

Les analyses ATR-FTIR montrent que les peptides KALRs s'insèrent dans la membrane sous forme majoritairement hélicoïdale et adoptent une orientation transmembranaire (Figure 4 et Table 2 de l'article). L'algorithme IMPALA prédit également une insertion transmembranaire de ces peptides sous forme hélicoïdale (Figure 1 de l'article). Les peptides KALRs sont donc de bons modèles de peptides transmembranaires hélicoïdaux. Les analyses FTIR montrent que la longueur du cœur hydrophobe de KALR intervient dans sa capacité à s'insérer dans les membranes (Figure 4 de l'article). En effet, plus son cœur hydrophobe est long, plus KALR s'insère dans les membranes. Cette augmentation d'insertion peut être due à l'augmentation de l'hydrophobicité du peptide. Toutefois, l'analyse IMPALA suggère qu'un autre paramètre intervient également dans le taux d'insertion de KALR : sa capacité à traverser totalement la membrane (Figure 1 de l'article). En effet, KALR₁₄ est trop court pour traverser entièrement la membrane. Cette situation, appelée « mismatch » hydrophobe négatif, est défavorable d'un point de vue énergétique car une des deux extrémités polaires du peptide se situe dans le centre hydrophobe de la membrane. Pour remédier à cette situation défavorable, KALR₁₄ s'insère beaucoup moins dans la membrane

que KALR₂₂ qui est assez long pour traverser entièrement la membrane (Figure 4 de l'article). L'étendue du « mismatch » de KALR₁₈ étant beaucoup moins élevée que celui de KALR₁₄, KALR₁₈ peut subir quelques modifications structurales lui permettant de traverser entièrement la membrane (Figures 1 et 2 de l'article). Le taux d'insertion de KALR₁₈ est alors proche de celui de KALR₂₂ qui traverse la membrane sans modifications de structure (Figure 4 de l'article).

Nos résultats montrent également que KALR₁₈ et KALR₂₂ induisent la fusion et la perméabilisation de liposomes *in vitro*. Un peptide transmembranaire modèle composé de résidus promoteurs d'hélices peut donc avoir des propriétés fusogènes. Par contre, KALR₁₄ n'induit aucune déstabilisation membranaire *in vitro*. Cette différence de fusogénicité peut être expliquée par les différences d'insertion membranaire des peptides. L'analyse IMPALA suggère que la longueur du cœur hydrophobe intervient également dans la capacité du peptide à déstabiliser les membranes. En effet, seuls les KALRs qui interagissent avec les deux monocouches de la membrane sont fusogènes. Ces résultats peuvent être reliés à ceux montrant que la diminution de la longueur du domaine transmembranaire des glycoprotéines virales diminue la fusogénicité de celles-ci (Owens et al., 1994 ; Bos et al., 1995 ; Pietschmann et al., 2000 ; Melikyan et al., 2000 ; Armstrong et al., 2000). Il a d'ailleurs été suggéré que la capacité de HA2 à induire la fusion était liée à la capacité de son domaine transmembranaire à traverser la membrane (Armstrong et al., 2000). Nos études vont dans ce sens.

Mode of Membrane Interaction and Fusogenic Properties of a *de Novo* Transmembrane Model Peptide Depend on the Length of the Hydrophobic Core*

Received for publication, January 4, 2007, and in revised form, April 24, 2007. Published, JBC Papers in Press, April 24, 2007, DOI 10.1074/jbc.M700099200

Aurélien Lorin^{†1,2}, Benoit Charlotheaux^{†1}, Yael Fridmann-Sirkis[‡], Annick Thomas^{‡3}, Yechiel Shai^{§4}, and Robert Brasseur^{‡5}

From [†]Gembloux Agricultural University, Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, B-5030 Gembloux, Belgium and the [‡]Department of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

Model peptides composed of alanine and leucine residues are often used to mimic single helical transmembrane domains. Many studies have been carried out to determine how they interact with membranes. However, few studies have investigated their lipid-destabilizing effect. We designed three peptides designated KALRs containing a hydrophobic stretch of 14, 18, or 22 alanines/leucines surrounded by charged amino acids. Molecular modeling simulations in an implicit membrane model as well as attenuated total reflection-Fourier transform infrared analyses show that KALR is a good model of a transmembrane helix. However, tryptophan fluorescence and attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy indicate that the extent of binding and insertion into lipids increases with the length of the peptide hydrophobic core. Although binding can be directly correlated to peptide hydrophobicity, we show that insertion of peptides into a membrane is determined by the length of the peptide hydrophobic core. Functional studies were performed by measuring the ability of peptides to induce lipid mixing and leakage of liposomes. The data reveal that whereas KALR₁₄ does not destabilize liposomal membranes, KALR₁₈ and KALR₂₂ induce 40 and 50% of lipid-mixing, and 65 and 80% of leakage, respectively. These results indicate that a transmembrane model peptide can induce liposome fusion *in vitro* if it is long enough. The reasons for the link between length and fusogenicity are discussed in relation to studies of transmembrane domains of viral fusion proteins. We propose that fusogenicity depends not only on peptide insertion but also on the ability of peptides to destabilize the two leaflets of the liposome membrane.

Biological membranes are a complex mixture of lipids that contain proteins, hydrocarbons, and other constituents (1). In addition, expression, folding, and insolubility problems can make the study of protein-membrane interactions very complicated and limit the results of interpretation (2, 3). Therefore, peptide-membrane interactions are often studied with liposomes of strictly controlled composition (4–8). Use of such model membrane systems also allows one to control the surrounding medium (4). The same principle has been used by several groups with simplified *de novo* model peptides composed of typical residues (9–17). These approaches are useful for analyzing the impact of specific features of peptides and/or membranes on peptide-membrane interactions (12, 18).

The effect of hydrophobicity of TM⁶ model peptides on their interaction with membranes has been studied by several groups (16, 19). A threshold of hydrophobicity is required for peptides to be able to insert into membranes and to adopt a transmembrane orientation (19). For example, peptides with a hydrophobic core composed of 24 alanine residues do not adopt a stable transmembrane orientation in phosphatidylcholine-hydrated membranes (15). Lewis *et al.* concluded that this is due to insufficient hydrophobicity rather than poor helicity (15). As a result, TM model peptides are usually composed of a mixture of alanine and leucine residues (16, 20–29). This composition better mimics the mean hydrophobicity of natural TM domains than peptides composed of solely leucine residues (16, 30). Almost all *de novo* TM peptides have aromatic or positively charged residues on either side of the hydrophobic stretch. Lysine and arginine residues are used, since they help to solubilize the peptide, to promote the monomer form, to favor a helical conformation, and to ensure the TM orientation (16, 22). Moreover, it was shown that natural transmembrane α -helices domains are often flanked by lysine and arginine residues (31, 32).

When the length of the hydrophobic stretch of a helical peptide fits the thickness of the membrane hydrophobic core, the peptide inserts into the membrane and adopts a TM orienta-

* This work was supported by Ministère de la Région Wallonne Contract 14540 (PROTMEM) and Contract 215140 (α BUSTEC). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Supported by National Fund for Scientific Research of Belgium Grant F.N.R.S.-Televie 7.4.527.05.F.

³ Research Director at INSERM (France).

⁴ Holder of the Harold S. and Harriet B. Brady Professorial Chair in Cancer Research. Supported by the Israel Science Foundation.

⁵ Research Director of the National Funds for Scientific Research of Belgium. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 32-81-62-25-21; Fax: 32-81-62-25-22; E-mail: brasseur.r@fsagx.ac.be.

⁶ The abbreviations used are: TM, transmembrane; DOPC, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; DOPG, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-racemic-(1-glycerol); DOPE, 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; CHOL, cholesterol; SM, sphingomyelin; LUV, large unilamellar vesicle; SUV, small unilamellar vesicle; FTIR, Fourier transform infrared; ATR, attenuated total reflection; TFE, trifluoroethanol; DPX, *N,N'*-*p*-xylylenebis(pyridinium bromide); HPTS, 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid; IMPALA, integral membrane protein and lipid association.

tion (26, 33). When it does not fit, either polar residues are exposed to the apolar medium, or hydrophobic residues are accessible to the water phase. This unfavorable phenomenon has been called hydrophobic mismatch (6, 16, 18, 34). Positive and negative hydrophobic mismatches occur when the hydrophobic stretch of a peptide is too long or too short with respect to the membrane thickness, respectively (16). The peptide can adapt its structure or its orientation to overcome mismatch (23, 25, 35). It can also oligomerize to reduce the mismatch (for a review, see Ref. 16). If the mismatch is too great, insertion of the peptide into the membrane is reduced (16, 34–37). It has been shown that membrane adaptation can also result as a response to a hydrophobic mismatch. ^2H NMR measurements with lipids containing a perdeuterated acyl chain, x-ray diffraction, and differential scanning calorimetry measurements revealed that a positive mismatch increases the lipid chain order, whereas a negative mismatch increases membrane disorder (38–41). However, other studies using ^{15}N as well as ^{31}P NMR, differential scanning calorimetry, and ESR showed that peptides long enough or too long to span the membrane perturb the membrane order whereas peptides that are too short have less effect (23, 24).

Few studies have focused on the ability of TM model peptides to induce membrane fusion. Hofmann *et al.* (42) showed that the fusogenicity of TM model peptides varies with the ratio of helix-promoting leucine and sheet-promoting valine residues and is enhanced if helix-destabilizing residues, such as glycine and proline, are present within their hydrophobic core. They further showed that fusogenicity of these peptides correlates with structural flexibility (42). The more flexible the peptide is, the more fusion is induced.

In this study, we analyzed the interaction of *de novo* TM peptides with membranes and in particular their ability to induce fusion. We designed three TM model peptides; all have a hydrophobic core made of alanines and leucines (14, 18, and 22 residues), and both the N and C termini were extended with three positively charged residues. Interactions and fusogenic properties of each KALR with a membrane were studied by modeling and experimental approaches.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-racemic-(1-glycerol) sodium salt (DOPG), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), cholesterol (CHOL), and bovine brain sphingomyelin (SM) were purchased from Sigma. Trifluoroethanol (TFE), Hepes, Triton X-100, and Me_2SO were purchased from Sigma. Octadecylrhodamine chloride B, *N,N'*-*p*-xylenebis(pyridinium bromide) (DPX), and 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid (HPTS) came from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). NaCl came from Merck Eurolab (Leuven, Belgium). Peptides KALR₁₄, KALR₁₈, and KALR₂₂ were synthesized by NeoMPS (Strasbourg, France). These peptides have free N and C termini (Table 1). Their purity is higher than 85%.

Liposome Preparation—DOPC, DOPG, DOPE, SM, and CHOL were dissolved in a chloroform/methanol (2:1, v/v) solution. DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34:33:16:10:7 mol/mol/mol/mol/mol) film was obtained after evaporation under

vacuum with a rotary evaporator (Rotovapor R-3000, Van Der Heyden Büchi, Switzerland). The lipid film, dried for one night, was then dispersed in 2 ml of 5 mM HEPES and 100 mM NaCl, pH 7.4, buffer and incubated for 1 h at 37 °C. To obtain DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34:33:16:10:7, mol/mol/mol/mol/mol) large unilamellar vesicles (LUV), the hydrated lipid dispersion was exposed to five freeze-thaw cycles and passed 10 times through a polycarbonate membrane (0.1 μm) under 20 bars pressure with an extruder (Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada). To obtain DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34/33/16/10/7 mol/mol/mol/mol/mol) small unilamellar vesicles (SUV), the hydrated film was sonicated (high intensity ultrasonic processor; Sigma) for 5 min at 50 W. A 10,000 \times g centrifugation for 2 min (Biofuge Pico, Van der Heyden, Heraeus, Germany) discarded titanium deposit and residual multilamellar vesicles. The phospholipid concentration was determined by phosphorus analysis (43).

Lipid-binding Experiments—In a polar environment, the tryptophan present in KALRs has a fluorescence spectrum with a maximum around 350 nm. Upon the addition of SUVs, the fluorescence maximum shifts to the blue, around 335 nm. The affinity of the peptide for the SUV was determined by adding increasing amounts of vesicles to 0.67 mM peptides dissolved in Me_2SO , as previously described (44–46). Fluorescence was recorded at room temperature (λ_{exc} , 280 nm; λ_{em} , 335 nm) after each addition on an LS-50B PerkinElmer Life Sciences fluorimeter. The fluorescence values were then corrected by taking into account the dilution factor corresponding to the addition of the liposomes and by subtracting the corresponding blank (Me_2SO with the same amount of SUVs). The ratio (*R*) of bound to total peptides and the dissociation constant (K_d) were calculated as described by Lear and DeGrado (46). Experiments were carried out in a buffer composed of 5 mM HEPES and 100 mM NaCl at pH 7.4.

Lipid Mixing Experiments—Mixing of liposome membranes was followed by measuring the fluorescence increase of octadecylrhodamine chloride B, a lipid soluble probe, after the fusion of labeled and unlabeled liposomes. Labeled liposomes were obtained by incorporating octadecylrhodamine chloride B in the dry lipid film at a 5% concentration of the total lipid weight. Labeled and unlabeled liposomes were mixed at a weight ratio of 1:4, respectively, and at a final concentration of 12.5 μM in 5 mM HEPES and 100 mM of NaCl buffer at pH 7.4. 100% of fusion was determined by adding Triton X-100 at 2% to labeled/unlabeled (1:4) LUVs. Fluorescence was recorded at room temperature (λ_{exc} , 560 nm; λ_{em} , 590 nm) on an LS-50B PerkinElmer Life Sciences fluorimeter. The tests were performed with LUVs and were repeated three times with different batches of peptide.

Leakage of Liposome Vesicle Contents—Vesicle leakage was monitored using an assay based on the quenching of HPTS by DPX (47). HPTS and DPX are both encapsulated in the aqueous phase of the same liposomes. Leakage of vesicles was followed by measuring the dequenching of HPTS released into the medium. Fluorescence was recorded at room temperature (λ_{exc} , 450 nm; λ_{em} , 512 nm) on an LS-50B PerkinElmer fluorimeter. Liposomes (LUVs) were prepared as described above in 12.5 mM HPTS (45 mM NaCl), 45 mM DPX (20 mM NaCl), and 10 mM HEPES buffer at pH 7.4. Vesicles containing encapsu-

lated HPTS and DPX were eluted in the void volume of a Sephadex G-75 column, with 5 mM HEPES and 100 mM NaCl buffer (pH 7.4). Assays were repeated three times with different batches of peptide.

Electron Microscopy—The effect of the peptides on SUV was examined by negative transmission staining electron microscopy. Prior to staining and fixing, suspensions of SUV at 4.5 mM (with or without lyophilized peptide) were incubated for 5 min at room temperature. A drop containing SUV alone or with a peptide was deposited onto a carbon-coated grid and negatively stained with 2% phosphotungstic acid (pH 6.8). The grids were observed by using a JEOL JEM 100B electron microscope (Japan Electron Optics Laboratory Co., Tokyo, Japan).

IR Spectroscopy Measurements—Spectra were recorded at room temperature on a Brüker Equinox 55 equipped with a liquid nitrogen-cooled mercury-cadmium-telluride detector at a resolution of 2 cm^{-1} by averaging 512 scans. Reference spectra of the germanium plate were automatically recorded after purging for 15 min with dry air and subtracted from the recently run sample spectrum. The plate was sealed in a universal sample holder and rehydrated by flushing the holder with N_2 saturated with D_2O for 3 h at room temperature. Free peptide samples (50 μg of peptide in TFE) and the lipid-bound peptides were spread out on a germanium ATR plate ($50 \times 20 \times 2\text{ mm}$; Aldrich Chimica) with an aperture of 45° , yielding 25 internal reflections. The lipid-membrane sample was prepared by incubation of 1 ml of peptides at 60 μM with 6 ml of CHOL/DOPC/DOPE/DOPG (40/34/16/10, mol/mol/mol/mol/mol) SUV at 500 μM (1:50 peptide/lipid (mol/mol) ratio) in 5 mM HEPES and 100 mM NaCl buffer at pH 7.4 for 1 h at room temperature. After incubation, the lipid/peptide mixture was filtered through an anisotropic hydrophilic YM 30 membrane (cut-off 30 kDa) of a Centrifree micropartition system (Amicon) with a $13,000 \times g$ centrifugation for 45 min to separate lipid-associated from free peptides. Distilled water was used to recuperate the retained sample containing the peptide-lipid complex. To determine the peptide insertion rate in membranes by infrared spectra, the area of the amide I peak was divided by the area of the lipid C=O peak and the number of amide groups in the peptide, as previously shown (35).

To evaluate the orientation of peptides in lipids, spectra were recorded at two orthogonal linear polarizations (90° and 0°) of the incident light. The dichroic spectrum was obtained by subtracting the spectrum recorded with polarized light at 0° from that at 90° . The angle between the germanium crystal and the dipole was calculated from the dichroic ratio $R_{\text{ATR}}/R_{\text{ATR}} = A(90^\circ)/A(0^\circ)$, where $A(90^\circ)$ is the absorbance of the selected dipole from a spectrum recorded with polarized light at 90° , and $A(0^\circ)$ is the absorbance of the same dipole from a 0° polarized spectrum. The bands chosen to characterize the protein and phospholipid orientation are the amide I and the lipid νs (CH_2), respectively (48, 49).

Design of KALRs—Three peptides with a hydrophobic core of 14, 18, and 22 residues were designed (Table 1). The hydrophobic core is an $\text{AA}(\text{LAAA})_n$ motif with $n = 3, 4,$ and 5 for KALR_{14} , KALR_{18} , and KALR_{22} , respectively. The hydrophobic core lengths were chosen to have variations of approximately

one helix turn, corresponding to 6 \AA (50). Each peptide is surrounded by three lysine residues at the N-terminal extremity and three arginine residues at the C-terminal extremity. At the center of the sequence of each peptide, a tryptophan residue replaces an alanine residue in order to have a fluorescent sensor.

Analysis by Molecular Modeling—The integral membrane protein and lipid association (IMPALA) method was used to analyze interaction of KALRs with membranes (51). The thickness of the implicit bilayer was extrapolated from experimental data on DOPC bilayers (16, 52, 53) and the contribution of SM/cholesterol to membrane thickness (54–57). The thickness of the model membrane was 40 \AA with a hydrophobic core of 31 \AA to mimic membranes used in the experimental assays.

The IMPALA method simulates the insertion of peptides into the bilayer by adding energy restraint functions to the usual energy function of peptides. The lipid bilayer is defined by $C(z)$, which represents an empirical function describing membrane properties as follows,

$$C(z) = 1 - \frac{1}{1 + e^{\alpha(z - z_0)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where z is perpendicular to the membrane and has its origin at the center of the bilayer. The values α and z_0 are parameters fixed in such a way that $C(|z| \geq 20\text{ \AA}) = 1$ and $C(|z| \leq 15.5\text{ \AA}) = 0$. The value of the function is constant from $-\infty$ to -20 \AA (hydrophilic phase), from -15.5 to 15.5 \AA (hydrophobic core), and from 20 \AA to ∞ (hydrophilic phase).

Two restraints simulate the interaction between the peptide and the bilayer. The first one accounts for the effect that pushes hydrophobic atoms into the membrane (hydrophobic restraint) and hydrophilic atoms outside of it as follows,

$$E_{\text{pho}} = - \sum_{i=1}^N S(i) E_{\text{tr}}(i) C(z_i) \quad (\text{Eq. 2})$$

where N is the total number of atoms, $S(i)$ is the solvent-accessible surface of atom i , $E_{\text{tr}}(i)$ is its transfer energy in units of accessible surface area, and $C(z_i)$ is the value of $C(z)$ at the position z_i of atom i .

The second restraint simulates the perturbation of the bilayer due to the insertion of the molecule (E_{lip}),

$$E_{\text{lip}} = a_{\text{lip}} \sum_{i=1}^N S(i) (1 - C(z_i)) \quad (\text{Eq. 3})$$

where a_{lip} is an empirical factor fixed to 0.018 (51).

Peptides were constructed as α -helices using Hyperchem 6.0 (Hypercube, Inc.) assigning values of ϕ and ψ angles of -58° and -47° , respectively (50). Conformation of backbone and side chains was optimized with Hyperchem by a conjugated gradient procedure using the AMBER 3 force field with termination conditions fixed to a root mean square gradient of $0.01\text{ kcal}/(\text{\AA} \cdot \text{mol})$. A systematic procedure was performed to predict the position of the peptide into the membrane. During this procedure, the peptide systematically moves from 40 to -40 \AA with

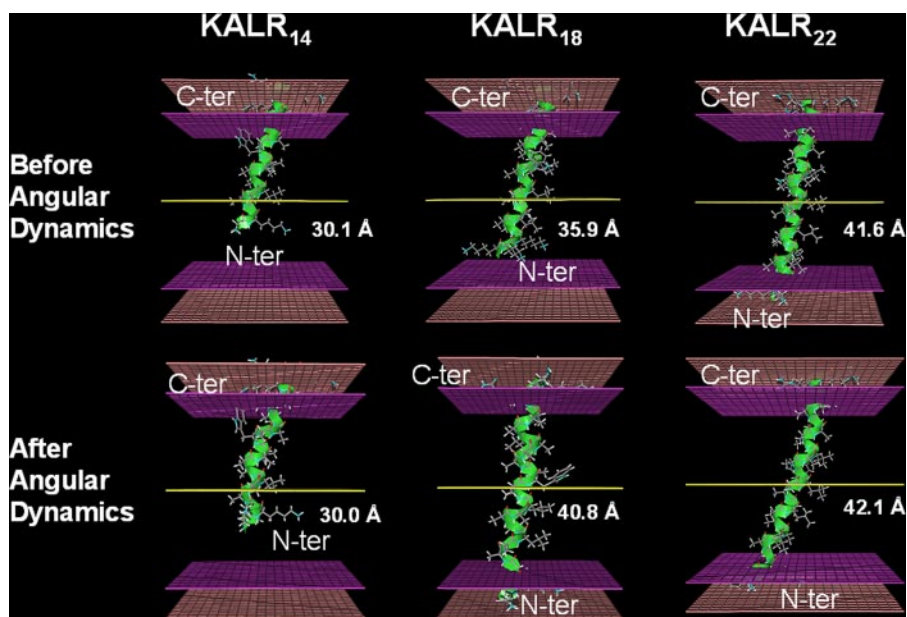


FIGURE 1. Best positions of KALRs in membrane as predicted by IMPALA before and after angular dynamics. For each peptide, N and C termini and lengths of the backbone are indicated. Yellow plane, bilayer center ($z = 0$); purple planes, lipid acyl chain/polar head group interfaces at 15.5 Å from the center; pink planes, lipid/water interfaces at 20 Å from the center.

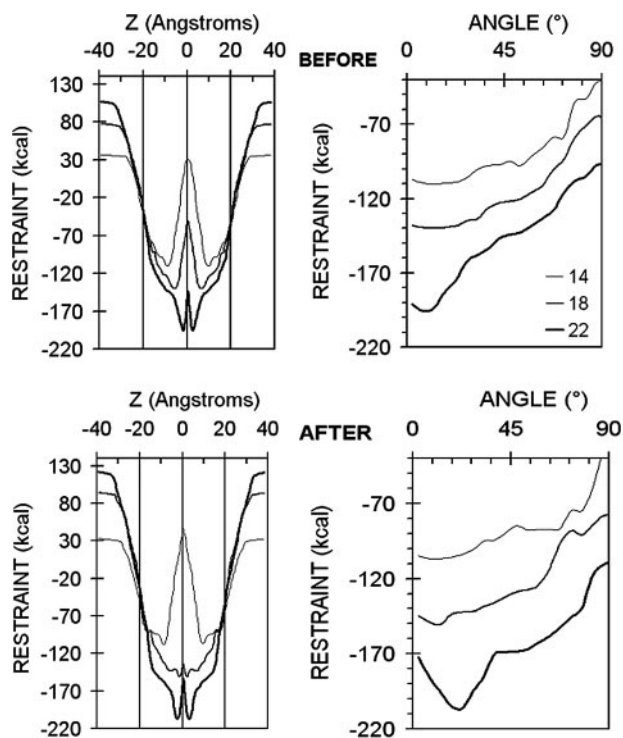


FIGURE 2. IMPALA restraints as a function of the peptide mass center penetration (left) and the peptide helix-axis angle (right) before and after angular dynamics. The helix-axis angle is calculated with respect to the normal to the membrane, and the mass center penetration is measured with respect to the membrane center. 14, KALR₁₄; 18, KALR₁₈; 22, KALR₂₂.

respect to the membrane center in steps of 1 Å. For each position along the z axis, 5000 random orientations are tested. At the end of the systematic analysis, the position and the orientation with minimal energy among the 405,000 positions tested are selected. The peptide structure was optimized by an angular

dynamics procedure taking into account the force field of the membrane as described by Lins *et al.* (58). Random rotations of 2° maximum and random translations of 0.1 Å maximum of the peptide are allowed. Calculations were performed on an Intel® Pentium® 4, CPU 3.80 GHz, 4.00 gigabytes of RAM. Graphs were drawn using WinMGM (59).

RESULTS

Study of KALRs in an Implicit Membrane Model—The IMPALA algorithm, which successfully predicted the interaction of many peptides with membranes (7, 8, 51, 60), was used to predict the interaction of the KALRs with a model membrane mimicking plasma membranes (Fig. 1). Each KALR was folded as a standard helix, and its interaction at all levels of the mem-

brane was analyzed by a systematic procedure. Then peptide was set at its best level of insertion and was left to adapt in the membrane by an angular dynamics procedure.

After angular dynamics, the three peptides remain mainly helical, although some structure adaptations occur to minimize the sum of intramolecular energy plus the IMPALA restraints (data not shown). The root mean square deviation values between the peptide backbone before and after angular dynamics are 1.1, 1.3, and 0.9 Å for KALR₂₂, KALR₁₈, and KALR₁₄, respectively. Structural changes of KALR₂₂ have a minor effect on the length of the peptide (elongation of 0.5 Å). KALR₁₈ length increases from 35.9 to 40.8 Å due to the transition from α -helix to more extended structures, especially at the N- and C-terminal extremities. Like KALR₂₂, KALR₁₄ undergoes relatively low backbone deformation and no elongation of structure (variation of 0.1 Å).

KALR₂₂, KALR₁₈, and KALR₁₄ angles, with respect to the membrane normal, are 10, 15, and 15° before angular dynamics, and 20, 10, and 10° afterward (Figs. 1 and 2). Thus, the three KALRs adopt a perpendicular orientation. However, the transmembranous status depends on the peptide. KALR₂₂ spans the entire membrane, similarly folded before and after structure optimization. Its mass center is 2 Å away from the membrane center (Figs. 1 and 2). Its polar extremities are outside the hydrophobic core of the membrane, and its hydrophobic core is inside. Before the angular dynamics, KALR₁₈ does not traverse the membrane and has its charged N-terminal extremity in the hydrophobic core of the membrane (Fig. 1). Its mass center is 6 Å away from the membrane center (Fig. 2). After the angular dynamics, it traverses the membrane due to peptide elongation. Its two polar extremities are located outside the hydrophobic core of the membrane (Fig. 1), and its mass center is closer to the membrane center (1 Å). Compared with KALR₁₈, the position of KALR₁₄ in the membrane does not

change after the angular dynamics. The peptide mass center is at 10 Å away from the membrane center (Fig. 2). In this position, the N-terminal extremity is exposed to the hydrophobic core of the membrane (Fig. 1). Hence, if all peptides are perpendicular to the membrane and two cross that membrane, one is restricted to one monolayer.

The energy profiles of KALR₂₂ in the membrane are similar before and after angular dynamics (Fig. 2). The peptide is well inserted into the membrane and does not need structural optimization to locate hydrophobic residues in the membrane core and hydrophilic residues at the interface. The energy profiles also show that the TM position is much more energetically favorable than non-TM positions. The energy profiles of KALR₁₈ are different before and after angular dynamics (Fig. 2). After optimization, the interaction of KALR₁₈ with the membrane is energetically more favorable than before, especially for TM positions with the mass centers of the peptide around the center of the membrane ($Z = 0$ Å). This is due to elongation of the peptide backbone and the consequent migration of the polar N-terminal extremity from the apolar membrane core to polar lipid head groups. The energy profiles of KALR₁₄ in the membrane are similar before and after angular dynamics (Fig. 2). Since the peptide can only traverse one monolayer, the interaction energy is much less favorable than for longer peptides, and interfacial positions are more stable than positions at the

center of the membrane. The ability of KALR₁₄ to adopt non-perpendicular positions is greater than for the other peptides.

Binding of KALRs to Membranes—The affinity of the three peptides for DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34/33/16/10/7, mol/mol/mol/mol/mol) SUVs was monitored by following the fluorescence of the central tryptophan residue (Table 1). When the peptide interacts with lipids, the tryptophan emission wavelength shifts from 350 to 335 nm (Fig. 3A). The binding of KALRs to membranes was measured at 335 nm upon titration with SUVs. An increase in the fluorescence intensity corresponds to an increase in the amount of membrane-bound peptides. For the three peptides, fluorescence increases when SUVs are added (Fig. 3B). All three peptides bind strongly to membranes, although with different affinities. The partition coefficients calculated from the curves are 7×10^5 , 2×10^6 , and 4.5×10^6 for KALR₁₄, KALR₁₈, and KALR₂₂, respectively. The data reveal a direct correlation between the peptide length and its binding capability; an increase in the peptide length by 4 residues results in about a 2.5-fold higher partition coefficient.

Structural Properties of KALRs—Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy was used to determine the structure of each KALR in TFE solvent and within membranes (Fig. 4, A and B). The spectral position of the amide I vibration, between 1615.5 and 1694.5 cm^{-1} , was used to characterize the conformation of the peptide backbone (48). No significant difference was observed between the three peptides in the different media (Fig. 4). Indeed, the bands are centered around 1655 cm^{-1} , indicating that they are mainly helical in TFE as well as in phospholipids (Figs. 4, A and B).

As shown in Fig. 4B, the intensity of the amide I absorption band is sensitive to the length of the peptide when inserted into lipids. A decrease in the band intensity is observed when the length of the peptide decreases, with a considerable decrease for the shortest peptide. Since the buffer gives no significant

TABLE 1
Sequence of KALR peptides

Shown are the sequences of KALR peptides. N and C termini of the peptides are free.

Peptide	Sequence
KALR ₁₄	KKKAALAAALWAALAAARRR
KALR ₁₈	KKKAALAAALAAWLAAALAAARRR
KALR ₂₂	KKKAALAAALAAALWAALAAALAAARRR

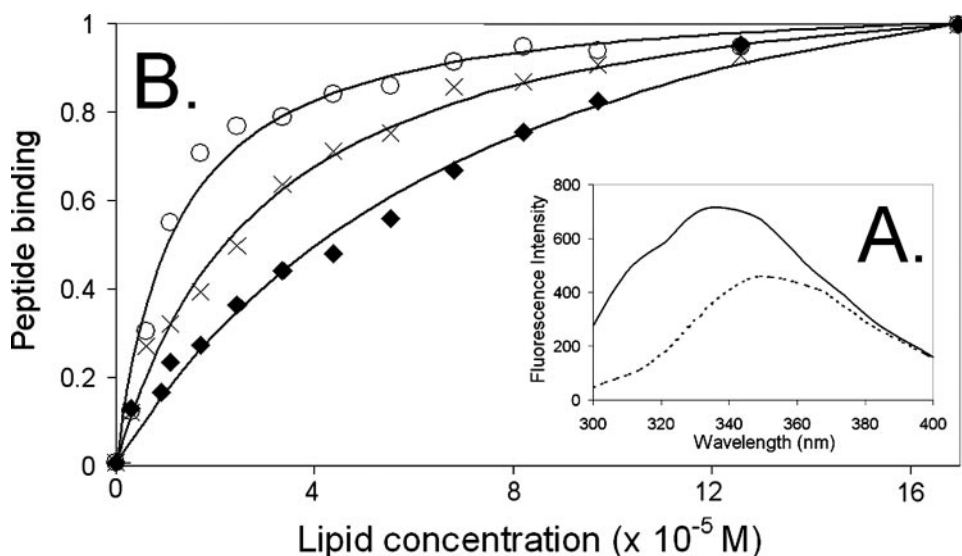


FIGURE 3. A, emission spectra of the KALR₂₂ peptide alone (dotted line) and in the presence of DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34/33/16/10/7 m/m) SUVs (full line). The excitation wavelength was set at 280 nm (8-nm slit). B, membrane binding affinity of KALR peptides. Increase in peptide fluorescence upon titration with DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34/33/16/10/7, mol/mol/mol/mol/mol) SUVs. The excitation wavelength was set at 280 nm (8-nm slit), and the excitation was recorded at 335 nm (8-nm slit). \blacklozenge , KALR₁₄ peptide; \times , KALR₁₈ peptide; \circ , KALR₂₂ peptide.

FTIR signal (data not shown), these data indicate that the longest peptide is the most inserted into the bilayer. From the FTIR spectra, we evaluated the relative insertion of each peptide into membranes (35). If we consider that the KALR₂₂ peptide has an insertion rate of 100, KALR₁₈ and KALR₁₄ have a relative rate of 90 and 40, respectively. In summary, the FTIR analysis reveals that KALR inserts into membranes as an α -helix conformation and that the amount of inserted peptides depends on its length.

Orientation of KALRs in the Bilayer—The orientation of peptides in lipid bilayers was calculated by recording the spectra obtained with polarized IR lights parallel and perpendicular with respect to the incidence plane. The amide I transition moment, around 1655 cm^{-1} , is parallel to the helix axis, whereas

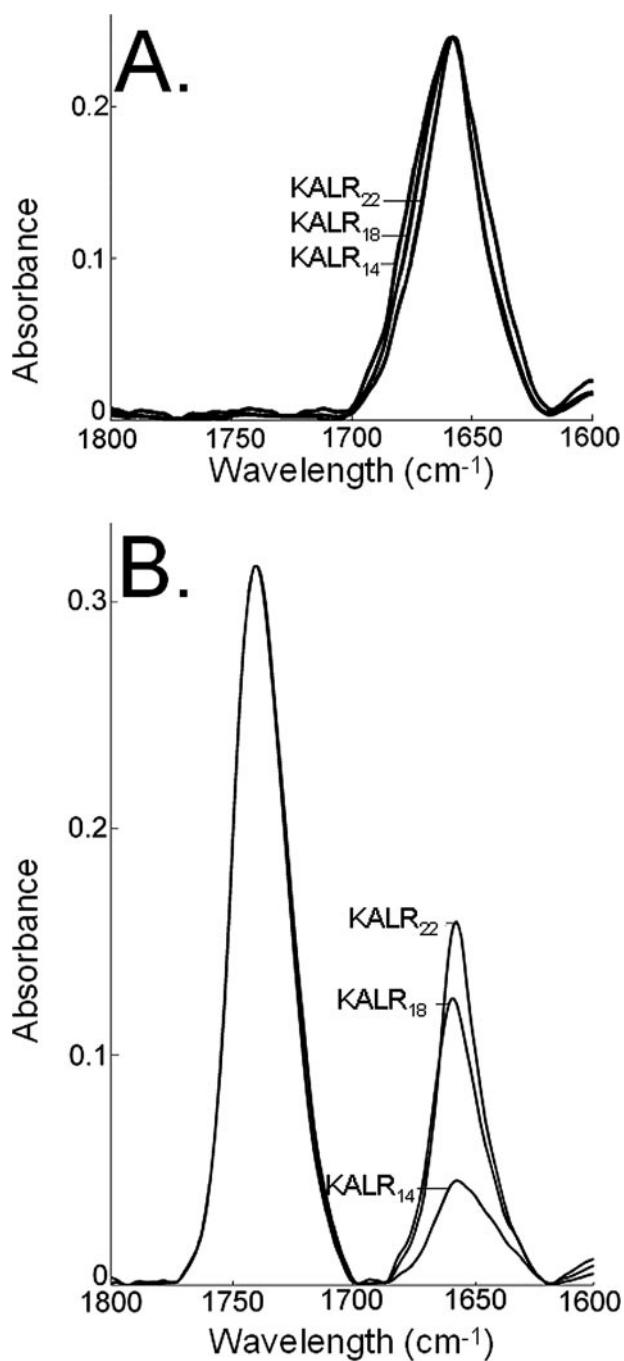


FIGURE 4. Infrared spectra of KALRs in TFE and in membranes. Infrared spectra of KALR₁₄, KALR₁₈, and KALR₂₂ in TFE (A) or inserted in CHOL/DOPC/DOPE/DOPG (40/34/16/10, mol/mol/mol/mol) LUVs (B).

the transition moment for $\nu_s(\text{CH}_2)$, around 2853 cm^{-1} , is perpendicular to the lipid chain axis. These bands were used to evaluate the orientation of the peptide helix axis and the lipid chain axis with respect to the germanium plate by calculating their dichroic ratios (48, 49). The R_{ATR} of the lipid $\nu_s(\text{CH}_2)$ is 1.43 for all peptides. This corresponds to an angle of $41 \pm 5^\circ$ between the acyl chain carbons and the normal to the germanium crystal (Table 2). This value is comparable with that obtained by Castano and Desbats with similar membranes (49). The R_{ATR} of the amide I band yields a helix axis angle of 53, 46, and $43 \pm 5^\circ$ compared with the germanium plate normal for

TABLE 2
Dichroic ratio and angle of the KALRs and phospholipid acyl chains with respect to the germanium plate

Shown are the dichroic ratio (R_{ATR}) and angle of the KALR α -helices and of phospholipid acyl chains with respect to the normal to the germanium plate.

Peptide	α -Helix		Phospholipids		α -Helix/phospholipid angle ^a
	R_{ATR}	Angle	R_{ATR}	Angle	
		degrees		degrees	degrees
KALR ₁₄	1.61	53 ± 5	1.43	41 ± 5	12 ± 10
KALR ₁₈	1.71	46 ± 5	1.43	41 ± 5	5 ± 10
KALR ₂₂	1.75	43 ± 5	1.43	41 ± 5	2 ± 10

^a Relative angle between the KALR α -helices and the phospholipid acyl chains.

KALR₁₄, KALR₁₈, and KALR₂₂, respectively. From these data, we can calculate that helix axes of KALR₁₄, KALR₁₈, and KALR₂₂ adopt a mean angle with respect to the membrane normal equal to 12 , 5 , and $2 \pm 10^\circ$, respectively (Table 2). ATR-FTIR spectra thus indicate that KALRs are perpendicular helices in membranes.

Studying the Fusogenic Properties of KALRs—We first studied the fusogenic capacity of peptides by measuring their ability to induce lipid mixing of liposomes (Fig. 5, A and B). KALR₁₄ induces no significant liposome lipid mixing, even after 10 min of incubation. The longer peptides, KALR₁₈ and KALR₂₂, induce lipid mixing of liposomes. The lipid mixing increases rapidly following the addition of KALR₂₂ and reaches a maximum after only 60 s. For KALR₁₈, the maximum is reached after 240 s. Analysis of lipid mixing at different peptide/lipid ratios confirmed that the smallest peptide has no significant effect as compared with the longer peptides and that KALR₂₂ induces more lipid mixing than KALR₁₈ irrespective of the peptide/lipid ratio (Fig. 5B). The lipid mixing induced by KALR₂₂ and KALR₁₈ increases with the peptide/lipid ratio and is maximal at a ratio of 0.04. Above this ratio, lipid mixing decreases. KALR₂₂ induces a maximal lipid mixing of about 50% of the liposomes.

To further investigate the membrane-destabilizing effect of KALRs, we carried out leakage assays. The addition of KALR₁₄ to membrane liposomes does not increase leakage, whereas the addition of KALR₁₈ or KALR₂₂ does (Fig. 5C). Similar to the lipid mixing assays, the process is dose-dependent with a maximum response for a peptide/lipid ratio of 0.04. Above this ratio, leakage decreases. KALR₂₂ also induces more leakage than KALR₁₈ irrespective of the peptide/lipid ratio and the incubation time (Fig. 5, C and D). KALR₂₂ induces a maximal leakage of about 80% of the liposomes.

To analyze the effect of KALRs on membranes, we observed LUVs by negative stain electron microscopy before and after the addition of peptides (peptide/lipid ratio = 0.04). Micrographs show that KALR₁₄ has no effect on LUVs (Fig. 6). The increase in vesicle size in the presence of KALR₁₈ demonstrates fusion. KALR₂₂ also increases vesicle size but to a larger extent.

DISCUSSION

In this paper, we examined the ability of hydrophobic TM model peptides with three hydrophobic core lengths to induce *in vitro* membrane fusion and its correlation with membrane binding, membrane insertion, and the ability to induce membrane destabilization. These peptides, called KALRs, are composed of hydrophobic residues (Ala and Leu residues) sur-

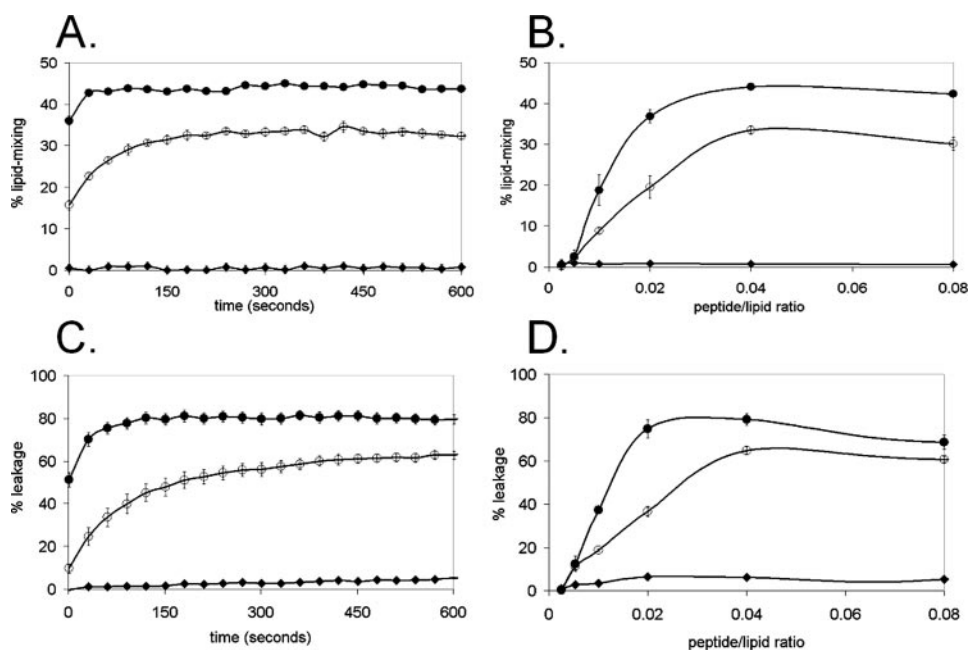


FIGURE 5. Liposome lipid mixing and leakage induced by KALRs. A, lipid mixing of DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34/33/16/10/7 mol/mol/mol/mol/mol) LUVs induced by KALRs as a function of time at a peptide/lipid ratio of 0.04. B, lipid mixing induced by KALRs as a function of the peptide/lipid ratio. C, time course of leakage of DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34/33/16/10/7, mol/mol/mol/mol/mol) LUVs induced by KALRs at a peptide/lipid ratio of 0.04. D, leakage induced by KALRs as a function of the peptide/lipid ratio. \blacklozenge , KALR₁₄; \circ , KALR₁₈; \bullet , KALR₂₂.

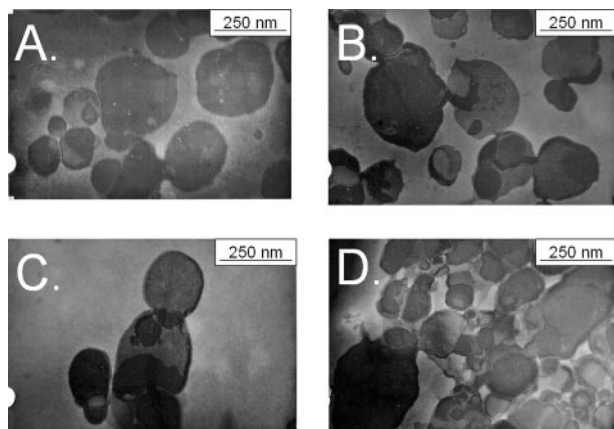


FIGURE 6. Electron microscopy images of negatively stained DOPC/CHOL/DOPE/DOPG/SM (34/33/16/10/7, mol/mol/mol/mol/mol) LUVs. A, in the absence of peptide. B, in the presence of KALR₁₄. C, in the presence of KALR₁₈. D, in the presence of KALR₂₂.

rounded by charged residues (Lys and Arg residues). The hydrophobic part is a repeat of 3, 4, and 5 AAAL motifs that result in a difference of approximately one turn of helix between peptides.

Effect of the Hydrophobic Core Length of KALR on Insertion into Membranes—Lipid-binding assays and infrared spectroscopy show that the ability of KALRs to bind to lipids and to be incorporated into membranes increases with the length of the hydrophobic core of the peptides. These results could simply be explained by the hydrophobicity of peptides. Indeed, the addition of one AAAL motif increases the peptide and the helix structure's hydrophobicity (as seen in Fig. 2), and as a result, affinity for lipids is multiplied by 2.5, as measured in the lipid-binding assays. However, the insertion rate of KALRs into

membranes calculated from FTIR spectra is not linearly related to the addition of AAAL motifs. Indeed, the insertion rate of KALR₁₄ is 40% that of KALR₂₂, whereas the insertion rate of KALR₁₈ is 90%. This indicates that insertion of KALR peptides into lipids is not simply governed by hydrophobicity.

The hydrocarbon thickness of a fully hydrated DOPC bilayer is 26.8–28.6 Å (16, 52, 53, 61–63). The addition of SM and cholesterol increases the thickness of the hydrophobic core of monounsaturated membranes by 2–4.1 Å (54–57). It was also shown that in some cases, SM and cholesterol can induce the formation of more rigid lipidic domains 3–10 Å thicker than the rest of the membrane (56, 64, 65). We can conclude from these data that at least a large part of our DOPC membrane has a hydrophobic thickness between 28.8 and 32.7 Å. Thicker rigid domains could be

present, but this cannot be assumed with certainty. That is why the membrane hydrophobic core is 31 Å thick in the molecular modeling simulation.

The first result of molecular modeling simulations is that all KALR helical peptides adopt a perpendicular orientation in membranes. This prediction is in accordance with the FTIR data of this study and with previous studies showing that Ala/Leu peptides of different lengths are transmembrane helices in membranes (11, 16, 17, 30, 35).

The second result of molecular modeling simulations is that the compatibility between membranes and peptides depends on the peptide length. KALR₂₂ matches the membrane thickness; it inserts the hydrophobic residues inside the membrane hydrophobic core and allows the hydrophilic residues to protrude from the membrane. In contrast, KALR₁₄ is too short to traverse the membrane even with structural adaptations; the N terminus is located in the membrane core, which is energetically unfavorable. This situation corresponds to a negative hydrophobic mismatch. In between, KALR₁₈ is too short to span the membrane as a standard α -helix, but structural optimization elongates the helix and suppresses this incompatibility. These results are consistent with previous studies of peptide-membrane hydrophobic mismatch. Small distortions of α -helix structure can occur at the extremities of a TM model peptide too short to span a membrane (16, 66). To reduce the mismatch, other adaptations, such as peptide oligomerization or lipid length reduction, can occur (for a review, see Ref. 16). However, when the mismatch is too great, the peptide is excluded from the membrane (23, 34). This would explain why the KALR₁₄ is much less inserted into the membrane than KALR₁₈ and KALR₂₂.

In conclusion, peptide-membrane interactions depend on peptide hydrophobicity and on the matching of peptide length with membrane thickness. Peptide hydrophobicity should mainly control its ability to bind to lipids. In addition, the peptide's length should affect the peptide's ability to insert into a membrane. KALR₁₈ should have reduced binding and insertion with respect to KALR₂₂ because of a lower hydrophobicity and of a small hydrophobic mismatch. The lower hydrophobicity and the large hydrophobic mismatch of KALR₁₄ should decrease its insertion into membranes.

Furthermore, this work serves as another piece of evidence that IMPALA can be used to predict how a peptide will interact with a membrane. IMPALA can predict the insertion and orientation, the impact on the peptide structure, and the degree of hydrophobic mismatch.

Effect of the Hydrophobic Core Length of KALR on Fusogenicity—Previous studies showed that peptides corresponding to the TM domain of the vesicular stomatitis virus G protein and of SNARE induce *in vitro* membrane fusion (67–69). It was proposed that the fusogenicity of TM domains depends on structural flexibility (67–69). The relationship between TM peptide fusogenicity and structural flexibility was further shown by using a TM model peptide with variable proportions of α -helix/ β -sheet-promoting residues (42). Here we showed that a TM model peptide can induce membrane fusion *in vitro* even if it contains only alanine and leucine α -helix-promoting residues (70–72) as long as the length of the hydrophobic core is sufficient.

Differential scanning calorimetry, NMR, x-ray, and ESR studies already revealed that the length of TM model peptides has an effect on their ability to destabilize membranes (14, 23, 24, 28, 39, 40, 73–80). In general, destabilization is observed when the peptide is too short to span the membrane (14, 28, 39, 40, 74, 75). The extent of destabilization is related to the extent of negative hydrophobic mismatch (14, 28, 39, 74, 75). Conversely, membrane destabilization was also reported for TM model peptides that match the membrane or that are slightly too long (23, 24, 28, 76, 78–80). In some cases, the destabilizing effect decreases when the peptide length decreases (23, 24, 76).

Our study goes in the same direction as the latter studies; the longer the peptide, the more it induces fusion *in vitro*. This could first be related to the number of membrane-inserted peptides. Destabilization of a membrane can be greater if more peptides insert into it (23, 24). Membrane destabilization would then increase with KALR length, because the quantity of inserted peptides increases with length. However, KALR₁₄ does not induce membrane fusion whenever its insertion rate is 40% of the KALR₂₂ rate. Hence, fusogenicity must be controlled by additional parameters whose insertion rate is also supported by the fact that many TM peptides are not fusogenic.

Molecular modeling results suggest that one of the parameters regulating fusogenicity might be peptide length. Indeed, KALR₁₄ spans only one monolayer of the membrane, whereas KALR₁₈ and KALR₂₂ can traverse the bilayer. It was previously shown that hemagglutinin of the influenza A virus needs to have a TM domain of at least 17 residues to efficiently promote full fusion (81). When the TM domain has only 16 or fewer residues, the hemagglutinin cannot promote full fusion (81).

Interestingly, the minimal length for fusogenicity is in the same range for different peptides: 17 residues for HA2 and between 14 and 18 residues for the KALR peptide. An effect of the length of the TM domain on the fusion process was also described previously for other viruses, such as human immunodeficiency virus (82), Foamy virus (83), murine coronavirus (84), and murine leukemia virus (85), and for SNARE protein (86, 87). The capacity to span the membrane might be an important parameter for inducing fusion.

Acknowledgments—We thank Prof. E. Goormaghtigh for advice on infrared spectroscopy and Dr. L. Lins for advice on molecular modeling.

REFERENCES

- Hauser, H., and Poupard, G. (2005) in *The Structure of Biological Membranes*, 2nd Ed. (Yeagle, P. L., ed) CRC Press LLC, Boca Raton, FL
- Eiler, S., Gangloff, M., Duclaud, S., Moras, D., and Ruff, M. (2001) *Protein Expression Purif.* **22**, 165–173
- Nakayama, M., and Ohara, O. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 825–830
- Martin, I., and Ruyschaert, J. M. (2000) *Biosci. Rep.* **20**, 483–500
- Busquets, M. A., Alsina, M. A., and Haro, I. (2003) *Curr. Drug Targets* **4**, 633–642
- Weiss, T. M., van der Wel, P. C. A., Killian, J. A., Koeppe, R. E., and Huang, H. W. (2003) *Biophys. J.* **84**, 379–385
- Lorin, A., Thomas, A., Stroobant, V., Brasseur, R., and Lins, L. (2006) *Chem. Phys. Lipids* **141**, 185–196
- Charloteaux, B., Lorin, A., Crowet, J. M., Stroobant, V., Lins, L., Thomas, A., and Brasseur, R. (2006) *J. Mol. Biol.* **359**, 597–609
- Davis, J. H., Clare, D. M., Hodges, R. S., and Bloom, M. (1983) *Biochemistry* **22**, 5298–5305
- Bechinger, B. (1996) *J. Mol. Biol.* **263**, 768–775
- Bechinger, B. (2001) *Biophys. J.* **81**, 2251–2256
- Zhao, J. B., Kimura, S., and Imanishi, Y. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1283**, 37–44
- Liu, L. P., Li, S. C., Goto, N. K., and Deber, C. M. (1996) *Biopolymers* **39**, 465–470
- Killian, J. A., Salemink, I., de Planque, M. R. R., Lindblom, G., Koeppe, R. E., and Greathouse, D. V. (1996) *Biochemistry* **35**, 1037–1045
- Lewis, R. N. A. H., Zhang, Y. P., Hodges, R. S., Subczynski, W. K., Kusumi, A., Flach, C. R., Mendelsohn, R., and McElhaney, R. N. (2001) *Biochemistry* **40**, 12103–12111
- de Planque, M. R. R., and Killian, J. A. (2003) *Mol. Membr. Biol.* **20**, 271–284
- Ozdirekcan, S., Rijkers, D. T. S., Liskamp, R. M. J., and Killian, J. A. (2005) *Biochemistry* **44**, 1004–1012
- Killian, J. A. (2003) *FEBS Lett.* **555**, 134–138
- Deber, C. M., Liu, L. P., Wang, C., Goto, N. K., and Reithmeier, R. A. F. (2002) *Curr. Top. Membr.* **52**, 465–479
- Rinia, H. A., Boots, J.-W. P., Rijkers, D. T. S., Kik, R. A., Snel, M. M. E., Demel, R. A., Killian, J. A., Van der Eerden, J. P. J. M., and De Kruijff, B. (2002) *Biochemistry* **41**, 2814–2824
- Chung, L. A., and Thompson, T. E. (1996) *Biochemistry* **35**, 11343–11354
- Percot, A., Zhu, X. X., and Lafleur, M. (1999) *Biopolymers* **50**, 647–655
- Harzer, U., and Bechinger, B. (2000) *Biochemistry* **39**, 13106–13114
- Lewis, R. N. A. H., Zhang, Y. P., Liu, F., and McElhaney, R. N. (2002) *Bioelectrochemistry* **56**, 135–140
- Sharpe, S., Barber, K. R., Grant, C. W. M., Goodyear, D., and Morrow, M. R. (2002) *Biophys. J.* **83**, 345–358
- Strandberg, E., Ozdirekcan, S., Rijkers, D. T. S., van der Wel, P. C. A., Koeppe, R. E., Liskamp, R. M. J., and Killian, J. A. (2004) *Biophys. J.* **86**, 3709–3721
- Sparr, E., Ash, W. L., Nazarov, P. V., Rijkers, D. T. S., Hemminga, M. A., Tieleman, D. P., and Killian, J. A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 39324–39331

28. Siegel, D. P., Cherezov, V., Greathouse, D. V., Koeppe II, R. V., Killian, J. A., and Caffrey, M. (2006) *Biophys. J.* **90**, 200–211
29. Killian, J. A., and Nyholm, T. K. M. (2006) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 473–479
30. Zhang, Y. P., Lewis, R. N. A. H., Henry, G. D., Sykes, B. D., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (1995) *Biochemistry* **34**, 2348–2361
31. Reithmeier, R. A. F. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 491–500
32. Vonheijne, G. (1994) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 167–192
33. de Planque, M. R. R., Boots, J. W. P., Rijkers, D. T. S., Liskamp, R. M. J., Greathouse, D. V., and Killian, J. A. (2002) *Biochemistry* **41**, 8396–8404
34. Ren, J. H., Lew, S., Wang, Z. W., and London, E. (1997) *Biochemistry* **36**, 10213–10220
35. de Planque, M. R. R., Goormaghtigh, E., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., Kruijtzter, J. A. W., Liskamp, R. M. J., de Kruijff, B., and Killian, J. A. (2001) *Biochemistry* **40**, 5000–5010
36. Moll, T. S., and Thompson, T. E. (1994) *Biochemistry* **33**, 15469–15482
37. Webb, R. J., East, J. M., Sharma, R. P., and Lee, A. G. (1998) *Biochemistry* **37**, 673–679
38. Zhang, Y. P., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (1992) *Biochemistry* **31**, 11579–11588
39. de Planque, M. R. R., Kruijtzter, J. A. W., Liskamp, R. M. J., Marsh, D., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., de Kruijff, B., and Killian, J. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20839–20846
40. Morein, S., Strandberg, E., Killian, J. A., Persson, S., Arvidson, G., Koeppe, R. E., and Lindblom, G. (1997) *Biophys. J.* **73**, 3078–3088
41. Morein, S., Killian, J. A., and Sperotto, M. M. (2002) *Biophys. J.* **82**, 1405–1417
42. Hofmann, M. W., Weise, K., Ollesch, J., Agrawal, P., Stalz, H., Stelzer, W., Hulsbergen, F., de Groot, H., Gerwert, K., Reed, J., and Langosch, D. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14776–14781
43. Mrsny, R. J., Volwerk, J. J., and Griffith, O. H. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **39**, 185–191
44. Schwarz, G., Stankowski, S., and Rizzo, V. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **861**, 141–151
45. Rizzo, V., Stankowski, S., and Schwarz, G. (1987) *Biochemistry* **28**, 2751–2759
46. Lear, J. D., and DeGrado, W. F. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6500–6505
47. Van Bambeke, F., Kerkhofs, A., Schanck, A., Remacle, C., Sonveaux, E., Tulkens, P. M., and Mingeot-Leclercq, M. P. (2000) *Lipids* **35**, 213–223
48. Goormaghtigh, E., Raussens, V., and Ruyschaert, J. M. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1422**, 105–185
49. Castano, S., and Desbat, B. (2005) *Biochim. Biophys. Acta* **1715**, 81–95
50. Creighton, T. E. (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed., pp. 182–186, W. H. Freeman and Co., New York
51. Ducarme, P., Rahman, M., and Brasseur, R. (1998) *Proteins* **30**, 357–371
52. Nagle, J. F., and Tristram-Nagle, S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 159–195
53. Kucerka, N., Tristram-Nagle, S., and Nagle, J. F. (2005) *J. Membr. Biol.* **208**, 193–202
54. Nezil, F. A., and Bloom, M. (1992) *Biophys. J.* **61**, 1176–1183
55. Cantor, R. S. (1999) *Biophys. J.* **76**, 2625–2639
56. Simons, K., and Vaz, W. L. C. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33**, 269–295
57. Salamon, Z., Devanathan, S., Alves, I. D., and Tollin, G. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 11175–11184
58. Lins, L., Charlotheaux, B., Heinen, A., Thomas, A., and Brasseur, R. (2006) *Biophys. J.* **90**, 470–479
59. Rahman, M., and Brasseur, R. (1994) *J. Mol. Graph.* **12**, 212–218
60. Lins, L., Charlotheaux, B., Thomas, A., and Brasseur, R. (2001) *Proteins* **44**, 435–447
61. Lewis, B. A., and Engelman, D. M. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 211–217
62. Tristram-Nagle, S., Petrache, H. L., and Nagle, J. F. (1998) *Biophys. J.* **75**, 917–925
63. Bystrom, T., Grobner, G., and Lindblom, G. (2003) *Colloids Surf.* **228**, 37–42
64. Milhiet, P. E., Domec, C., Giocondi, M. C., Van Mau, N., Heitz, F., and Le Grimellec, C. (2001) *Biophys. J.* **81**, 547–555
65. Saslowsky, D. E., Lawrence, J., Ren, X. Y., Brown, D. A., Henderson, R. M., and Edwardson, J. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26966–26970
66. Liu, F., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (2002) *Biochemistry* **41**, 9197–9207
67. Langosch, D., Crane, J. M., Brosig, B., Hellwig, A., Tamm, L. K., and Reed, J. (2001) *J. Mol. Biol.* **311**, 709–721
68. Langosch, D., Brosig, B., and Pipkorn, R. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 32016–32021
69. Dennison, S. M., Greenfield, N., Lenard, J., and Lentz, B. R. (2002) *Biochemistry* **41**, 14925–14934
70. Chakrabarty, A., Kortemme, T., and Baldwin, R. L. (1994) *Protein Sci.* **3**, 843–852
71. Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1998) *Biophys. J.* **75**, 422–427
72. Rohl, C. A., Fiori, W., and Baldwin, R. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3682–3687
73. Zhang, Y. P., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (1995) *Biochemistry* **34**, 2362–2371
74. Killian, J. A., De Planque, M. R. R., Van der Wel, P. C. A., Salemink, I., De Kruijff, B., Greathouse, D. V., and Koeppe, R. E., II (1998) *Pure Appl. Chem.* **70**, 75–82
75. Morein, S., Koeppe, R. E., Lindblom, G., de Kruijff, B., and Killian, J. A. (2000) *Biophys. J.* **78**, 2475–2485
76. Liu, F., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (2001) *Biochemistry* **40**, 760–768
77. Liu, F., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (2004) *Biochemistry* **43**, 3679–3687
78. van der Wel, P. C. A., Pott, T., Morein, S., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., and Killian, J. A. (2000) *Biochemistry* **39**, 3124–3133
79. Zhang, Y. P., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (2001) *Biochemistry* **40**, 474–482
80. Strandberg, E., Morein, S., Rijkers, D. T. S., Liskamp, R. M. J., van der Wel, P. C. A., and Killian, J. A. (2002) *Biochemistry* **41**, 7190–7198
81. Armstrong, R. T., Kushnir, A. S., and White, J. M. (2000) *J. Cell Biol.* **151**, 425–437
82. Owens, R. J., Burke, C., and Rose, J. K. (1994) *J. Virol.* **68**, 570–574
83. Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A., and Lindemann, D. (2000) *J. Virol.* **74**, 4474–4482
84. Bos, E. C., Heijnen, L., Luytjes, W., and Spaan, W. J. (1995) *Virology* **214**, 453–463
85. Ragheb, J. A., and Anderson, W. F. (1994) *J. Virol.* **68**, 3207–3219
86. Saifee, O., Wei, L. P., and Nonet, M. L. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 1235–1252
87. Xu, Y. B., Zhang, F., Su, Z. L., Mcnew, J. A., and Shin, Y. K. (2005) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 417–422

IV. DISCUSSION GENERALE

La fusion membranaire est impliquée dans de nombreux phénomènes liés à la vie ou à la mort cellulaire. Dans le cas de l'infection virale, les protéines responsables de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique ont été identifiées pour de nombreux virus. Les régions de ces glycoprotéines intervenant dans la déstabilisation et la fusion des membranes ont été déterminées par mutations des glycoprotéines entières et/ou par analyse de la fusogénicité de peptides correspondant à ces régions (cf. chapitres 3. p.17 et 4. p.27). Une première région, appelée « peptide de fusion », fut ainsi identifiée comme étant indispensable à la fusion et intervenant directement dans la fusion. Depuis la découverte des peptides de fusion, d'autres régions, comme le domaine transmembranaire, ont également été décrites comme intervenant directement dans la fusion virale.

Malgré ces avancées, à l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires intervenant lors de la fusion virale ne sont pas connus de manière précise. Afin de mieux comprendre le mode d'action des glycoprotéines lors de la fusion, les peptides de fusion et peptides transmembranaires ont été étudiés dans ce travail.

1. Conclusions sur l'étude des peptides de fusion

Les peptides de fusion sont les régions des glycoprotéines de fusion virales les plus étudiées. Pour mieux comprendre le mode d'action de cette région lors de la fusion, des peptides synthétiques correspondant à ces régions ont été étudiés. Ces peptides sont capables à eux seuls d'induire la fusion et la perméabilisation de membranes modèles (cf. chapitre 3.2. p.21). La bonne corrélation entre les expériences réalisées sur les peptides de fusion de synthèse et celles réalisées sur les glycoprotéines entières indiquent que les peptides de synthèse sont de bons modèles pour étudier le rôle de la région protéique correspondante dans la fusion virale (cf. chapitre 3. p.17).

Les peptides de fusion synthétiques induisent la fusion en s'insérant dans les membranes (cf. chapitre 3.2. p.21). Par modélisation moléculaire, il a d'abord été montré que de nombreux peptides de fusion adoptent une orientation oblique sous forme hélicoïdale dans les membranes (Brasseur et al., 1988a, 1998b ; Horth et al., 1991 ; Vonèche et al., 1992 ; Brasseur, 2000 ; Lins et al., 2001). Des analyses par ATR-FTIR, RMN, EPR ou diffraction de neutrons ont par la suite confirmé que certains peptides de fusion adoptent ce mode d'orientation dans la membrane ou dans des milieux mimant les propriétés membranaires comme les micelles (Martin et al., 1994, 1996 ; Luneberg et al., 1995 ; Bradshaw et al., 2000 ; Han et Tamm, 2000). Ces peptides de fusion font donc partie de la classe des « peptides

obliques ». Les peptides obliques sont des peptides qui, repliés en hélice α , présentent une distribution asymétrique d'hydrophobicité le long de cette hélice. Cette propriété particulière est à l'origine de leur insertion membranaire oblique (Brasseur, 2000). Les analyses par approches expérimentales et/ou modélisation moléculaire ont également montré une corrélation entre l'obliquité des peptides obliques, dont les peptides de fusion du HIV-1 et de SIV, et leur capacité à induire la fusion de membranes *in vitro* (Martin et al., 1994, 1996 ; Maddox et Longo, 2002 ; Pillot et al., 1996, 1997 ; Lambert et al., 1998 ; Perez-Mendez et al., 1998 ; Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2002). Dans le cadre de cette thèse de doctorat, nous avons également observé une relation entre l'obliquité du peptide de fusion du BLV et sa fusogénicité. En effet, l'analyse *in silico* indique que ce peptide est capable de s'orienter obliquement dans la membrane sous conformation hélicoïdale. Les mesures de fusion de phase lipidique et de perméabilité de liposomes indiquent qu'il déstabilise et induit la fusion de membranes. Un mutant de ce peptide, également prédit comme oblique, est aussi capable de déstabiliser les membranes et d'induire leur fusion. Par contre, un mutant du peptide sauvage perdant son caractère oblique dans la membrane est incapable de déstabiliser et faire fusionner des liposomes. Cette étude ainsi que les études précédentes indiquent qu'un des modes de déstabilisation membranaire qu'adoptent les peptides pour induire la fusion est leur l'insertion oblique sous forme hélicoïdale. Une insertion membranaire oblique sous forme hélicoïdale a d'ailleurs également été mesurée pour d'autres peptides fusogènes non viraux (Martin et al., 1998 ; Afonin et al., 2004).

Des études précédentes indiquent également une relation entre la fusogénicité des glycoprotéines virales et la capacité des peptides de fusion synthétiques correspondants à s'insérer obliquement dans la membrane (Horth et al., 1991 ; Vonèche et al., 1992). Nos études sur les peptides de fusion de BLV et HIV-1 montrent la même relation. En effet, des mutations qui diminuent la fusogénicité des glycoprotéines de fusion de ces deux virus diminuent également l'obliquité du peptide de fusion prédite par IMPALA. Ces résultats suggèrent que lors de la fusion virale, le peptide de fusion de la glycoprotéine déstabiliserait la membrane cible en utilisant le même mécanisme que le peptide synthétique correspondant : s'insérer obliquement sous forme hélicoïdale. Il a d'ailleurs été montré que le remplacement du peptide de fusion de la glycoprotéine de fusion du BLV par celui du SIV, également oblique, n'affecte pas la fusion (Vonèche et al., 1992). Cette relation entre l'obliquité d'une région protéique et la fonction de la protéine entière a également été observée pour une protéine autre que les protéines de fusion virales. En effet, des mutations perturbant

l'obliquité du peptide oblique de la prolactine diminuent la fonction antiangiogénèse de cette protéine (Nguyen et al., 2006).

Des études précédentes ont montré une importance de la longueur des peptides de fusion pour leurs propriétés fusogènes (Martin et al., 1991 ; Duzgunes et Shavnin, 1992 ; Adam et al., 2004). Il a ainsi été montré que le peptide correspondant aux 12 premiers résidus de la gp32 du SIV induit plus de fusion *in vitro* que le peptide constitué des 16 ou 24 premiers résidus (Martin et al., 1991). Dans le cas du virus de l'influenza A, le peptide composé des 17 premiers résidus de HA2 induit plus de fusion *in vitro* que ceux contenant les 7 ou 10 premiers résidus (Duzgunes et Shavnin, 1992). L'équipe du professeur Brasseur a, quant à elle, montré que le domaine du peptide de fusion d'Ebola suffisant pour induire la fusion *in vitro* est plus petit que la séquence préalablement définie (Adam et al., 2004). Toutefois, pour ces virus ainsi que pour les autres virus, la séquence du peptide de fusion minimal qui induit une fusion significative n'a jamais été déterminée. Dans ce travail, nous avons développé une méthode de prédiction originale qui se base sur la relation obliquité-fusogénicité des peptides obliques pour déterminer ces « peptides de fusion minimaux ». Notre méthode propose que le peptide de fusion minimal corresponde au plus petit peptide hélicoïdal adoptant un angle d'insertion membranaire oblique optimal (angle le plus proche de 45°). L'algorithme IMPALA a été utilisé pour prédire ce peptide. Notre méthode prédit que le peptide de fusion minimal du HIV-1 correspond aux 12 premiers résidus de gp41 alors que celui du BLV correspond aux 15 premiers résidus de gp30. Des mesures de fusion de phase lipidique et de perméabilité de liposomes confirment que ces deux peptides sont les peptides de fusion minimaux de ces deux virus. En effet, ces deux peptides induisent plus de fusion et de perméabilisation de liposomes *in vitro* que des peptides plus petits mais en induisent autant que des peptides plus longs. Les peptides de 12 et 15 résidus sont donc bien les peptides de fusion minimaux respectivement du HIV-1 et du BLV.

Notre méthode de prédiction considère que les peptides de fusion s'insèrent dans la membrane sous forme hélicoïdale. Nos mesures FTIR indiquent que le peptide de fusion du BLV adopte une conformation hélicoïdale dans les membranes. Une insertion sous forme hélicoïdale a également été mesurée expérimentalement pour le peptide de fusion du HIV-1 (Gordon et al., 1992, 2002, 2004 ; Martin et al., 1996).

En plus de leur capacité à déstabiliser les membranes et à s'orienter obliquement dans celles-ci sous forme hélicoïdale, les peptides de fusion ainsi que les autres peptides obliques

présentent une flexibilité structurale (Brasseur, 2000). L'environnement intervient donc sur la structure de ces peptides. Par exemple, le peptide de fusion du virus de l'influenza A n'adopte pas de conformation définie en solution alors que dans les membranes, il adopte une structure majoritairement hélicoïdale (Tamm et Han, 2000). Selon la composition membranaire ou le rapport peptide/lipide, le peptide de fusion du HIV-1 adopte une structure α , β ou un mélange de ces deux structures dans les membranes (Gordon et al., 1992, 2002, 2004 ; Martin et al., 1996 ; Pereira et al., 1997 ; Yang et al., 2001 ; Sackett et Shai, 2003, 2005 ; Castano et Desbat, 2005 ; Saez-Cirion et Nieva, 2002). Une augmentation du rapport peptide/lipide induit également une augmentation de la proportion en structure β du peptide de fusion du SIV (Martin et al., 1994). De nombreuses études suggèrent que cette flexibilité structurale intervienne dans les propriétés fusogènes des peptides obliques et en particulier des peptides de fusion (Durell et al., 1997 ; Davies et al., 1998 ; Longo et al., 1998 ; Rodriguez-Crespo et al., 1999 ; Wong, 2003). Nous avons montré lors de ce travail que le peptide caméléon, un peptide *de novo* connu pour sa labilité structurale, est un peptide oblique et donc induit la fusion et la perméabilisation de liposomes. Ce résultat conforte l'hypothèse d'une relation entre la flexibilité d'un peptide et sa fusogénicité. D'autres études ont également suggéré que la labilité structurale intervienne dans les propriétés fusogènes de peptides autres que les peptides obliques (Langosch et al., 2001a ; Hofmann et al., 2004). Dans le cas des peptides obliques, cette labilité structurale permettrait aux peptides d'adopter, au moins de manière transitoire, une structure hélicoïdale fusogène dans les membranes.

Le fait que le peptide caméléon, qui est capable d'adopter deux structures totalement différentes selon son positionnement dans la protéine GB1, soit un peptide oblique, ainsi que la présence de peptides obliques au sein de protéines subissant une transconformation, comme PrP, A β ou l' α -synucléine, posent également la question de l'implication des peptides obliques dans la transconformation des protéines (Pillot et al., 1996, 1997 ; Crowet et al., 2007). La labilité structurale des peptides obliques et/ou leur capacité à déstabiliser une interface hydrophobe/hydrophile (comme le sont les protéines) pourrait aider dans le processus de transconformation en diminuant la barrière énergétique nécessaire (Brasseur, 2000).

2. Conclusions sur l'étude des peptides transmembranaires modèles

Les glycoprotéines de fusion sont ancrées via leur domaine transmembranaire à l'enveloppe virale, qui et une des deux membranes subissant la fusion membranaire lors de

l'infection virale. De nombreuses études indiquent que ce domaine intervient directement lors de la fusion (Helseth et al., 1990 ; Owens et al., 1994 ; Bos et al., 1995 ; Caballero et al., 1998 ; Taylor et Sanders, 1999 ; Melikyan et al., 1999, 2000 ; Pietschmann et al., 2000 ; Miyauchi et al., 2005). Il a également été montré que le domaine transmembranaire de la protéine Snc2p qui intervient au niveau de la fusion entre les vésicules intracellulaires et la membrane plasmique cellulaire est indispensable au bon déroulement de cette fusion (Xu et al., 2005). Afin d'analyser l'implication potentielle des domaines transmembranaires sur la fusion, nous avons étudié l'interaction d'un peptide transmembranaire modèle avec la membrane. Un peptide hélicoïdal modèle a été préféré à un peptide correspondant au domaine transmembranaire d'une protéine fusogène dans le but d'analyser l'impact d'un paramètre particulier : la longueur du cœur hydrophobe. Le peptide utilisé, appelé KALR, contient un cœur hydrophobe composé d'alanines et de leucines, qui mime mieux l'hydrophobicité moyenne des domaines transmembranaires naturels qu'un cœur uniquement composé de leucines (Zhang et al., 1995 ; De Planque et Killian, 2003). Ce cœur est entouré, de part et d'autre, par trois résidus chargés positivement qui miment les régions entourant les domaines transmembranaires naturels (Vonheijne, 1994 ; Reithmeier, 1995). Les analyses ATR-FTIR et IMPALA indiquent que KALR adopte une orientation transmembranaire sous forme hélicoïdale dans la membrane. Ce peptide est donc un bon modèle de peptide transmembranaire hélicoïdal, comme de nombreux autres peptides dont le cœur hydrophobe est composé d'alanines et de leucines (Zhang et al., 1995 ; Bechinger, 2001 ; De Planque et Killian, 2003 ; Ozdirekcan, et al., 2005). Nos tests *in vitro* montrent que KALR est capable d'induire la fusion de liposomes. L'équipe de Langosch a également montré que des peptides transmembranaires modèles pouvaient induire la fusion de liposomes (Hofmann et al., 2004). Toutefois, notre étude montre qu'un peptide composé seulement d'acides aminés promoteurs d'hélices induit la fusion alors que Langosch et ses collègues ont montré la nécessité d'avoir des résidus promoteurs de la structure β . Ces différences de résultats indiquent que dans certaines conditions, la flexibilité structurale est nécessaire à la fusogénicité des peptides transmembranaires. Il a d'ailleurs été montré que le potentiel fusogène des peptides correspondant aux domaines transmembranaires de la glycoprotéine de fusion du VSV et de la protéine SNARE (impliquée dans la fusion cellulaire) est relié à leur flexibilité (Langosch et al., 2001a, 2001b ; Dennison et al., 2002). Dans notre cas, la flexibilité ne semble pas intervenir dans les propriétés fusogènes de KALR.

Des études précédentes ont montré que les glycoprotéines doivent contenir un domaine transmembranaire suffisamment long pour induire une fusion complète et optimale

(Owens et al., 1994 ; Bos et al., 1995 ; Pietschmann et al., 2000 ; Melikyan et al., 2000 ; Armstrong et al., 2000). Dans notre étude, nous avons fait varier la longueur du cœur hydrophobe de KALR et analysé ses propriétés membranaires et fusogènes. Nos résultats montrent que lorsque KALR est trop court pour traverser la membrane sous forme hélicoïdale, ce peptide peut se déformer légèrement et localement pour lui permettre de traverser entièrement la membrane. De telles déformations ont précédemment été mesurées au niveau des extrémités de peptides transmembranaires hélicoïdaux modèles en situation de mismatch négatif (Liu et al., 2002). Toutefois, lorsque l'épaisseur membranaire est trop importante par rapport à la longueur du peptide, KALR s'insère alors beaucoup moins dans la membrane. Cette diminution d'insertion empêche le positionnement, énergétiquement défavorable, des résidus hydrophiles chargés de KALR au niveau du cœur hydrophobe de la membrane. Des études expérimentales précédentes ont également montré qu'un peptide transmembranaire trop court pour traverser la membrane s'y insère beaucoup moins qu'un peptide assez long pour traverser la membrane (Harzer et Bechinger, 2000 ; De Planque et al., 2001 ; Lewis et al., 2002). Ces résultats obtenus avec des peptides transmembranaires modèles peuvent être reliés à ceux montrant qu'une forte diminution de la longueur du domaine transmembranaires de gp41 et de HA2 diminue la présence de ces glycoprotéines de fusion virales au niveau membranaire (Owens et al., 1994 ; Armstrong et al., 2000).

Nos résultats indiquent que la longueur du cœur hydrophobe du peptide transmembranaire modèle intervient également dans ses propriétés fusogènes. En effet, lorsque KALR est capable de traverser les membranes, il induit la fusion et la perméabilisation de celles-ci. Par contre, lorsqu'il est trop court pour traverser la membrane, il est incapable d'induire la fusion et la perméabilisation. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes montrant que des peptides assez longs pour traverser la membrane induisent plus de déstabilisation membranaire que des peptides plus courts (Harzer et Bechinger, 2000 ; Liu et al., 2001 ; Lewis et al., 2002). Toutefois, d'autres études montrent le contraire : des peptides trop courts pour traverser la membrane déstabilisent plus la membrane que des peptides traversant la membrane (Killian et al., 1996, 1998 ; De Planque et al., 1999 ; Morein et al., 2000 ; Siegel et al., 2006). Il est possible que les différences de séquence au niveau des peptides transmembranaires modèles, notamment la nature des résidus entourant le cœur hydrophobe, soient à l'origine de ces résultats différents. D'ailleurs, l'importance des charges terminales positives dans la fusogénicité d'un peptide transmembranaire de 16 résidus a récemment été montrée (Hofmann et al., 2007).

Dans notre étude, la différence d'insertion explique en partie la différence de fusogénicité entre les peptides. D'autres études indiquent également que la déstabilisation membranaire est plus importante lorsque la quantité de peptides insérés augmente (Harzer et Bechinger, 2000 ; Lewis et al., 2002). Toutefois, nos résultats suggèrent que la différence de fusion est également due à la capacité des peptides à interagir avec les deux monocouches de la membrane. Le peptide trop court pour interagir avec les deux monocouches est incapable d'induire la fusion et la perméabilisation de liposomes alors que les deux peptides plus longs qui interagissent avec les deux monocouches en sont capables. Cette suggestion est en accord avec des études précédentes qui montrent que la diminution du domaine transmembranaire de glycoprotéines de fusion diminue la fusogénicité de ces glycoprotéines (Owens et al., 1994 ; Bos et al., 1995 ; Pietschmann et al., 2000 ; Melikyan et al., 2000 ; Armstrong et al., 2000). Dans le cas de HA2, Armstrong et ses collègues (2000) ont montré que le domaine transmembranaire devait contenir au moins 17 résidus pour que la fusion soit complète. Il est intéressant de remarquer que la longueur minimale nécessaire à la fusion est dans la même fourchette de longueur pour le domaine transmembranaire de HA2 et pour le peptide KALR : 17 résidus pour le premier et entre 14 et 18 résidus pour le second. La capacité du domaine ou peptide transmembranaire à traverser la membrane serait un paramètre important pour la fusion.

3. Implication du peptide de fusion et du domaine transmembranaire dans la fusion virale

Nos études ont été réalisées sur des peptides correspondant à des régions de glycoprotéines virales ou sur des peptides modèles. L'effet des autres régions protéiques, mais également d'autres protéines ou de molécules présentes au niveau cellulaire n'est donc pas pris en compte. Toutefois, la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus sur les glycoprotéines entières laisse penser que les peptides étudiés miment relativement bien ce qui se déroule au niveau des régions de la glycoprotéine entière correspondantes. De plus, des études précédentes ont également montré la bonne corrélation entre les résultats obtenus sur des peptides correspondant à une région des glycoprotéines virales et ceux obtenus sur les glycoprotéines virales entières (Martin et al., 1994, 1996 ; Rapaport et Shai, 1994 ; Schaal et al., 1995 ; Mobley et al., 1995, 1999 ; Shai, 2000 ; Nieva et Agirre, 2003 ; Peisajovich et Shai, 2003 ; Sainz et al., 2005).

A la suite de ce travail, nous proposons donc un modèle de l'interaction membranaire du peptide de fusion et du domaine transmembranaire des glycoprotéines de fusion virales de classe 1 (cf. Figure 13). Lorsque les glycoprotéines adoptent la conformation étirée, les peptides de fusion s'insèrent dans la membrane de la cellule cible. Ils adoptent tout d'abord une conformation hélicoïdale orientée obliquement dans la monocouche externe (Figure 13A). Cette insertion particulière provoque alors une déstabilisation des chaînes acylées de cette monocouche membranaire. Un désordre des chaînes acylées a d'ailleurs été mesuré lorsque le peptide de fusion du HIV-1 est inséré dans les membranes sous conformation hélicoïdale (Castano et Desbat, 2005). Ces perturbations lipidiques induiraient une courbure négative de la membrane et ainsi l'apparition de protrusions (Figure 13B). Il a précédemment été montré que les peptides de fusion du virus de l'influenza A, du SIV, du HIV-1 et du FLV favorisent la courbure négative de bicouches et que le peptide de fusion du HIV-1 induit la formation de protrusions au niveau de liposomes (Eband et Eband, 1994 ; Eband et al., 1994 ; Colotto et al., 1996 ; Eband, 1998 ; Davies et al., 1998 ; Agirre et al., 2000). Le domaine transmembranaire interviendrait quant à lui dans la déstabilisation de l'enveloppe virale. Par rapport au peptide de fusion qui n'interagirait et ne déstabiliserait qu'une seule monocouche de la membrane plasmique, le domaine transmembranaire déstabiliserait les deux monocouches de l'enveloppe virale (Figure 13A). Cette déstabilisation permettrait l'apparition de protrusions au niveau de l'enveloppe virale et la fusion de la monocouche externe de l'enveloppe virale avec celle de la membrane cellulaire déstabilisée par le peptide de fusion (Figures 13B et C). De nombreuses études ont montré qu'une diminution de la longueur du domaine transmembranaire des glycoprotéines virales empêche la fusion d'être complète (Owens et al., 1994 ; Bos et al., 1995 ; Pietschmann et al., 2000 ; Melikyan et al., 2000 ; Armstrong et al., 2000). Ce raccourcissement diminuerait la surface d'interaction du domaine transmembranaire avec l'enveloppe virale, diminuant du même coup la déstabilisation de l'enveloppe. L'enveloppe virale ne serait alors pas suffisamment déstabilisée pour permettre la fusion de sa monocouche externe avec celle de la membrane plasmique. Cette proposition est en accord avec nos résultats montrant qu'aucun mélange lipidique n'est mesuré lorsqu'un peptide transmembranaire n'interagit qu'avec une seule monocouche. Le changement de conformation des glycoprotéines de fusion de la conformation étirée à la conformation post-fusion interviendrait également dans la mise en contact des deux membranes et la fusion des monocouches externes.

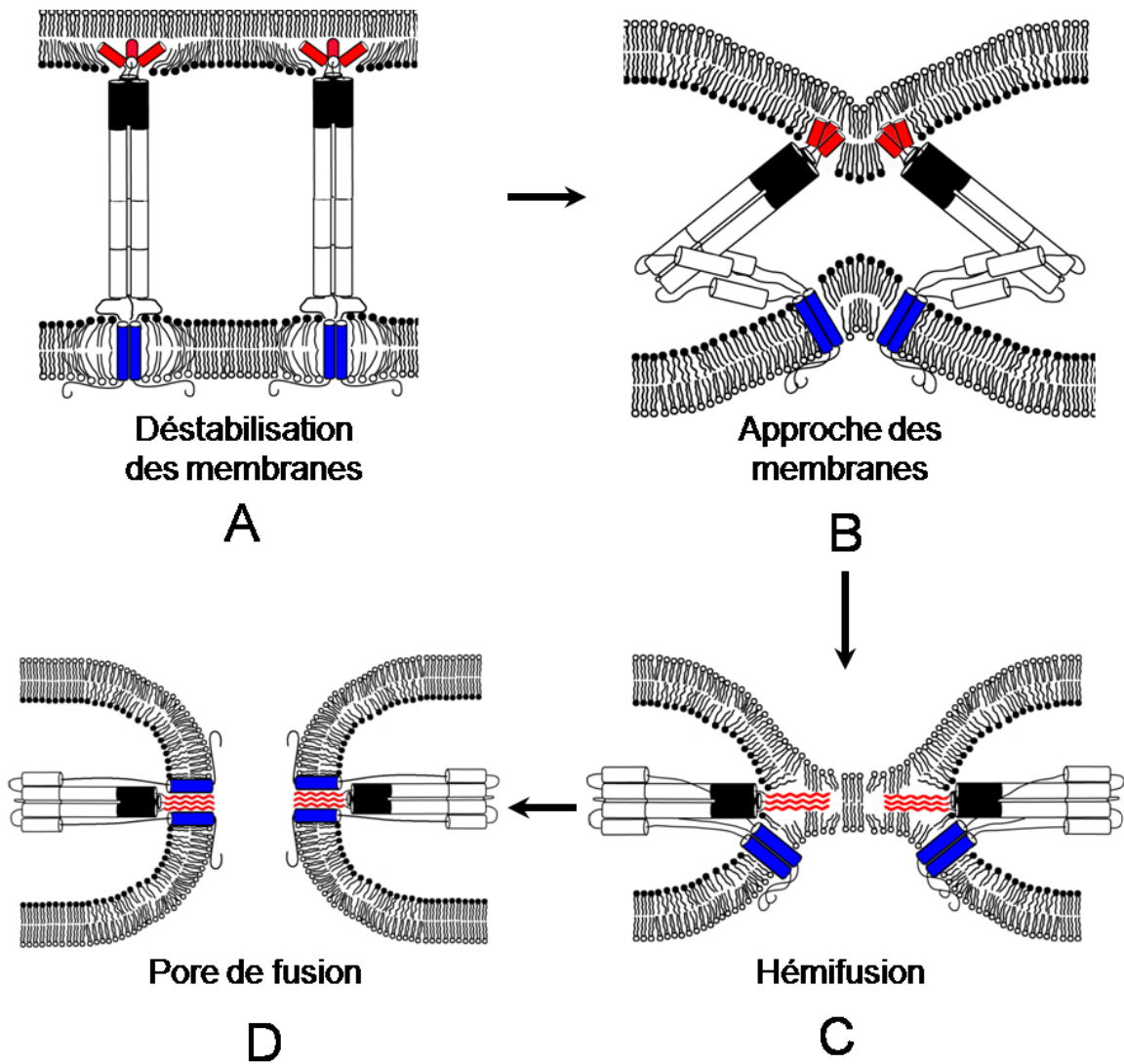


Figure 13 : Modèle du mode d'action du peptide de fusion (en rouge) et du domaine transmembranaire (en bleu) des glycoprotéines de fusion virales de classe 1 lors de la fusion membranaire.

Les peptides de fusion et les domaines transmembranaires interviendraient également dans la transition hémifusion-pore de fusion (Figures 13C et D). En effet, des mutations au sein d'une de ces deux régions peuvent bloquer la fusion au stade hémifusion (Qiao et al., 1999 ; Melikyan et al., 1999). Les peptides de fusion adopteraient une structure β étirée qui leur permettrait d'interagir et de déstabiliser les monocouches internes de la structure hémifusionnée, ce qu'ils ne pourraient pas réaliser sous structure hélicoïdale (Figure 13C). Il a d'ailleurs été mesuré que le peptide de fusion du HIV-1 induit une plus grande désorganisation des chaînes lipidiques sous conformation β que sous forme hélicoïdale (Castano et Desbat, 2005). Cette proposition est également en accord avec les résultats de l'équipe de Cladera qui montrent que la fusion de phase lipidique entre liposomes induite par

le peptide de fusion du HIV-1 est reliée au changement de ce peptide d'une structure hélicoïdale à une structure β (Buzon et al., 2005). L'adoption de la conformation β serait induite par une modification de l'environnement lipidique proche des peptides lors de la mise en contact des membranes et de la fusion de leurs monocouches externes. Cette transition serait également induite par un rapprochement des peptides de fusion. Il a d'ailleurs été montré que l'oligomérisation du peptide de fusion du HIV-1, que ce soit par augmentation du rapport peptide/lipide, par liaison entre peptides de fusion ou par liaison du peptide de fusion à des motifs d'oligomérisation, augmente sa proportion de structure β (Martin et al., 1996 ; Castano et Desbat, 2005 ; Sackett et Shai, 2005).

Le domaine transmembranaire interviendrait également dans la déstabilisation de la structure d'hémifusion. Son passage de l'enveloppe virale vers la structure d'hémifusion déstabiliserait le cœur de l'intermédiaire de fusion et favoriserait la fusion des monocouches internes. Par contre, un domaine transmembranaire trop court localisé seulement dans la monocouche externe serait incapable de déstabiliser le cœur de cet intermédiaire. Cette proposition explique que le domaine transmembranaire de HA2 doit être suffisamment long pour que le passage hémifusion-fusion complète se réalise (Armstrong et al., 2000). Elle est également en accord avec le modèle « elastic coupling » suggéré par Melikyan et al. en 1995 (cf. chapitre 4.6. p.30).

Par la suite, le domaine transmembranaire et le peptide de fusion interagiraient ensemble, ce qui diminuerait leur fusogénicité et stabiliserait le pore de fusion. Il a d'ailleurs été suggéré dans de nombreux modèles précédents que ces deux régions sont proches l'une de l'autre à la fin de la fusion (Bentz et Mittal, 2000 ; Weissenhorn et al., 1999, 2007 ; Russel et al., 2001 ; Tamm et al., 2002 ; Jardetzky et Lamb, 2004).

V. PERSPECTIVES

Lors de ce travail, nous avons développé une approche originale qui a permis de prédire les peptides de fusion minimaux du HIV-1 et du BLV. Cette méthode doit être appliquée à d'autres peptides de fusion et peptides obliques afin de la valider. La détermination des peptides de fusion minimaux et des « peptides obliques minimaux » permettrait de mieux cibler les régions protéiques impliquées dans la fusion membranaire ou dans la déstabilisation d'interfaces hydrophile/hydrophobe.

La connaissance de ces régions permettra également de développer de nouvelles molécules inhibitrices de la fusion virale. A l'heure actuelle, peu de molécules sont capables d'interagir avec les peptides de fusion et de bloquer leur activité fusogène. Par exemple, pour HIV-1, seul trois types de peptides sont capables d'inhiber le caractère fusogène du peptide de fusion synthétique : le peptide T-20 (ou Enfuvirtide), des dérivés du peptide de fusion, et le peptide VIRIP et ses dérivés (Slepushkin et al., 1993 ; Mobley et al., 2001, 2007 ; Gerber et al., 2004 ; Münch et al., 2007). T-20, qui inhibe également la fusion virale en interagissant avec les hélices N-terminales et le domaine pré-transmembranaire de gp41, est le seul à l'heure actuelle à être utilisé en thérapie pour inhiber la fusion (Mobley et al., 2007). Toutefois, des virus HIV-1 résistants au T-20 sont apparus ces dernières années. La découverte de nouvelles molécules interagissant avec le peptide de fusion minimal et l'inhibant est donc nécessaire pour lutter contre l'entrée cellulaire du HIV-1. Ces nouvelles molécules, ainsi que celles dirigées contre le peptide de fusion minimal d'autres virus, pourraient être prédites par modélisation moléculaire, comme cela a précédemment été réalisé pour trouver des inhibiteurs du peptide oblique fusogène correspondant à la région 29-42 du peptide A β (Lins et al., 1999 ; Decaffmeyer et al., 2006).

Lors de la détermination des peptides de fusion minimaux et lors de l'étude de mutations, nous avons considéré que les peptides étaient stables d'un point de vue structural. De nombreuses prédictions ont d'ailleurs été réalisées en modélisant les peptides en hélice α standard rigide. Puisque la flexibilité structurale des peptides de fusion intervient dans leur fusogénicité, il serait intéressant d'étudier l'effet de la flexibilité structurale des peptides de fusion et de leurs mutants sur leur pouvoir fusogène.

Notre étude sur le peptide transmembranaire modèle KALR a contribué à montrer l'importance de la longueur du domaine transmembranaire des glycoprotéines de fusion virales pour la fusion. D'autres études montrent que certains résidus des domaines transmembranaires sont importants pour que la fusion soit complète (Helseth et al., 1990 ; Owens et al., 1994 ; Bos et al., 1995 ; Caballero et al., 1998 ; Taylor et Sanders, 1999 ;

Melikyan et al., 1999, 2000 ; Pietschmann et al., 2000). L'importance de ces résidus mériterait également d'être étudiée par des approches *in vitro* et *in silico*.

Il est également suggéré que les domaines transmembranaires interagissent avec d'autres régions des glycoprotéines de fusion lors de la fusion, notamment la région « peptide de fusion » et le domaine cytoplasmique (Melikyan et al., 1999 ; Cohen et Melikyan, 2004). Il serait intéressant d'étudier l'interaction entre ces régions protéiques ainsi que l'effet de cette interaction sur la fusion membranaire.

Nous proposons que le domaine transmembranaire des glycoprotéines de fusion intervienne directement lors de la fusion en déstabilisant l'enveloppe virale puis les intermédiaires d'hémifusion. Toutefois, pour l'intégrité du virus, ce domaine ne peut déstabiliser l'enveloppe virale que pendant le processus de fusion. La compréhension des mécanismes permettant de réguler la fusogénicité du domaine transmembranaire permettrait de développer de nouvelles voies de lutte contre la fusion virale.

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adam, B., Lins, L., Stroobant, V., Thomas, A. & Brasseur, R. (2004) Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide. *Journal of Virology*, **78**, 2131-2136.
- Afonin, S., Durr, U. H., Glaser, R. W. & Ulrich, A. S. (2004) 'Boomerang'-like insertion of a fusogenic peptide in a lipid membrane revealed by solid-state ¹⁹F NMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **42**, 195-203.
- Agirre, A., Flach, C., Goni, F. M., Mendelsohn, R., Valpuesta, J. M., Wu, F. J. & Nieva, J. L. (2000) Interactions of the HIV-1 fusion peptide with large unilamellar vesicles and monolayers. A cryo-TEM and spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1467**, 153-164.
- Allison, S. L., Schlich, J., Stiasny, K., Mandl, C. W. & Heinz, F. X. (2001) Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *Journal of Virology*, **75**, 4268-4275.
- Aranda, F. J., Teruel, J. A. & Ortiz, A. (2003) Interaction of a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of canine distemper virus fusion protein with phospholipid vesicles: a biophysical study. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1618**, 51-58.
- Arbely, E., Granot, Z., Kass, I., Orly, J. & Arkin, I. T. (2006) A trimerizing GxxxG motif is uniquely inserted in the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike protein transmembrane domain. *Biochemistry*, **45**, 11349-11356.
- Armstrong, R. T., Kushnir, A. S. & White, J. M. (2000) The transmembrane domain of influenza hemagglutinin exhibits a stringent length requirement to support the hemifusion to fusion transition. *Journal of Cell Biology*, **151**, 425-437.
- Baker, K. A., Dutch, R. E., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (1999) Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Molecular Cell*, **3**, 309-319.
- Balliet, J. W., Gendron, K. & Bates, P. (2000) Mutational analysis of the subgroup A avian sarcoma and leukosis virus putative fusion peptide domain. *Journal of Virology*, **74**, 3731-3739.
- Basanez, G. (2002) Membrane fusion: the process and its energy suppliers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 1478-1490.
- Bechinger, B. (2001) Membrane insertion and orientation of polyalanine peptides: A N-15 solid-state NMR spectroscopy investigation. *Biophysical Journal*, **81**, 2251-2256.
- Beniac, D. R., Andonov, A., Grudeski, E. & Booth, T. F. (2006) Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nature Structural & Molecular Biology*, **13**, 751-752.
- Bentz, J. (1990) Membrane-Fusion - Viral Fusion Proteins and Lipid Intermediates. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **199**, 67-COLL.
- Bentz, J. (2000) Membrane fusion mediated by coiled coils: A hypothesis. *Biophysical Journal*, **78**, 886-900.

- Références bibliographiques -

- Bentz, J. & Mittal, A. (2000) Deployment of membrane fusion protein domains during fusion. *Cell Biology International*, **24**, 819-838.
- Bos, E. C., Heijnen, L., Luytjes, W. & Spaan, W. J. (1995) Mutational analysis of the murine coronavirus spike protein: effect on cell-to-cell fusion. *Virology*, **214**, 453-463.
- Bosch, M. L., Earl, P. L., Fargnoli, K., Picciafuoco, S., Giombini, F., Wongstaal, F. & Franchini, G. (1989) Identification of the Fusion Peptide of Primate Immunodeficiency Viruses. *Science*, **244**, 694-697.
- Bosch, B. J., van der Zee, R., de Haan, C. A. M. & Rottier, P. J. M. (2003) The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex. *Journal of Virology*, **77**, 8801-8811.
- Bosch, B. J., Martina, B. E. E., van der Zee, R., Lepault, J., Haijema, B. J., Versluis, C., Heck, A. J. R., de Groot, R., Osterhaus, A. D. M. E. & Rottier, P. J. M. (2004) Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 8455-8460.
- Bottcher, C., Ludwig, K., Herrmann, A., van Heel, M. & Stark, H. (1999) Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS Letters*, **463**, 255-259.
- Bradshaw, J. P., Darkes, M. J. M., Harroun, T. A., Katsaras, J. & Eppand, R. M. (2000) Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffractions. *Biochemistry*, **39**, 6581-6585.
- Brasseur, R., Lorge, P., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M., Espion, D. & Burny, A. (1988a) The mode of insertion of the paramyxovirus F1 N-terminus into lipid matrix, an initial step in host cell/virus fusion. *Virus Genes*, **1**, 325-332.
- Brasseur, R., Cornet, B., Burny, A., Vandenbranden, M. & Ruyschaert, J. M. (1988b) Mode of Insertion Into A Lipid-Membrane of the N-Terminal Hiv Gp41 Peptide Segment. *Aids Research and Human Retroviruses*, **4**, 83-90.
- Brasseur, R., Vandenbranden, M., Cornet, B., Burny, A. & Ruyschaert, J. M. (1990) Orientation Into the Lipid Bilayer of An Asymmetric Amphipathic Helical Peptide Located at the N-Terminus of Viral Fusion Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1029**, 267-273.
- Brasseur, R. (1991) Differentiation of lipid-associating helices by use of three-dimensional molecular hydrophobicity potential calculations. *J.Biol.Chem.*, **266**, 16120-16127.
- Brasseur, R., Pillot, T., Lins, L., Vandekerckhove, J. & Rosseneu, M. (1997) Peptides in membranes: Tipping the balance of membrane stability. *Trends in Biochemical Sciences*, **22**, 167-171.
- Brasseur, R. (2000) Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis). *Molecular Membrane Biology*, **17**, 31-40.

- Brunner, J. (1989) Testing Topological Models for the Membrane Penetration of the Fusion Peptide of Influenza-Virus Hemagglutinin. *FEBS Letters*, **257**, 369-372.
- Bullough, P. A., Hughson, F. M., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1994) Structure of Influenza Hemagglutinin at the Ph of Membrane-Fusion. *Nature*, **371**, 37-43.
- Burger, K. N. J., Calder, L. J., Frederik, P. M. & Verkleij, A. J. (1993) Electron-Microscopy of Virus Liposome Fusion. *Methods in Enzymology*, **220**, 362-379.
- Burger, K. N. J. (2000) Greasing membrane fusion and fission machineries. *Traffic*, **1**, 605-613.
- Buzon, V., Padros, E. & Cladera, J. (2005) Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: A time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study. *Biochemistry*, **44**, 13354-13364.
- Caballero, M., Carabana, J., Ortego, J., Fernandez-Munoz, R. & Celma, M. L. (1998) Measles virus fusion protein is palmitoylated on transmembrane-intracytoplasmic cysteine residues which participate in cell fusion. *Journal of Virology*, **72**, 8198-8204.
- Caffrey, M., Cai, M. L., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Covell, D. G., Gronenborn, A. M. & Clore, G. M. (1998) Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *Embo Journal*, **17**, 4572-4584.
- Campbell, S. M., Crowe, S. M. & Mak, J. (2001) Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *Journal of clinical virology*, **22**, 217-227.
- Carr, C. M. & Kim, P. S. (1993) A Spring-Loaded Mechanism for the Conformational Change of Influenza Hemagglutinin. *Cell*, **73**, 823-832.
- Carr, C. M., Chaudhry, C. & Kim, P. S. (1997) Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 14306-14313.
- Castano, S. & Desbat, B. (2005) Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multibi-layers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1715**, 81-95.
- Chakrabartty, A., Kortemme, T. & Baldwin, R. L. (1994) Helix Propensities of the Amino-Acids Measured in Alanine-Based Peptides Without Helix-Stabilizing Side-Chain Interactions. *Protein Science*, **3**, 843-852.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. (1997) Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, **89**, 263-273.
- Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell*, **93**, 681-684.
- Chandler, D. E. & Heuser, J. E. (1980) Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick-freezing. *Journal of Cell Biology*, **86**, 666-674.

- Chang, D. K., Cheng, S. F. & Chien, W. J. (1997) The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate micelle primarily as helix with a conserved glycine at the micelle-water interface. *Journal of Virology*, **71**, 6593-6602.
- Chang, D. K., Cheng, S. F., Trivedi, V. D. & Yang, S. H. (2000) The amino-terminal region of the fusion peptide of influenza virus hemagglutinin HA2 inserts into sodium dodecyl sulfate micelle with residues 16-18 at the aqueous boundary at acidic pH - Oligomerization and the conformational flexibility. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 19150-19158.
- Chanturiya, A., Scaria, P. & Woodle, M. C. (2000) The role of membrane lateral tension in calcium-induced membrane fusion. *Journal of Membrane Biology*, **176**, 67-75.
- Chazal, N. & Gerlier, D. (2003) Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**, 226-37, table.
- Chen, C. H., Matthews, T. J., Mcdanal, C. B., Bolognesi, D. P. & Greenberg, M. L. (1995) A Molecular Clasp in the Human-Immunodeficiency-Virus (Hiv) Type-1 Tm Protein Determines the Anti-Hiv Activity of Gp41 Derivatives - Implication for Viral Fusion. *Journal of Virology*, **69**, 3771-3777.
- Cheng, S. F., Wu, C. W., Kantchev, E. A. & Chang, D. K. (2004) Structure and membrane interaction of the internal fusion peptide of avian sarcoma leukosis virus. *European Journal of Biochemistry*, **271**, 4725-4736.
- Chernomordik, L. V., Melikyan, G. B. & Chizmadzhev, Y. A. (1987) Biomembrane Fusion - A New Concept Derived from Model Studies Using 2 Interacting Planar Lipid Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **906**, 309-352.
- Chernomordik, L. V., Vogel, S. S., Sokoloff, A., Onaran, H. O., Leikina, E. A. & Zimmerberg, J. (1993) Lysolipids Reversibly Inhibit Ca²⁺-Dependent, Gtp-Dependent and Ph-Dependent Fusion of Biological-Membranes. *FEBS Letters*, **318**, 71-76.
- Chernomordik, L. V., Chanturiya, A., Green, J. & Zimmerberg, J. (1995) The Hemifusion Intermediate and Its Conversion to Complete Fusion - Regulation by Membrane-Composition. *Biophysical Journal*, **69**, 922-929.
- Chernomordik, L. V. & Zimmerberg, J. (1995) Bending Membranes to the Task - Structural Intermediates in Bilayer Fusion. *Current Opinion in Structural Biology*, **5**, 541-547.
- Chernomordik, L. V., Leikina, E., Frolov, V., Bronk, P. & Zimmerberg, J. (1997) An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. *Journal of Cell Biology*, **136**, 81-93.
- Chernomordik, L. V., Frolov, V. A., Leikina, E., Bronk, P. & Zimmerberg, J. (1998) The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: Restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *Journal of Cell Biology*, **140**, 1369-1382.

- Chernomordik, L. V., Leikina, E., Kozlov, M. M., Frolov, V. A. & Zimmerberg, J. (1999) Structural intermediates in influenza haemagglutinin-mediated fusion. *Molecular Membrane Biology*, **16**, 33-42.
- Chernomordik, L. V. & Kozlov, M. M. (2003) Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annual Review of Biochemistry*, **72**, 175-207.
- Chernomordik, L. V. & Kozlov, M. M. (2005) Membrane hemifusion: Crossing a chasm in two leaps. *Cell*, **123**, 375-382.
- Chernomordik, L. V., Zimmerberg, J. & Kozlov, M. M. (2006) Membranes of the world unite! *Journal of Cell Biology*, **175**, 201-207.
- Chizmadzhev, Y. A., Cohen, F. S., Shcherbakov, A. & Zimmerberg, J. (1995) Membrane mechanics can account for fusion pore dilation in stages. *Biophysical Journal*, **69**, 2489-2500.
- Chizmadzhev, Y. A. (2004) The mechanisms of lipid-protein rearrangements during viral infection. *Bioelectrochemistry*, **63**, 129-136.
- Clague, M. J., Knutson, J. R., Blumenthal, R. & Herrmann, A. (1991) Interaction of Influenza Hemagglutinin Amino-Terminal Peptide with Phospholipid-Vesicles - A Fluorescence Study. *Biochemistry*, **30**, 5491-5497.
- Cleverley, D. Z. & Lenard, J. (1998) The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 3425-3430.
- Cohen, F. S. & Melikyan, G. B. (2004) The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *Journal of Membrane Biology*, **199**, 1-14.
- Colman, P. M. & Lawrence, M. C. (2003) The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **4**, 309-319.
- Colotto, A., Martin, I., Ruyschaert, J. M., Sen, A., Hui, S. W. & Epand, R. M. (1996) Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry*, **35**, 980-989.
- Colotto, A. & Epand, R. M. (1997) Structural study of the relationship between the rate of membrane fusion and the ability of the fusion peptide of influenza virus to perturb bilayers. *Biochemistry*, **36**, 7644-7651.
- Coorssen, J. R. & Rand, R. P. (1990) Effects of cholesterol on the structural transitions induced by diacylglycerol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayer systems. *Biochemistry and Cell Biology*, **68**, 65-69.
- Crowet, J. M., Lins, L., Dupiereux, I., Elmoualija, B., Lorin, A., Charlotiaux, B., Stroobant, V., Heinen, E., & Bresseur R., (2007) Tilted properties of the 67—78 fragment of α -synuclein are responsible for membrane destabilization and neurotoxicity *Proteins*, in press

- Curtain, C., Separovic, F., Nielsen, K., Craik, D., Zhong, Y. & Kirkpatrick, A. (1999) The interactions of the N-terminal fusogenic peptide of HIV-1 gp41 with neutral phospholipids. *European Biophysics Journal*, **28**, 427-436.
- Daman, A., Harris, F., Biswas, S., Wallace, J. & Phoenix, D. A. (2001) A theoretical investigation into the lipid interactions of m-calpain. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **223**, 159-163.
- Davies, S. M. A., Epand, R. F., Bradshaw, J. P. & Epand, R. M. (1998) Modulation of lipid polymorphism by the feline leukemia virus fusion peptide: Implications for the fusion mechanism. *Biochemistry*, **37**, 5720-5729.
- De Planque, M. R. R., Kruijtzter, J. A. W., Liskamp, R. M. J., Marsh, D., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., de Kruijff, B. & Killian, J. A. (1999) Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane alpha-helical peptides. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 20839-20846.
- De Planque, M. R. R., Goormaghtigh, E., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., Kruijtzter, J. A. W., Liskamp, R. M. J., de Kruijff, B. & Killian, J. A. (2001) Sensitivity of single membrane-spanning alpha-helical peptides to hydrophobic mismatch with a lipid bilayer: Effects on backbone structure, orientation, and extent of membrane incorporation. *Biochemistry*, **40**, 5000-5010.
- De Planque, M. R. R. & Killian, J. A. (2003) Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring (Review). *Molecular Membrane Biology*, **20**, 271-284.
- Decaffmeyer, M., Lins, L., Charlotheaux, B., VanEyck, M. H., Thomas, A. & Brasseur, R. (2006) Rational design of complementary peptides to the betaAmyloid 29-42 fusion peptide: an application of PepDesign. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 320-327.
- Decout, A., Labeur, C., Vanloo, B., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Brasseur, R. & Rosseneu, M. (1999) Contribution of the hydrophobicity gradient to the secondary structure and activity of fusogenic peptides. *Molecular Membrane Biology*, **16**, 237-246.
- Del Angel, V. D., Dupuis, F., Mornon, J. P. & Callebaut, I. (2002) Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **293**, 1153-1160.
- Delahunty, M. D., Rhee, I., Freed, E. O. & Bonifacino, J. S. (1996) Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: Identification of critical glycine residues. *Virology*, **218**, 94-102.
- Delos, S. E., Gilbert, J. M. & White, J. M. (2000) The central proline of an internal viral fusion peptide serves two important roles. *Journal of Virology*, **74**, 1686-1693.
- Denesvre, C., Sonigo, P., Corbin, A., Ellerbrok, H. & Sitbon, M. (1995) Influence of Transmembrane Domains on the Fusogenic Abilities of Human and Murine Leukemia Retrovirus Envelopes. *Journal of Virology*, **69**, 4149-4157.

- Dennison, S. M., Greenfield, N., Lenard, J. & Lentz, B. R. (2002) VSV transmembrane domain (TMD) peptide promotes PEG-mediated fusion of liposomes in a conformationally sensitive fashion. *Biochemistry*, **41**, 14925-14934.
- Devadas, K., Zhou, P., Tewari, D. & Notkins, A. L. (2003) Inhibition of HIV-1 replication by the combined action of anti-gp41 single chain antibody and IL-16. *Antiviral Research*, **59**, 67-70.
- Dimitrov, A. S., Rawat, S. S., Jiang, S. & Blumenthal, R. (2003) Role of the fusion peptide and membrane-proximal domain in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Biochemistry*, **42**, 14150-14158.
- Doms, R. W. & Helenius, A. (1986) Quaternary structure of influenza virus hemagglutinin after acid treatment. *Journal of Virology*, **60**, 833-839.
- Ducarme, P., Rahman, M. & Brasseur, R. (1998) IMPALA: A simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, **30**, 357-371.
- Durell, S. R., Martin, I., Ruyschaert, J. M., Shai, Y. & Blumenthal, R. (1997) What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Molecular Membrane Biology*, **14**, 97-112.
- Durrer, P., Galli, C., Hoenke, S., Corti, C., Gluck, R., Vorherr, T. & Brunner, J. (1996) H⁺-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA2 amino-terminal fusion peptide but not the coiled coil region. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 13417-13421.
- Duzgunes, N. & Gambale, F. (1988) Membrane Action of Synthetic N-Terminal Peptides of Influenza-Virus Hemagglutinin and Its Mutants. *FEBS Letters*, **227**, 110-114.
- Duzgunes, N. & Shavnin, S. A. (1992) Membrane destabilization by N-terminal peptides of viral envelope proteins. *Journal of Membrane Biology*, **128**, 71-80.
- Eckert, D. M. & Kim, P. S. (2001) Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annual Review of Biochemistry*, **70**, 777-810.
- Efrat, A., Chernomordik, L. V. & Kozlov, M. M. (2007) Point-like protrusion as a prestalk intermediate in membrane fusion pathway. *Biophysical Journal*, **92**, L61-L63.
- Efremov, R. G., Nolde, D. E., Volynsky, P. E., Chernyavsky, A. A., Dubovskii, P. V. & Arseniev, A. S. (1999) Factors important for fusogenic activity of peptides: molecular modeling study of analogs of fusion peptide of influenza virus hemagglutinin. *FEBS Letters*, **462**, 205-210.
- El Kirat, K., Dufrene, Y. F., Lins, L. & Brasseur, R. (2006) The SIV tilted peptide induces cylindrical reverse micelles in supported lipid bilayers. *Biochemistry*, **45**, 9336-9341.
- Ellens, H., Siegel, D. P., Alford, D., Yeagle, P. L., Boni, L., Lis, L. J., Quinn, P. J. & Bentz, J. (1989) Membrane-Fusion and Inverted Phases. *Biochemistry*, **28**, 3692-3703.

- Eband, R. M. & Eband, R. F. (1994) Relationship Between the Infectivity of Influenza-Virus and the Ability of Its Fusion Peptide to Perturb Bilayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **202**, 1420-1425.
- Eband, R. F., Martin, I., Ruyschaert, J. M. & Eband, R. M. (1994) Membrane orientation of the SIV fusion peptide determines its effect on bilayer stability and ability to promote membrane fusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **205**, 1938-1943.
- Eband, R. M. (1998) Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1376**, 353-368.
- Eband, R. M. (2000) Membrane fusion. *Biosci.Rep.*, **20**, 435-441.
- Eband, R. M. & Eband, R. F. (2001) Factors contributing to the fusogenic potency of foamy virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **284**, 870-874.
- Eband, R. M., Eband, R. F., Martin, I. & Ruyschaert, J. M. (2001) Membrane interactions of mutated forms of the influenza fusion peptide. *Biochemistry*, **40**, 8800-8807.
- Eschli, B., Quirin, K., Wepf, A., Weber, J., Zinkernagel, R. & Hengartner, H. (2006) Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *Journal of Virology*, **80**, 5897-5907.
- Fass, D., Harrison, S. C. & Kim, P. S. (1996) Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nature Structural Biology*, **3**, 465-469.
- Fernandez, J. M., Neher, E. & Gomperts, B. D. (1984) Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature*, **312**, 453-455.
- Forster, F., Medalia, O., Zauberman, N., Baumeister, W. & Fass, D. (2005) Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 4729-4734.
- Fredericksen, B. L. & Whitt, M. A. (1995) Vesicular Stomatitis-Virus Glycoprotein Mutations That Affect Membrane-Fusion Activity and Abolish Virus Infectivity. *Journal of Virology*, **69**, 1435-1443.
- Freed, E. O., Myers, D. J. & Risser, R. (1990) Characterization of the Fusion Domain of the Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Envelope Glycoprotein Gp41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 4650-4654.
- Freitas, M.S., Gaspar, L.P., Lorenzoni, M., Almeida, F.C., Tinoco, L.W., Almeida, M.S., Maia, L.F., Degreve, L., Valente, A.P. & Silva, J.L. (2007) Structure of the Ebola fusion peptide in a membrane-mimetic environment and the interaction with lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry*, **in press**
- Furuta, R. A., Wild, C. T., Weng, Y. K. & Weiss, C. D. (1998) Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nature Structural Biology*, **5**, 276-279.

- Gaboriaud, C., Bissery, V., Benchetrit, T. & Mornon, J. P. (1987) Hydrophobic Cluster-Analysis - An Efficient New Way to Compare and Analyze Amino-Acid-Sequences. *FEBS Letters*, **224**, 149-155.
- Gallaher, W. R. (1987) Detection of A Fusion Peptide Sequence in the Transmembrane Protein of Human-Immunodeficiency-Virus. *Cell*, **50**, 327-328.
- Garcia, R. A., Pantazatos, S. P., Pantazatos, D. P. & MacDonald, R. C. (2001) Cholesterol stabilizes hemifused phospholipid bilayer vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1511**, 264-270.
- Gaudin, Y., Ruigrok, R. W. H. & Brunner, J. (1995) Low-Ph Induced Conformational-Changes in Viral Fusion Proteins - Implications for the Fusion Mechanism. *Journal of General Virology*, **76**, 1541-1556.
- Gaudin, Y., Moreira, S., Benejean, J., Blondel, D., Flamand, A. & Tuffereau, C. (1999) Soluble ectodomain of rabies virus glycoprotein expressed in eukaryotic cells folds in a monomeric conformation that is antigenically distinct from the native state of the complete, membrane-anchored glycoprotein. *Journal of General Virology*, **80**, 1647-1656.
- Gaudin, Y. (2000) Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *Journal of Cell Biology*, **150**, 601-611.
- Gething, M. J., Doms, R. W., York, D. & White, J. (1986) Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus. *Journal of Cell Biology*, **102**, 11-23.
- Gerber, D., Pritsker, M., Gunther-Ausborn, S., Johnson, B., Blumenthal, R. & Shai, Y. (2004) Inhibition of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion by a DL-amino acid-containing fusion peptide: possible recognition of the fusion complex. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48224-48230.
- Ghosh, J. K. & Shai, Y. (1999) Direct evidence that the N-terminal heptad repeat of sendai virus fusion protein participates in membrane fusion. *Journal of Molecular Biology*, **292**, 531-546.
- Gianinazzi, C. F., Raiteri, E., Collesi, C., Benfenati, F. & Cremona, O. (2005) Dynamics of secretion. *Archives Italiennes de Biologie*, **143**, 133-142.
- Glaser, P. E. & Gross, R. W. (1994) Plasmeneylethanolamine Facilitates Rapid Membrane-Fusion - A Stopped-Flow Kinetic Investigation Correlating the Propensity of A Major Plasma-Membrane Constituent to Adopt An H-Ii Phase with Its Ability to Promote Membrane-Fusion. *Biochemistry*, **33**, 5805-5812.
- Gomara, M. J., Mora, P., Mingarro, I. & Nieva, J. L. (2004) Roles of a conserved proline in the internal fusion peptide of Ebola glycoprotein. *FEBS Letters*, **569**, 261-266.
- Gordon, L. M., Curtain, C. C., Zhong, Y. C., Kirkpatrick, A., Mobley, P. W. & Waring, A. J. (1992) The Amino-Terminal Peptide of Hiv-1 Glycoprotein-41 Interacts with Human Erythrocyte-Membranes - Peptide Conformation, Orientation and Aggregation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1139**, 257-274.

- Gordon, L. M., Mobley, P. W., Pilpa, R., Sherman, M. A. & Waring, A. J. (2002) Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using C-13-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1559**, 96-120.
- Gordon, L. M., Mobley, P. W., Lee, W., Eskandari, S., Kaznessis, Y. N., Sherman, M. A. & Waring, A. J. (2004) Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in lipid detergent and aqueous environments using C-13-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Protein Science*, **13**, 1012-1030.
- Gray, C., Tatulian, S. A., Wharton, S. A. & Tamm, L. K. (1996) Effect of the N-terminal glycine on the secondary structure, orientation, and interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers. *Biophysical Journal*, **70**, 2275-2286.
- Gruenke, J. A., Armstrong, R. T., Newcomb, W. W., Brown, J. C. & White, J. M. (2002) New insights into the spring-loaded conformational change of influenza virus hemagglutinin. *Journal of Virology*, **76**, 4456-4466.
- Guillen, J., Perez-Berna, A. J., Moreno, M. R. & Villalain, J. (2005) Identification of the membrane-active regions of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike membrane glycoprotein using a 16/18-mer peptide scan: Implications for the viral fusion mechanism. *Journal of Virology*, **79**, 1743-1752.
- Gustchina, E., Louis, J. M., Bewley, C. A. & Clore, G. M. (2006) Synergistic inhibition of HIV-1 envelope-mediated membrane fusion by inhibitors targeting the N and C-terminal heptad repeats of gp41. *Journal of Molecular Biology*, **364**, 283-289.
- Hafez, I., Kisler, K., Berberian, K., Dernick, G., Valero, V., Yong, M. G., Craighead, H. G. & Lindau, M. (2005) Electrochemical imaging of fusion pore openings by electrochemical detector arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13879-13884.
- Haïk, S., Peyrin, J. M., Lins, L., Rosseneu, M. Y., Brasseur, R., Langeveld, J. P., Tagliavini, F., Deslys, J. P., Lasmezas, C. & Dormont, D. (2000) Neurotoxicity of the putative transmembrane domain of the prion protein. *Neurobiology of Disease*, **7**, 644-656.
- Hakansson-McReynolds, S., Jiang, S. K., Rong, L. J. & Caffrey, M. (2006) Solution structure of the severe acute respiratory syndrome-coronavirus heptad repeat 2 domain in the prefusion state. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 11965-11971.
- Han, X., Steinhauer, D. A., Wharton, S. A. & Tamm, L. K. (1999) Interaction of mutant influenza virus hemagglutinin fusion peptides with lipid bilayers: Probing the role of hydrophobic residue size in the central region of the fusion peptide. *Biochemistry*, **38**, 15052-15059.
- Han, X. & Tamm, L. K. (2000) A host-guest system to study structure-function relationships of membrane fusion peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 13097-13102.
- Han, X., Bushweller, J. H., Cafiso, D. S. & Tamm, L. K. (2001) Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nature Structural Biology*, **8**, 715-720.

- Haque, M. E., McCoy, A. J., Glenn, J., Lee, J. K. & Lentz, B. R. (2001) Effects of hemagglutinin fusion peptide on poly(ethylene glycol)-mediated fusion of phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, **40**, 14243-14251.
- Haque, M. E. & Lentz, B. R. (2004) Roles of curvature and hydrophobic interstice energy in fusion: Studies of lipid perturbant effects. *Biochemistry*, **43**, 3507-3517.
- Haque, M. E., Koppaka, V., Axelsen, P. H. & Lentz, B. R. (2005) Properties and structures of the influenza and HIV fusion peptides on lipid membranes: Implications for a role in fusion. *Biophysical Journal*, **89**, 3183-3194.
- Harris, F., Wallace, J. & Phoenix, D. A. (2000) Use of hydrophobic moment plot methodology to aid the identification of oblique orientated alpha-helices. *Molecular Membrane Biology*, **17**, 201-207.
- Harrison, S. C. (2005) Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins. *Virus Structure and Assembly*, **64**, 231-261.
- Harter, C., James, P., Bachi, T., Semenza, G. & Brunner, J. (1989) Hydrophobic Binding of the Ectodomain of Influenza Hemagglutinin to Membranes Occurs Through the Fusion Peptide. *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 6459-6464.
- Harzer, U. & Bechinger, B. (2000) Alignment of lysine-anchored membrane peptides under conditions of hydrophobic mismatch: A CD,N-15 and P-31 solid-state NMR spectroscopy investigation. *Biochemistry*, **39**, 13106-13114.
- Helseth, E., Olshevsky, U., Gabuzda, D., Ardman, B., Haseltine, W. & Sodroski, J. (1990) Changes in the Transmembrane Region of the Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Gp41 Envelope Glycoprotein Affect Membrane-Fusion. *Journal of Virology*, **64**, 6314-6318.
- Henry, J. P., Darchen, F. & Cribier, S. (1998) Physical techniques for the study of exocytosis in isolated cells. *Biochimie*, **80**, 371-377.
- Heuvingh, J., Pincet, F. & Cribier, S. (2004) Hemifusion and fusion of giant vesicles induced by reduction of inter-membrane distance. *The European physical journal. E, Soft matter*, **14**, 269-276.
- Hofmann, M. W., Weise, K., Ollesch, J., Agrawal, P., Stalz, H., Stelzer, W., Hulsbergen, F., de Groot, H., Gerwert, K., Reed, J. & Langosch, D. (2004) De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 14776-14781.
- Hofmann, M. W., Poschner, B. C., Hauser, S. & Langosch, D. (2007) pH-activated fusogenic transmembrane LV-peptides. *Biochemistry*, **46**, 4204-4209.
- Horth, M., Lambrecht, B., Khim, M. C. L., Bex, F., Thiriart, C., Ruysschaert, J. M., Burny, A. & Bresseur, R. (1991) Theoretical and Functional-Analysis of the Siv Fusion Peptide. *Embo Journal*, **10**, 2747-2755.

- Hughson, F. M. (1995) Molecular Mechanisms of Protein-Mediated Membrane-Fusion. *Current Opinion in Structural Biology*, **5**, 507-513.
- Hughson, F. M. (1997) Enveloped viruses: A common mode of membrane fusion? *Current Biology*, **7**, R565-R569.
- Ishiguro, R., Kimura, N. & Takahashi, S. (1993) Orientation of Fusion-Active Synthetic Peptides in Phospholipid-Bilayers - Determination by Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy. *Biochemistry*, **32**, 9792-9797.
- Ishiguro, R., Matsumoto, M. & Takahashi, S. (1996) Interaction of fusogenic synthetic peptide with phospholipid bilayers: Orientation of the peptide alpha-helix and binding isotherm. *Biochemistry*, **35**, 4976-4983.
- Ito, H., Watanabe, S., Sanchez, A., Whitt, M. A. & Kawaoka, Y. (1999) Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein. *Journal of Virology*, **73**, 8907-8912.
- Jackson, M. B. & Chapman, E. R. (2006) Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **35**, 135-160.
- Jahn, R. & Sudhof, T. C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, **68**, 863-911.
- Jahn, R. & Grubmüller, H. (2002) Membrane fusion. *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 488-495.
- Jahn, R., Lang, T. & Sudhof, T. C. (2003) Membrane fusion. *Cell*, **112**, 519-533.
- Jähnig, F. (1990) Structure predictions of membrane proteins are not that bad. *Trends Biochem.Sci.*, **15**, 93-95.
- Jardetzky, T. S. & Lamb, R. A. (2004) Virology - A class act. *Nature*, **427**, 307-308.
- Jena, B. P. (2005) Cell secretion and membrane fusion. *Domestic Animal Endocrinology*, **29**, 145-165.
- Jiang, S. B., Lin, K., Strick, N. & Neurath, A. R. (1993) Hiv-1 Inhibition by A Peptide. *Nature*, **365**, 113.
- Jin, H., Leser, G. P. & Lamb, R. A. (1994) The influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail is not essential for virus assembly or infectivity. *Embo Journal.*, **13**, 5504-5515.
- Kamath, S. & Wong, T. C. (2002) Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain by molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, **83**, 135-143.
- Kanaseki, T., Kawasaki, K., Murata, M., Ikeuchi, Y. & Ohnishi, S. (1997) Structural features of membrane fusion between influenza virus and liposome as revealed by quick-freezing electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **137**, 1041-1056.

- Katsov, K., Muller, M. & Schick, M. (2004) Field theoretic study of bilayer membrane fusion. I. Hemifusion mechanism. *Biophysical Journal*, **87**, 3277-3290.
- Kemble, G. W., Henis, Y. I. & White, J. M. (1993) GPI- and transmembrane-anchored influenza hemagglutinin differ in structure and receptor binding activity. *Journal of Cell Biology*, **122**, 1253-1265.
- Kemble, G. W., Danieli, T. & White, J. M. (1994) Lipid-Anchored Influenza Hemagglutinin Promotes Hemifusion, Not Complete Fusion. *Cell*, **76**, 383-391.
- Kielian, M. (1995) Membrane-Fusion and the Alphavirus Life-Cycle. *Advances in Virus Research, Vol 45*, **45**, 113-151.
- Kilby, J. M., Hopkins, S., Venetta, T. M., DiMassimo, B., Cloud, G. A., Lee, J. Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Mathews, T., Johnson, M. R., Nowak, M. A., Shaw, G. M. & Saag, M. S. (1998) Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine*, **4**, 1302-1307.
- Kilby, J. M., Lalezari, J. P., Eron, J. J., Carlson, M., Cohen, C., Arduino, R. C., Goodgame, J. C., Gallant, J. E., Volberding, P., Murphy, R. L., Valentine, F., Saag, M. S., Nelson, E. L., Sista, P. R. & Dusek, A. (2002) The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *Aids Research and Human Retroviruses*, **18**, 685-693.
- Killian, J. A., Salemink, I., De Planque, M. R. R., Lindblom, G., Koeppe, R. E. & Greathouse, D. V. (1996) Induction of nonbilayer structures in diacylphosphatidylcholine model membranes by transmembrane alpha-helical peptides: Importance of hydrophobic mismatch and proposed role of tryptophans. *Biochemistry*, **35**, 1037-1045.
- Killian, J. A., De Planque, M. R. R., van der Wel, P. C. A., Salemink, I., de Kruijff, B., Greathouse, D. V. & Koeppe, R. E. (1998) Modulation of membrane structure and function by hydrophobic mismatch between proteins and lipids. *Pure and Applied Chemistry*, **70**, 75-82.
- Kinnunen, P. K. & Holopainen, J. M. (2000) Mechanisms of initiation of membrane fusion: role of lipids. *Bioscience Reports*, **20**, 465-482.
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. & Blodorn, J. (1975) Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, **68**, 426-439.
- Kliger, Y., Aharoni, A., Rapaport, D., Jones, P., Blumenthal, R. & Shai, Y. (1997) Fusion peptides derived from the HIV type 1 glycoprotein 41 associate within phospholipid membranes and inhibit cell-cell fusion - Structure-function study. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 13496-13505.
- Kobe, B., Center, R. J., Kemp, B. E. & Pombourios, P. (1999) Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 4319-4324.

- Korazim, O., Sackett, K. & Shai, Y. (2006) Functional and structural characterization of HIV-1 gp41 ectodomain regions in phospholipid membranes suggests that the fusion-active conformation is extended. *Journal of Molecular Biology*, **364**, 1103-1117.
- Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Wei, C. G., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W. & Sodroski, J. (1987) Functional Regions of the Envelope Glycoprotein of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1. *Science*, **237**, 1351-1355.
- Kozerski, C., Ponimaskin, E., Schroth-Diez, B., Schmidt, M. F. G. & Herrmann, A. (2000) Modification of the cytoplasmic domain of influenza virus hemagglutinin affects enlargement of the fusion pore. *Journal of Virology*, **74**, 7529-7537.
- Kozlov, M. M., Leikin, S. L., Chernomordik, L. V., Markin, V. S. & Chizmadzhev, Y. A. (1989) Stalk Mechanism of Vesicle Fusion - Intermixing of Aqueous Contents. *European Biophysics Journal*, **17**, 121-129.
- Kozlov, M. M. & Chernomordik, L. V. (1998) A mechanism of protein-mediated fusion: Coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements. *Biophysical Journal*, **75**, 1384-1396.
- Kozlovsky, Y. & Kozlov, M. M. (2002) Stalk model of membrane fusion: Solution of energy crisis. *Biophysical Journal*, **82**, 882-895.
- Kozlovsky, Y., Chernomordik, L. V. & Kozlov, M. M. (2002) Lipid intermediates in membrane fusion: Formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophysical Journal*, **83**, 2634-2651.
- Kuzmin, P. I., Zimmerberg, J., Chizmadzhev, Y. A. & Cohen, F. S. (2001) A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 7235-7240.
- Lambert, G., Decout, A., Vanloo, B., Rouy, D., Duverger, N., Kalopissis, A., Vadekerckhove, J., Chambaz, J., Brasseur, R. & Rosseneu, M. (1998) The C-terminal helix of human apolipoprotein AII promotes the fusion of unilamellar liposomes and displaces apolipoprotein AI from high-density lipoproteins. *European Journal of Biochemistry*, **253**, 328-338.
- Langosch, D., Brosig, B. & Pipkorn, R. (2001a) Peptide mimics of the vesicular stomatitis virus G-protein transmembrane segment drive membrane fusion in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 32016-32021.
- Langosch, D., Crane, J. M., Brosig, B., Hellwig, A., Tamm, L. K. & Reed, J. (2001b) Peptide mimics of SNARE transmembrane segments drive membrane fusion depending on their conformational plasticity. *Journal of Molecular Biology*, **311**, 709-721.
- Lazarowitz, S. G. & Choppin, P. W. (1975) Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*, **68**, 440-454.
- Lee, J. & Lentz, B. R. (1998) Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 9274-9279.

- Lei, G. H. & MacDonald, R. C. (2003) Lipid bilayer vesicle fusion: Intermediates captured by high-speed microfluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*, **85**, 1585-1599.
- Leikina, E. & Chernomordik, L. V. (2000) Reversible merger of membranes at the early stage of influenza hemagglutinin-mediated fusion. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 2359-2371.
- Lentz, B. R. & Lee, J. K. (1999) Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Molecular Membrane Biology*, **16**, 279-296.
- Lentz, B. R. (2006) Seeing is believing: The stalk intermediate. *Biophysical Journal*, **91**, 2747-2748.
- Leventis, R., Gagne, J., Fuller, N., Rand, R. P. & Silvius, J. R. (1986) Divalent cation induced fusion and lipid lateral segregation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid vesicles. *Biochemistry*, **25**, 6978-6987.
- Lewis, R. N. A. H., Zhang, Y. P., Liu, F. & McElhaney, R. N. (2002) Mechanisms of the interaction of alpha-helical transmembrane peptides with phospholipid bilayers. *Bioelectrochemistry*, **56**, 135-140.
- Li, Y. & Tamm, L.K. (2007) Structure and plasticity of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain in lipid micelles and bilayers. *Biophysical Journal*, **93**, 876-885.
- Liao, Z., Graham, D. R. & Hildreth, J. E. (2003) Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Research Human Retroviruses*, **19**, 675-687.
- Lindau, M. & Almers, W. (1995) Structure and Function of Fusion Pores in Exocytosis and Ectoplasmic Membrane-Fusion. *Current Opinion in Cell Biology*, **7**, 509-517.
- Lindau, M. & de Toledo, G. A. (2003) The fusion pore. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **1641**, 167-173.
- Lins, L., Thomas-Soumarmon, A., Pillot, T., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. & Brasseur, R. (1999) Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's beta-amyloid peptide and apolipoprotein E alpha-helices. *Journal of Neurochemistry* **73**, 758-769.
- Lins, L., Charlotiaux, B., Thomas, A. & Brasseur, R. (2001) Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: Towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins-Structure Function and Genetics*, **44**, 435-447.
- Lins, L., Flore, C., Chapelle, L., Talmud, P. J., Thomas, A. & Brasseur, R. (2002) Lipid-interacting properties of the N-terminal domain of human apolipoprotein C-III. *Protein Engineering*, **15**, 513-520.
- Lins, L., Charlotiaux, B., Heinen, C., Thomas, A. & Brasseur, R. (2006) "De novo" design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophysical Journal*, **90**, 470-479.

- Liu, F., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S. & McElhaney, R. N. (2001) A differential scanning calorimetric and P-31 NMR spectroscopic study of the effect of transmembrane alpha-helical peptides on the lamellar-reversed hexagonal phase transition of phosphatidylethanolamine model membranes. *Biochemistry*, **40**, 760-768.
- Liu, F., Lewis, R. N. A. H., Hodges, R. S. & McElhaney, R. N. (2002) Effect of variations in the structure of a polyleucine-based alpha-helical transmembrane peptide on its interaction with phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry*, **41**, 9197-9207.
- Longo, F. J. & Yanagimachi, R. (1993) Detection of Sperm-Egg Fusion. *Methods in Enzymology*, **221**, 249-260.
- Longo, M. L., Waring, A. J. & Hammer, D. A. (1997) Interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers: Area expansion and permeation. *Biophysical Journal*, **73**, 1430-1439.
- Longo, M. L., Waring, A. J., Gordon, L. M. & Hammer, D. A. (1998) Area expansion and permeation of phospholipid membrane bilayers by influenza fusion peptides and melittin. *Langmuir*, **14**, 2385-2395.
- Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. & Basseur, R. (2004) Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **8**, 163-176.
- Lou, Z. Y., Xu, Y. H., Xiang, K., Su, N., Qin, L., Li, X., Gao, G. F., Bartlam, M. & Rao, Z. H. (2006) Crystal structures of Nipah and Hendra virus fusion core proteins. *FEBS Journal*, **273**, 4538-4547.
- Lowy, R. J., Sarkar, D. P., Chen, Y. & Blumenthal, R. (1990) Observation of Single Influenza-Virus Cell-Fusion and Measurement by Fluorescence Video Microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 1850-1854.
- Lu, M., Blacklow, S. C. & Kim, P. S. (1995) A Trimeric Structural Domain of the Hiv-1 Transmembrane Glycoprotein. *Nature Structural Biology*, **2**, 1075-1082.
- Luneberg, J., Martin, I., Nussler, F., Ruyschaert, J. M. & Herrmann, A. (1995) Structure and Topology of the Influenza-Virus Fusion Peptide in Lipid Bilayers. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 27606-27614.
- Macosko, J. C., Kim, C. H. & Shin, Y. K. (1997) The membrane topology of the fusion peptide region of influenza hemagglutinin determined by spin-labeling EPR. *Journal of Molecular Biology*, **267**, 1139-1148.
- Maddox, M. W. & Longo, M. L. (2002) A Monte Carlo study of peptide insertion into lipid bilayers: Equilibrium conformations and insertion mechanisms. *Biophysical Journal*, **82**, 244-263.
- Malashkevich, V. N., Schneider, B. J., McNally, M. L., Milhollen, M. A., Pang, J. X. & Kim, P. S. (1999) Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-angstrom resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 2662-2667.

- Malashkevich, V. N., Singh, M. & Kim, P. S. (2001) The trimer-of-hairpins motif in membrane fusion: Visna virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 8502-8506.
- Malinin, V. S. & Lentz, B. R. (2004) Energetics of vesicle fusion intermediates: Comparison of calculations with observed effects of osmotic and curvature stresses. *Biophysical Journal*, **86**, 2951-2964.
- Markin, V. S., Kozlov, M. M. & Borovjagin, V. L. (1984) On the theory of membrane fusion. The stalk mechanism. *General Physiology and Biophysics*, **3**, 361-377.
- Markosyan, R. M., Cohen, F. S. & Melikyan, G. B. (2000) The lipid-anchored ectodomain of influenza virus hemagglutinin (GPI-HA) is capable of inducing nonenlarging fusion pores. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 1143-1152.
- Marquardt, M. T. & Kielian, M. (1996) Cholesterol-depleted cells that are relatively permissive for Semliki Forest virus infection. *Virology*, **224**, 198-205.
- Marsh, M. & Helenius, A. (2006) Virus entry: Open sesame. *Cell*, **124**, 729-740.
- Martin, I., Defrisequertain, F., Mandieau, V., Nielsen, N. M., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., Ruyschaert, J. M. & Vandenbranden, M. (1991) Fusogenic Activity of Siv (Simian Immunodeficiency Virus) Peptides Located in the Gp32 Nh2 Terminal Domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **175**, 872-879.
- Martin, I., Defrisequertain, F., Decroly, E., Vandenbranden, M., Brasseur, R. & Ruyschaert, J. M. (1993) Orientation and Structure of the Nh2-Terminal Hiv-1 Gp41 Peptide in Fused and Aggregated Liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1145**, 124-133.
- Martin, I., Dubois, M. C., Defrisequertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R. & Ruyschaert, J. M. (1994) Correlation Between Fusogenicity of Synthetic Modified Peptides Corresponding to the Nh2-Terminal Extremity of Simian Immunodeficiency Virus Gp32 and Their Mode of Insertion Into the Lipid Bilayer - An Infrared-Spectroscopy Study. *Journal of Virology*, **68**, 1139-1148.
- Martin, I., Schaal, H., Scheid, A. & Ruyschaert, J. M. (1996) Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *Journal of Virology*, **70**, 298-304.
- Martin, I., Epanand, R. M. & Ruyschaert, J. M. (1998) Structural properties of the putative fusion peptide of fertilin, a protein active in sperm-egg fusion, upon interaction with the lipid bilayer. *Biochemistry*, **37**, 17030-17039.
- Martin, I., Ruyschaert, J. M. & Epanand, R. M. (1999) Role of the N-terminal peptides of viral envelope proteins in membrane fusion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **38**, 233-255.
- Martin, I. & Ruyschaert, J. M. (2000) Common Properties of Fusion Peptides from Diverse Systems. *Bioscience Reports*, **20**, 483-500.

- Medinas, R. J., Lambert, D. M. & Tompkins, W. A. (2002) C-terminal gp40 peptide analogs inhibit feline immunodeficiency virus: Cell fusion and virus spread. *Journal of Virology*, **76**, 9079-9086.
- Melikyan, G. B., White, J. M. & Cohen, F. S. (1995) Gpi-Anchored Influenza Hemagglutinin Induces Hemifusion to Both Red-Blood-Cell and Planar Bilayer-Membranes. *Journal of Cell Biology*, **131**, 679-691.
- Melikyan, G. B., Brener, S. A., Ok, D. C. & Cohen, F. S. (1997) Inner but not outer membrane leaflets control the transition from glycosylphosphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin-induced hemifusion to full fusion. *Journal of Cell Biology*, **136**, 995-1005.
- Melikyan, G. B., Lin, S. S., Roth, M. G. & Cohen, F. S. (1999) Amino acid sequence requirements of the transmembrane and cytoplasmic domains of influenza virus hemagglutinin for viable membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 1821-1836.
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Roth, M. G. & Cohen, F. S. (2000) A point mutation in the transmembrane domain of the hemagglutinin of influenza virus stabilizes a hemifusion intermediate that can transit to fusion. *Molecular Biology of the Cell*, **11**, 3765-3775.
- Melikyan, G. B., Barnard, R. J. O., Abrahamyan, L. G., Mothes, W. & Young, J. A. T. (2005) Imaging individual retroviral fusion events: From hemifusion to pore formation and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8728-8733.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Lins, L., Bensliman, M., Van Bambeke, F., Van der Smissen, P., Peuvot, J., Schanck, A. & Brasseur, R. (2002) Membrane destabilization induced by beta-amyloid peptide 29-42: Importance of the amino-terminus. *Chemistry and Physics of Lipids*, **120**, 57-74.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Lins, L., Bensliman, M., Thomas, A., Van Bambeke, F., Peuvot, J., Schanck, A. & Brasseur, R. (2003) Piracetam inhibits the lipid-destabilising effect of the amyloid peptide A beta C-terminal fragment. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1609**, 28-38.
- Minor, D. L. & Kim, P. S. (1996) Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature*, **380**, 730-734.
- Miyauchi, K., Komano, J., Yokomaku, Y., Sugiura, W., Yamamoto, N. & Matsuda, Z. (2005) Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *Journal of Virology*, **79**, 4720-4729.
- Mobley, P. W., Curtain, C. C., Kirkpatrick, A., Rostamkhani, M., Waring, A. J. & Gordon, L. M. (1992) The Amino-Terminal Peptide of Hiv-1 Glycoprotein-41 Lyses Human Erythrocytes and Cd4+ Lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1139**, 251-256.

- Mobley, P. W., Lee, H. F., Curtain, C. C., Kirkpatrick, A., Waring, A. J. & Gordon, L. M. (1995) The Amino-Terminal Peptide of Hiv-1 Glycoprotein-41 Fuses Human Erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, **1271**, 304-314.
- Mobley, P. W., Waring, A. J., Sherman, M. A. & Gordon, L. M. (1999) Membrane interactions of the synthetic N-terminal peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1418**, 1-18.
- Mobley, P. W., Pilpa, R., Brown, C., Waring, A. J. & Gordon, L. M. (2001) Membrane-perturbing domains of HIV type 1 glycoprotein 41. *Aids Research and Human Retroviruses*, **17**, 311-327.
- Mobley, P. W., Barry, J. A., Waring, A. J., Sherman, M. A. & Gordon, L. M. (2007) Membrane perturbing actions of HIV type 1 glycoprotein 41 domains are inhibited by helical C-peptides. *Aids Research and Human Retroviruses*, **23**, 224-242.
- Monck, J. R. & Fernandez, J. M. (1996) The fusion pore and mechanisms of biological membrane fusion. *Current Opinion in Cell Biology*, **8**, 524-533.
- Morein, S., Koeppe, R. E., Lindblom, G., de Kruijff, B. & Killian, J. A. (2000) The effect of peptide/lipid hydrophobic mismatch on the phase behavior of model membranes mimicking the lipid composition in Escherichia coli membranes. *Biophysical Journal*, **78**, 2475-2485.
- Moreno, M. R., Pascual, R. & Villalain, J. (2004) Identification of membrane-active regions of the HIV-1 envelope glycoprotein gp41 using a 15-mer gp41-peptide scan. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1661**, 97-105.
- Moreno, M. R., Gludici, M. & Villalain, J. (2006) The membranotropic regions of the endo and ecto domains of HIV gp41 envelope glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 111-123.
- Münch, J., Standker, L., Adermann, K., Schulz, A., Schindler, M., Chinnadurai, R., Pohlmann, S., Chaipan, C., Biet, T., Peters, T., Meyer, B., Wilhelm, D., Lu, H., Jing, W., Jiang, S., Forssmann, W. G. & Kirchhoff, F. (2007) Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. *Cell* **129**, 263-275.
- Newton, C., Pangborn, W., Nir, S. & Papahadjopoulos, D. (1978) Specificity of Ca²⁺ and Mg²⁺ binding to phosphatidylserine vesicles and resultant phase changes of bilayer membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, **506**, 281-287.
- Nguyen, N. Q. N., Tabruyn, S. P., Lins, L., Lion, M., Cornet, A. M., Lair, F., Rentier-Delrue, F., Bresseur, R., Martial, J. A. & Struman, I. (2006) Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 14319-14324.
- Nieva, J. L., Nir, S., Muga, A., Goni, F. M. & Wilschut, J. (1994) Interaction of the Hiv-1 Fusion Peptide with Phospholipid-Vesicles - Different Structural Requirements for Fusion and Leakage. *Biochemistry*, **33**, 3201-3209.

- Nieva, J. L. & Agirre, A. (2003) Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion? *Biochimica et Biophysica Acta*, **1614**, 104-115.
- Nir, S. & Nieva, J. L. (2000) Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Progress in Lipid Research*, **39**, 181-206.
- Nussler, F., Clague, M. J. & Herrmann, A. (1997) Meta-stability of the hemifusion intermediate induced by glycosylphosphatidylinositol-anchored influenza hemagglutinin. *Biophysical Journal*, **73**, 2280-2291.
- Odell, D., Wanas, E., Yan, J. S. & Ghosh, H. P. (1997) Influence of membrane anchoring and cytoplasmic domains on the fusogenic activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Journal of Virology*, **71**, 7996-8000.
- Owens, R. J., Burke, C. & Rose, J. K. (1994) Mutations in the Membrane-Spanning Domain of the Human-Immunodeficiency-Virus Envelope Glycoprotein That Affect Fusion Activity. *Journal of Virology*, **68**, 570-574.
- Ozdirekcan, S., Rijkers, D. T. S., Liskamp, R. M. J. & Killian, J. A. (2005) Influence of flanking residues on tilt and rotation angles of transmembrane peptides in lipid bilayers. A solid-state H-2 NMR study. *Biochemistry*, **44**, 1004-1012.
- Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1998) A helix propensity scale based on experimental studies of peptides and proteins. *Biophysical Journal*, **75**, 422-427.
- Pantazatos, D. P. & MacDonald, R. C. (1999) Directly observed membrane fusion between oppositely charged phospholipid bilayers. *Journal of Membrane Biology*, **170**, 27-38.
- Pécheur, E. I., Martin, I., Bienvenue, A., Ruyschaert, J. M. & Hoekstra, D. (2000) Protein-induced fusion can be modulated by target membrane lipids through a structural switch at the level of the fusion peptide. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 3936-3942.
- Peisajovich, S. G. & Shai, Y. (2003) Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1614**, 122-129.
- Pereira, F. B., Goni, F. M. & Nieva, J. L. (1995) Liposome Destabilization Induced by the Hiv-1 Fusion Peptide Effect of A Single Amino-Acid Substitution. *FEBS Letters*, **362**, 243-246.
- Pereira, F. B., Goni, F. M., Muga, A. & Nieva, J. L. (1997) Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: Dose and sequence effects. *Biophysical Journal*, **73**, 1977-1986.
- Pereira, F. B., Valpuesta, J. M., Basanez, G., Goni, F. M. & Nieva, J. L. (1999) Interbilayer lipid mixing induced by the human immunodeficiency virus type-1 fusion peptide on large unilamellar vesicles: the nature of the nonlamellar intermediates. *Chemistry and Physics of Lipids*, **103**, 11-20.

- Perez-Mendez, O., Vanloo, B., Decout, A., Goethals, M., Peelman, F., Vandekerckhove, J., Brasseur, R. & Rosseneu, M. (1998) Contribution of the hydrophobicity gradient of an amphipathic peptide to its mode of association with lipids. *European Journal of Biochemistry*, **256**, 570-579.
- Peuvot, J., Schanck, A., Lins, L. & Brasseur, R. (1999) Are the fusion processes involved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes? *Journal of Theoretical Biology*, **198**, 173-181.
- Phoenix, D. A., Harris, F., Daman, O. A. & Wallace, J. (2002) The prediction of amphiphilic alpha-helices. *Current Protein & Peptide Science*, **3**, 201-221.
- Pietschmann, T., Zentgraf, H., Rethwilm, A. & Lindemann, D. (2000) An evolutionarily conserved positively charged amino acid in the putative membrane-spanning domain of the foamy virus envelope protein controls fusion activity. *Journal of Virology*, **74**, 4474-4482.
- Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talussot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. & Lins, L. (1996) Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 28757-28765.
- Pillot, T., Lins, L., Goethals, M., Vanloo, B., Baert, J., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. & Brasseur, R. (1997) The 118-135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion. *Journal of Molecular Biology*, **274**, 381-393.
- Pillot, T., Drouet, B., Queille, S., Labeur, C., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Pincon-Raymond, M. & Chambaz, J. (1999) The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: Involvement of its C-terminal fusogenic domain. *Journal of Neurochemistry*, **73**, 1626-1634.
- Pillot, T., Drouet, B., Pincon-Raymond, R. L., Vandekerckhove, J., Rosseneu, T. & Chambaz, J. (2000) A nonfibrillar form of the fusogenic prion protein fragment [118-135] induces apoptotic cell death in rat cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, **75**, 2298-2308.
- Poranen, M. M., Daugelavicius, R. & Bamford, D. H. (2002) Common principles in viral entry. *Annual Review of Microbiology*, **56**, 521-538.
- Pritsker, M., Rucker, J., Hoffman, T. L., Doms, R. W. & Shai, Y. (1999) Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe(11) in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes. *Biochemistry*, **38**, 11359-11371.
- Qiang, W., Yang, J. & Weliky, D. P. (2007) Solid-state nuclear magnetic resonance measurements of HIV fusion peptide to lipid distances reveal the intimate contact of beta strand peptide with membranes and the proximity of the Ala-14-Gly-16 region with lipid headgroups. *Biochemistry*, **46**, 4997-5008.
- Qiao, H., Armstrong, R. T., Melikyan, G. B., Cohen, F. S. & White, J. M. (1999) A specific point mutant at position 1 of the influenza hemagglutinin fusion peptide displays a hemifusion phenotype. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 2759-2769.

- Rafalski, M., Lear, J. D. & Degrado, W. F. (1990) Phospholipid Interactions of Synthetic Peptides Representing the N-Terminus of Hiv Gp41. *Biochemistry*, **29**, 7917-7922.
- Rafalski, M., Ortiz, A., Rockwell, A., Vanginkel, L. C., Lear, J. D., Degrado, W. F. & Wilschut, J. (1991) Membrane-Fusion Activity of the Influenza-Virus Hemagglutinin - Interaction of HA2 N-Terminal Peptides with Phospholipid-Vesicles. *Biochemistry*, **30**, 10211-10220.
- Ragheb, J. A. & Anderson, W. F. (1994) Uncoupled Expression of Moloney Murine Leukemia-Virus Envelope Polypeptides su and Tm - A Functional-Analysis of the Role of Tm Domains in Viral Entry. *Journal of Virology*, **68**, 3207-3219.
- Rahman, M., Lins, L., ThomasSoumarmon, A. & Brasseur, R. (1997) Are amphipathic asymmetric peptides ubiquitous structures for membrane destabilisation? *Journal of Molecular Modeling*, **3**, 203-215.
- Rand, R. P. & Parsegian, V. A. (1989) Hydration Forces Between Phospholipid Bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* **988**, 351-376.
- Rapaport, D. & Shai, Y. (1994) Interaction of Fluorescently Labeled Analogs of the Amino-Terminal Fusion Peptide of Sendai Virus with Phospholipid-Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 15124-15131.
- Ravault, S., Soubias, O., Saurel, O., Thomas, A., Brasseur, R. & Milon, A. (2005) Fusogenic Alzheimer's peptide fragment A beta (29-42) in interaction with lipid bilayers: Secondary structure, dynamics, and specific interaction with phosphatidyl ethanolamine polar heads as revealed by solid-state NMR. *Protein Science*, **14**, 1181-1189.
- Ravoo, B. J., Stuart, M. C. A., Brisson, A. D. R., Weringa, W. D. & Engberts, J. B. F. N. (2001) Electron microscopic investigation of the morphology and calcium-induced fusion of lipid vesicles with an oligomerised inner leaflet. *Chemistry and Physics of Lipids*, **109**, 63-74.
- Razinkov, V. I., Melikyan, G. B., Epand, R. M., Epand, R. F. & Cohen, F. S. (1998) Effects of spontaneous bilayer curvature on influenza virus-mediated fusion pores. *Journal of General Physiology*, **112**, 409-422.
- Razinkov, V. I., Melikyan, G. B. & Cohen, F. S. (1999) Hemifusion between cells expressing hemagglutinin of influenza virus and planar membranes can precede the formation of fusion pores that subsequently fully enlarge. *Biophysical Journal*, **77**, 3144-3151.
- Reithmeier, R. A. F. (1995) Characterization and Modeling of Membrane-Proteins Using Sequence-Analysis. *Current Opinion in Structural Biology*, **5**, 491-500.
- Rodriguez-Crespo, I., Nunez, E., Gomezgutierrez, J., Yelamos, B., Albar, J. P., Peterson, D. L. & Gavilanes, F. (1995) Phospholipid Interactions of the Putative Fusion Peptide of Hepatitis-B Virus Surface-Antigen S-Protein. *Journal of General Virology*, **76**, 301-308.

- Rodriguez-Crespo, I., Gomezgutierrez, J., Encinar, J. A., GonzalezRos, J. M., Albar, J. P., Peterson, D. L. & Gavilanes, F. (1996) Structural properties of the putative fusion peptide of hepatitis B virus upon interaction with phospholipids - Circular dichroism and Fourier-transform infrared spectroscopy studies. *European Journal of Biochemistry*, **242**, 243-248.
- Rodriguez-Crespo, I., Nunez, E., Yelamos, B., Gomez-Gutierrez, J., Albar, J. P., Peterson, D. L. & Gavilanes, F. (1999) Fusogenic activity of hepadnavirus peptides corresponding to sequences downstream of the putative cleavage site. *Virology*, **261**, 133-142.
- Rohl, C. A., Fiori, W. & Baldwin, R. L. (1999) Alanine is helix-stabilizing in both template-nucleated and standard peptide helices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 3682-3687.
- Roth, M. G., Doyle, C., Sambrook, J. & Gething, M. J. (1986) Heterologous transmembrane and cytoplasmic domains direct functional chimeric influenza virus hemagglutinins into the endocytic pathway. *J. Cell Biol.*, **102**, 1271-1283.
- Rothman, J. E. (1994) Mechanism of Intracellular Protein-Transport. *Nature*, **372**, 55-63.
- Ruiz-Arguello, M. B., Goni, F. M., Pereira, F. B. & Nieva, J. L. (1998) Phosphatidylinositol-dependent membrane fusion induced by a putative fusogenic sequence of Ebola virus. *Journal of Virology*, **72**, 1775-1781.
- Russell, C. J., Jardetzky, T. S. & Lamb, R. A. (2001) Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *Embo Journal*, **20**, 4024-4034.
- Sackett, K. & Shai, Y. (2003) How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain. *Journal of Molecular Biology*, **333**, 47-58.
- Sackett, K. & Shai, Y. (2005) The HIV fusion peptide adopts intermolecular parallel beta-sheet structure in membranes when stabilized by the adjacent N-terminal heptad repeat: A C-13 FTIR study. *Journal of Molecular Biology*, **350**, 790-805.
- Saez-Cirion, A. & Nieva, J. L. (2002) Conformational transitions of membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1564**, 57-65.
- Saez-Cirion, A., Nieva, J. L. & Gallaher, W. R. (2003) The hydrophobic internal region of bovine prion protein shares structural and functional properties with HIV type 1 fusion peptide. *Aids Research and Human Retroviruses*, **19**, 969-978.
- Sainz, B., Rausch, J. M., Gallaher, W. R., Garry, R. F. & Wimley, W. C. (2005) Identification and characterization of the putative fusion peptide of the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus spike protein. *Journal of Virology*, **79**, 7195-7206.
- Salaün, C., James, D. J. & Chamberlain, L. H. (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, **5**, 255-264.
- Salzwedel, K., Johnston, P. B., Roberts, S. J., Dubay, J. W. & Hunter, E. (1993) Expression and Characterization of Glycophospholipid-Anchored Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology*, **67**, 5279-5288.

- Sammalkorpi, M. & Lazaridis, T. (2007) Configuration of influenza hemagglutinin fusion peptide monomers and oligomers in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1768**, 30-38.
- Schaal, H., Klein, M., Gehrman, P., Adams, O. & Scheid, A. (1995) Requirement of N-Terminal Amino-Acid-Residues of Gp41 for Human-Immunodeficiency-Virus Type 1-Mediated Cell-Fusion. *Journal of Virology*, **69**, 3308-3314.
- Scheiffele, P., Roth, M. G. & Simons, K. (1997) Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO Journal*, **16**, 5501-5508.
- Schibli, D. J. & Weissenhorn, W. (2004) Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion (Review). *Molecular Membrane Biology*, **21**, 361-371.
- Schoch, C. & Blumenthal, R. (1993) Role of the Fusion Peptide Sequence in Initial-Stages of Influenza Hemagglutinin-Induced Cell-Fusion. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 9267-9274.
- Schroth-Diez, B., Ponimaskin, E., Reverey, H., Schmidt, M. F. & Herrmann, A. (1998) Fusion activity of transmembrane and cytoplasmic domain chimeras of the influenza virus glycoprotein hemagglutinin. *Journal of Virology*, **72**, 133-141.
- Schroth-Diez, B., Ludwig, K., Baljinnyam, B., Kozerski, C., Huang, Q. & Herrmann, A. (2000) The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses. *Biosciences Reports*, **20**, 571-595.
- Schwarz, G. & Taylor, S. E. (1999) Polymorphism and interactions of a viral fusion peptide in a compressed lipid monolayer. *Biophysical Journal*, **76**, 3167-3175.
- Shai, Y. (2000) Functional domains within fusion proteins: perspectives for development of peptide inhibitors of viral cell fusion. *Bioscience Reports*, **20**, 535-555.
- Siegel, D. P. (1984) Inverted micellar structures in bilayer membranes. Formation rates and half-lives. *Biophysical Journal*, **45**, 399-420.
- Siegel, D. P. (1993) Stalk Structures As Intermediates in Membrane-Fusion and Bilayer Nonbilayer Phase-Transitions. *Biophysical Journal*, **64**, A186.
- Siegel, D. P. & Epan, R. M. (1997) The mechanism of lamellar-to-inverted hexagonal phase transitions in phosphatidylethanolamine: Implications for membrane fusion mechanisms. *Biophysical Journal*, **73**, 3089-3111.
- Siegel, D. P. (1999) The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophysical Journal*, **76**, 291-313.
- Siegel, D. P. & Epan, R. M. (2000) Effect of influenza hemagglutinin fusion peptide on lamellar/inverted phase transitions in dipalmitoleoylphosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1468**, 87-98.

- Siegel, D. P., Cherezov, V., Greathouse, D. V., Koeppe, R. E., Killian, J. A. & Caffrey, M. (2006) Transmembrane peptides stabilize inverted cubic phases in a biphasic length-dependent manner: implications for protein-induced membrane fusion. *Biophysical Journal*, **90**, 200-211.
- Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, **69**, 531-569.
- Skehel, J. J., Cross, K., Steinhauer, D. & Wiley, D. C. (2001) Influenza fusion peptides. *Biochemical Society Transactions*, **29**, 623-626.
- Slepushkin, V. A., Andreev, S. M., Sidorova, M. V., Melikyan, G. B., Grigoriev, V. B., Chumakov, V. M., Grinfeldt, A. E., Manukyan, R. A. & Karamov, E. V. (1992) Investigation of Human-Immunodeficiency-Virus Fusion Peptides - Analysis of Interrelations Between Their Structure and Function. *Aids Research and Human Retroviruses*, **8**, 9-18.
- Slepushkin, V. A., Kornilaeva, G. V., Andreev, S. M., Sidorova, M. V., Petrukhina, A. O., Matsevich, G. R., Raduk, S. V., Grigoriev, V. B., Makarova, T. V. & Lukashov, V. V. (1993) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) penetration into target cells by synthetic peptides mimicking the N-terminus of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Virology* **194**, 294-301.
- Spruce, A. E., Iwata, A., White, J. M. & Almers, W. (1989) Patch Clamp Studies of Single Cell-Fusion Events Mediated by A Viral Fusion Protein. *Nature*, **342**, 555-558.
- Spruce, A. E., Iwata, A. & Almers, W. (1991) The 1St Milliseconds of the Pore Formed by A Fusogenic Viral Envelope Protein During Membrane-Fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 3623-3627.
- Stegmann, T., Doms, R. W. & Helenius, A. (1989) Protein-Mediated Membrane-Fusion. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **18**, 187-211.
- Stegmann, T., Delfino, J. M., Richards, F. M. & Helenius, A. (1991) The Ha2 Subunit of Influenza Hemagglutinin Inserts Into the Target Membrane Prior to Fusion. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 18404-18410.
- Stegmann, T. (2000) Membrane fusion mechanisms: The influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic*, **1**, 598-604.
- Steinhauer, D. A., Wharton, S. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1995) Studies of the Membrane-Fusion Activities of Fusion Peptide Mutants of Influenza-Virus Hemagglutinin. *Journal of Virology*, **69**, 6643-6651.
- Suarez, T., Gomara, M. J., Goni, F. M., Mingarro, I., Muga, A., Perez-Paya, E. & Nieva, J. L. (2003) Calcium-dependent conformational changes of membrane-bound Ebola fusion peptide drive vesicle fusion. *FEBS Letters*, **535**, 23-28.
- Supekar, V. M., Bruckmann, C., Ingallinella, P., Bianchi, E., Pessi, A. & Carfi, A. (2004) Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 17958-17963.

- Takahashi, S. (1990) Conformation of Membrane Fusion-Active 20-Residue Peptides with Or Without Lipid Bilayers - Implication of Alpha-Helix Formation for Membrane-Fusion. *Biochemistry*, **29**, 6257-6264.
- Takeda, M., Leser, G. P., Russell, C. J. & Lamb, R. A. (2003) Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 14610-14617.
- Tamm, L. K. & Han, X. (2000) Viral fusion peptides: a tool set to disrupt and connect biological membranes. *Bioscience Reports*, **20**, 501-518.
- Tamm, L. K., Han, X., Li, Y. & Lai, A. L. (2002) Structure and function of membrane fusion peptides. *Biopolymers*, **66**, 249-260.
- Tatulian, S. A. & Tamm, L. K. (1996) Reversible pH-dependent conformational change of reconstituted influenza hemagglutinin. *Journal of Molecular Biology*, **260**, 312-316.
- Tatulian, S. A. & Tamm, L. K. (2000) Secondary structure, orientation, oligomerization, and lipid interactions of the transmembrane domain of influenza hemagglutinin. *Biochemistry*, **39**, 496-507.
- Taylor, G. M. & Sanders, D. A. (1999) The role of the membrane-spanning domain sequence in glycoprotein-mediated membrane fusion. *Molecular Biology of the Cell*, **10**, 2803-2815.
- Thomas, A. & Bresseur, R. (2006) Tilted peptides: The history. *Current Protein & Peptide Science*, **7**, 523-527.
- Towler, M. C., Kaufman, S. J. & Brodsky, F. M. (2004) Membrane traffic in skeletal muscle. *Traffic*, **5**, 129-139.
- Tse, F. W., Iwata, A. & Almers, W. (1993) Membrane Flux Through the Pore Formed by A Fusogenic Viral Envelope Protein During Cell-Fusion. *Journal of Cell Biology*, **121**, 543-552.
- Tsurudome, M., Gluck, R., Graf, R., Falchetto, R., Schaller, U. & Brunner, J. (1992) Lipid Interactions of the Hemagglutinin Ha2 Nh2-Terminal Segment During Influenza Virus-Induced Membrane-Fusion. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 20225-20232.
- Vogel, S. S., Leikina, E. A. & Chernomordik, L. V. (1993) Lysophosphatidylcholine Reversibly Arrests Exocytosis and Viral Fusion at A Stage Between Triggering and Membrane Merger. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 25764-25768.
- Vonèche, V., Portelle, D., Kettmann, R., Willems, L., Limbach, K., Paoletti, E., Ruyschaert, J. M., Burny, A. & Bresseur, R. (1992) Fusogenic Segments of Bovine Leukemia-Virus and Simian Immunodeficiency Virus Are Interchangeable and Mediate Fusion by Means of Oblique Insertion in the Lipid Bilayer of Their Target-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 3810-3814.
- Vonheijne, G. (1994) Membrane-Proteins - from Sequence to Structure. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **23**, 167-192.

- Références bibliographiques -

- Weiss, C. D. & White, J. M. (1993) Characterization of Stable Chinese-Hamster Ovary Cells Expressing Wild-Type, Secreted, and Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology*, **67**, 7060-7066.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, **387**, 426-430.
- Weissenhorn, W., Calder, L. J., Wharton, S. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1998) The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 6032-6036.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1999) Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Molecular Membrane Biology*, **16**, 3-9.
- Weissenhorn, W., Hinz, A. & Gaudin, Y. (2007) Virus membrane fusion. *FEBS Letters*, **581**, 2150-2155.
- Wharton, S. A., Martin, S. R., Ruigrok, R. W. H., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1988) Membrane-Fusion by Peptide Analogs of Influenza-Virus Hemagglutinin. *Journal of General Virology*, **69**, 1847-1857.
- White, J. M. (1990) Viral and Cellular Membrane-Fusion Proteins. *Annual Review of Physiology*, **52**, 675-697.
- White, J. M. (1992) Membrane-Fusion. *Science*, **258**, 917-924.
- Wild, C., Oas, T., Mcdanal, C., Bolognesi, D. & Matthews, T. (1992) A Synthetic Peptide Inhibitor of Human-Immunodeficiency-Virus Replication - Correlation Between Solution Structure and Viral Inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 10537-10541.
- Wild, C. T., Shugars, D. C., Greenwell, T. K., Mcdanal, C. B. & Matthews, T. J. (1994) Peptides Corresponding to A Predictive Alpha-Helical Domain of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Gp41 Are Potent Inhibitors of Virus-Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 9770-9774.
- Wilk, T., Pfeiffer, T. & Bosch, V. (1992) Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology*, **189**, 167-177.
- Wilk, T., Pfeiffer, T., Bukovsky, A., Moldenhauer, G. & Bosch, V. (1996) Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain. *Virology*, **218**, 269-274.
- Wilson, I. A., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1981) Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, **289**, 366-373.

- Wong, T. C. (2003) Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion peptide by molecular dynamics simulation II. The glycine mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1609**, 45-54.
- Xu, Y. H., Lou, Z. Y., Liu, Y. W., Pang, H., Tien, P., Gao, G. F. & Rao, Z. H. (2004a) Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 49414-49419.
- Xu, Y. H., Lou, Z. Y., Liu, Y. W., Cole, D. K., Su, N., Qin, L., Li, X., Bai, Z. H., Rao, Z. H. & Gao, G. F. (2004b) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the fusion core from two new zoonotic paramyxoviruses, Nipah virus and Hendra virus. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **60**, 1161-1164.
- Xu, Y., Zhang, F., Su, Z., Mcnew, J. A. & Shin, Y. K. (2005) Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, **12**, 417-422.
- Yang, J., Gabrys, C. M. & Weliky, D. P. (2001) Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for an extended beta strand conformation of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochemistry*, **40**, 8126-8137.
- Yang, L. & Huang, H. W. (2002) Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science*, **297**, 1877-1879.
- Yeagle, P. L., Epan, R. M., Richardson, C. D. & Flanagan, T. D. (1991) Effects of the Fusion Peptide from Measles-Virus on the Structure of N-Methyl Dioleoylphosphatidylethanolamine Membranes and Their Fusion with Sendai Virus. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1065**, 49-53.
- Yin, H. S., Paterson, R. G., Wen, X. L., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (2005) Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 9288-9293.
- Yin, H. S., Wen, X. L., Paterson, R. G., Lamb, R. A. & Jardetzky, T. S. (2006) Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*, **439**, 38-44.
- Zampighi, G. A., Zampighi, L. M., Fain, N., Lanzavecchia, S., Simon, S. A. & Wright, E. M. (2006) Conical electron tomography of a chemical synapse: Vesicles docked to the active zone are hemi-fused. *Biophysical Journal*, **91**, 2910-2918.
- Zhang, Y. P., Lewis, R. N. A. H., Henry, G. D., Sykes, B. D., Hodges, R. S. & McElhaney, R. N. (1995) Peptide Models of Helical Hydrophobic Transmembrane Segments of Membrane-Proteins .1. Studies of the Conformation, Intrabilayer Orientation, and Amide Hydrogen Exchangeability of Ac-K-2-(La)(12)-K-2-Amide. *Biochemistry*, **34**, 2348-2361.
- Zhang, G. & Chen, Y. H. (2003) ELDKWA-epitope-specific monoclonal antibodies inhibit HIV env-mediated syncytium formation. *Immunobiology*, **207**, 259-264.
- Zhao, X., Singh, M., Malashkevich, V. N. & Kim, P. S. (2000) Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 14172-14177.

- Références bibliographiques -

- Zheng, Q., Deng, Y. Q., Liu, J., van der Hoek, L., Berkhout, B. & Lu, M. (2006a) Core structure of S2 from the human coronavirus NL63 spike Glycoprotein. *Biochemistry*, **45**, 15205-15215.
- Zheng, Z., Yang, R., Bodner, M. L. & Weliky, D. P. (2006b) Conformational flexibility and strand arrangements of the membrane-associated HIV fusion peptide trimer probed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochemistry*, **45**, 12960-12975.
- Zhu, N. L., Cannon, P. M., Chen, D. G. & Anderson, W. F. (1998) Mutational analysis of the fusion peptide of Moloney murine leukemia virus transmembrane protein p15E. *Journal of Virology*, **72**, 1632-1639.
- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J. D., Grise, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A. & Roux, K. H. (2006) Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature*, **441**, 847-852.
- Zimmerberg, J., Curran, M., Cohen, F. S. & Brodwick, M. (1987) Simultaneous Electrical and Optical Measurements Show That Membrane-Fusion Precedes Secretory Granule Swelling During Exocytosis of Beige Mouse Mast-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 1585-1589.
- Zimmerberg, J. (1993) Simultaneous electrical and optical measurements of individual membrane fusion events during exocytosis. *Methods in Enzymology*, **221**, 99-112.
- Zimmerberg, J., Blumenthal, R., Sarkar, D. P., Curran, M. & Morris, S. J. (1994) Restricted movement of lipid and aqueous dyes through pores formed by influenza hemagglutinin during cell fusion. *Journal Of Cell Biology* **127**, 1885-1894.
- Zimmerberg, J. & Chernomordik, L. V. (1999) Membrane fusion. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **38**, 197-205.
- Zschornig, O. & Ohki, S. (1993). Effect of cholesterol, diacylglycerol and phosphatidylethanolamine on PEG 6000 induced lipid mixing and surface dielectric constant of phosphatidylcholine vesicle. *General Physiology and Biophysics*, **12**, 259-269.

VII. ANNEXES

Annexe I

Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. & Brasseur, R. (2004) Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **8**, 163-176.

Les liposomes sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permet(tent) de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. Au sein de ces bicouches, tout comme dans les membranes biologiques, les mouvements des phospholipides sont observés. Les liposomes sont faciles à préparer. L'hydratation de film phospholipidique permet d'obtenir des liposomes multilamellaires. Pour obtenir des liposomes unilamellaires, des étapes supplémentaires sont nécessaires. Les liposomes sont employés dans l'industrie comme vecteurs de substances cosmétologiques. Ils sont aussi parfois utilisés comme vecteurs de thérapie génique, pour délivrer des médicaments ou encore comme supports de vaccins. Les liposomes constituent surtout un bon modèle membranaire et sont largement employés pour mieux comprendre les mécanismes intervenant au niveau de la membrane, comme la perméabilité, la fluidité, l'ancrage de protéines ou encore la fusion de deux membranes. Cette dernière est plus particulièrement expliquée dans cet article.

Les liposomes : description, fabrication et applications

Aurélien Lorin, Christelle Flore, Annick Thomas, Robert Brasseur

Centre de Biophysique moléculaire numérique. Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : lorin.a@fsagx.ac.be

Reçu le 20 février 2004, accepté le 14 mai 2004.

Les liposomes sont des vésicules sphériques de quelques dizaines à quelques milliers de nm de diamètre. Ces vésicules sont composées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques qui permet(tent) de séparer un milieu intravésiculaire d'un milieu extérieur. Au sein de ces bicouches, tout comme dans les membranes biologiques, les mouvements des phospholipides sont observés. Les liposomes sont faciles à préparer. L'hydratation de film phospholipidique permet d'obtenir des liposomes multilamellaires. Pour obtenir des liposomes unilamellaires, des étapes supplémentaires sont nécessaires. Les liposomes sont employés dans l'industrie comme vecteurs de substances cosmétologiques. Ils sont aussi parfois utilisés comme vecteurs de thérapie génique, pour délivrer des médicaments ou encore comme supports de vaccins. Les liposomes constituent surtout un bon modèle membranaire et sont largement employés pour mieux comprendre les mécanismes intervenant au niveau de la membrane, comme la perméabilité, la fluidité, l'ancrage de protéines ou encore la fusion de deux membranes. Cette dernière est plus particulièrement expliquée dans cet article.

Mots-clés. Bicouche, phospholipide, mouvements, application, fusion, préparation.

Liposomes: description, preparation and applications. Liposomes are spherical vesicles with a diameter ranging from 20 nm to a few thousands nm. These vesicles consist of one or several bilayers which separate an intravesicular from an external medium. Within these bilayers, like in the biological membrane, motion of phospholipids is observed. Liposomes are easy to prepare. The hydration of a phospholipidic film leads to the formation of multilamellar liposomes. Additional steps are required to form unilamellar liposomes. Liposomes are used for industrial purposes, such as the targeting of cosmetological compounds. They may also be used as therapy vectors, for drug delivery or as vaccine supports. Liposomes are good models for membranes and are widely used for improving the understanding of biological events that occur in cell membranes, such as permeability, fluidity, protein anchoring and fusion of membranes. This paper mainly emphasizes membrane fusion.

Keywords. Bilayer, phospholipid, motion, application, fusion, preparation.

1. QU'EST-CE QU'UN LIPOSOME ?

La première personne à avoir volontairement fabriqué des liposomes est Bangham en 1965 (Bangham *et al.*, 1965). Les liposomes sont des structures fermées constituées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques organisées entre deux compartiments aqueux (**Figure 1A**) (Bangham *et al.*, 1965 ; Johnson *et al.*, 1971). Leur taille varie de 20 nm à plusieurs dizaines de μm . Lorsque des protéines sont insérées dans leur matrice, on parle alors de protéoliposomes (Rigaud, 2002).

À l'exception des lysophospholipides et de quelques phospholipides acides, les phospholipides naturels forment spontanément des liposomes en milieu aqueux (Poznansky, Weglicki, 1974 ; Lebed' *et al.*, 1989). Les phospholipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent une tête polaire et une queue apolaire. En milieu aqueux, l'organisation la

plus stable est celle qui permet de minimiser les interactions entre composantes hydrophobes et molécules d'eau. Les lipides s'organisent le plus souvent en bicouches avec les queues apolaires au centre de la bicouche non accessible à l'eau et les têtes polaires exposées au milieu aqueux (**Figure 1B**). Cette structure est refermée sur elle-même en une vésicule, qui isole un compartiment interne aqueux. Le libre passage de macromolécules d'un compartiment à l'autre est empêché, au contraire de celui de quelques solutés hydrophobes ou de petits solutés hydrophiles qui diffusent librement au travers de la bicouche (Inoue, 1974 ; Naoi *et al.*, 1977 ; Deamer, Bramhall, 1986). L'épaisseur d'une bicouche est plus ou moins égale à deux fois la longueur des plus grands lipides qui la composent. Le contenu de la bicouche, et notamment la présence de protéines, peut en augmenter l'épaisseur, qui reste toutefois inférieure à 10 nm (Callow, McGrath, 1985 ; Tahara, Fujiyoshi, 1994).

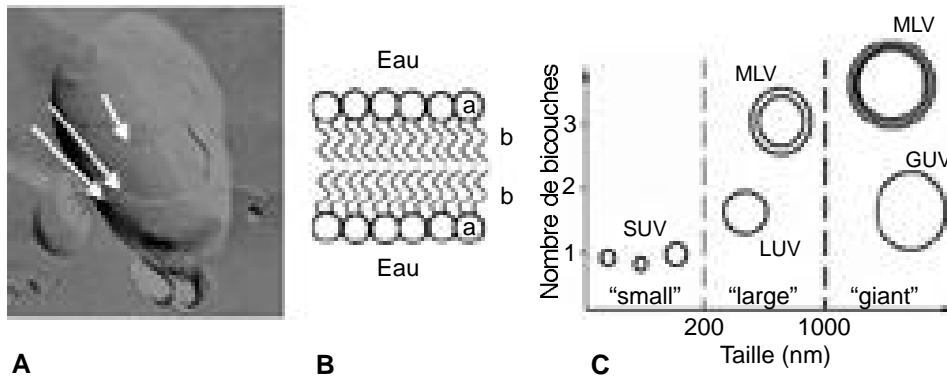


Figure 1. A. Photographie d'un liposome multilamellaire obtenu par fracture par Gabriel Peranzi (IBSERM U 410). Les flèches blanches indiquent les différentes bicouches lipidiques—*Photograph of a multilamellar liposome prepared by fracture by Gabriel Peranzi (IBSERM U 410).* The white arrows indicate a phospholipid bilayer; **B.** Représentation d'une bicouche lipidique—*Diagram of a lipidic bilayer*

(a) tête polaire — *polar head*, (b) queue hydrophobe — *hydrophobic tail*; **C.** Classification des liposomes selon leur nombre de bicouches et leur taille — *Classification of the liposomes according to size and number of bilayers.*

On classe les liposomes selon leur taille et leur nombre de bicouches. On distingue les liposomes multilamellaires (MLV), les liposomes unilamellaires de petite taille (SUV), les liposomes unilamellaires de grande taille (LUV) et les liposomes géants (GUV) (Figure 1C).

2. MOUVEMENTS DES LIPIDES DANS UN LIPOSOME

2.1. Rotation des chaînes latérales et fluidité membranaire

Une rotation est possible autour des liaisons C-C des chaînes hydrocarbonées des queues apolaires des phospholipides. La configuration *trans* est la plus stable (Keweloh, Heipieper, 1996). Dans une situation où toutes les configurations autour des liaisons C-C sont de type *trans*, la chaîne est étirée au maximum (Figure 2A). Deux autres configurations des liaisons C-C sont possibles : les configurations gauche + et gauche -. Des configurations gauches dans une chaîne provoquent un changement de direction (Figure 2B). Le passage d'une configuration *trans* à une configuration gauche autour d'une liaison C-C nécessite de l'énergie (Berde *et al.*, 1980). Il peut aussi y avoir des doubles liaisons *cis* au niveau de la chaîne (Cevc, 1991). La double liaison *cis* conduit également à un changement de direction.

À une température suffisamment faible, la plupart des chaînes carbonées des lipides sont *trans*. Les chaînes sont parallèles les unes aux autres et la conformation de la bicouche est de type *gel* (Figure 2C). Une élévation de température entraîne un accroissement de la mobilité moléculaire (Schechter, 2002). La probabilité d'une isomérisation *trans* → gauche augmente. Dans une bicouche lipidique, les liaisons *cis* et gauches rendent le parallélisme des chaînes plus difficile (Berde *et al.*, 1980 ; Cevc, 1991). Au-delà d'une température donnée, appelée température de

transition, une transition coopérative est observée, qui fait passer la conformation ordonnée à une conformation désordonnée (Figure 2D). Dans la conformation désordonnée, appelée *fluide*, les chaînes oscillent autour d'un axe moyen perpendiculaire au plan de la membrane. Les chaînes ne sont plus étirées au maximum et l'épaisseur de la bicouche diminue (Cevc, 1991). Le contact entre chaînes est moins étroit et les lipides sont plus séparés les uns des autres. Ainsi, au cours de la transition, une expansion latérale des lipides dans la bicouche est observée, aux dépens de l'épaisseur. La surface occupée à l'interface est plus importante.

Tout ce qui s'oppose à l'expansion latérale des lipides s'oppose à la transition de l'état ordonné vers l'état désordonné. Plus le nombre d'interactions inter-lipidiques est grand, moins l'expansion latérale est grande. Ainsi,

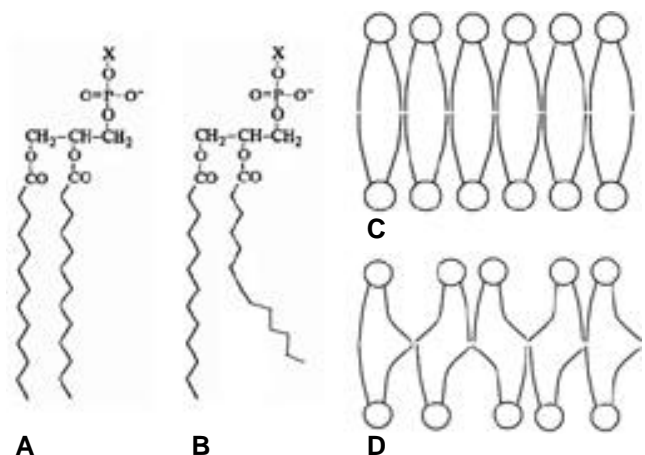


Figure 2. A. Phospholipide tout-*trans* — *All-trans phospholipid*; **B.** Phospholipide avec une liaison gauche — *Phospholipid with a "gauche" bond*; **C.** Membrane en conformation *gel* — *Bilayer in gel conformation*; **D.** Membrane en conformation *fluide* — *Bilayer in fluid conformation.*

la température de transition augmente avec le nombre d'interactions entre lipides, notamment les interactions hydrophobes (Seydel *et al.*, 1981). Le nombre d'interactions hydrophobes augmentent avec la longueur des chaînes acyles des lipides. La température de transition augmente donc proportionnellement à la longueur des chaînes acyles (**Tableau 1**). Par contre, les insaturations *cis* défavorisent les interactions entre chaînes. La température de transition diminue donc fortement avec le nombre d'insaturations *cis* (**Tableau 1**). La température de transition dépend ainsi de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras constituant les lipides de la membrane. Il y a donc une relation linéaire entre la température de fusion des acides gras d'un lipide et la température de transition d'une membrane composée de ce lipide (**Tableau 1**) (Chaudhury, Ohki, 1981).

Des mouvements autres que l'expansion latérale interviennent aussi au niveau des phospholipides des bicouches lipidiques. En effet, les lipides tournent autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane (**Figure 3A**). Les chaînes hydrocarbonées sont flexibles et animées d'un mouvement de balancier plus ou moins prononcé ; ces mouvements confèrent à la membrane une certaine fluidité et un mouvement de diffusion latérale (**Figure 3B**) ; cette diffusion est relativement lente (Kornberg, McConnell, 1971a ; Devaux, McConnell, 1972 ; Gaede, Gawrisch, 2003).

La fluidité membranaire dépend de la température mais aussi de la conformation des chaînes lipidiques

Tableau 1. Températures de transition de lipides et températures de fusion des acides gras composant ces lipides selon la longueur de leurs chaînes acyles et le nombre d'insaturations en configuration *cis* (Schechter, 2002). 18 :1 correspond à une chaîne acyle de 18 carbones, contenant une insaturation — *Lipid transition temperatures and melting temperatures of their constitutive fatty acids according to length of acyl chains and the number of cis unsaturations (Schechter, 2002). 18:1 stands for one acyl chain of 18 carbons and one unsaturation.*

Phospholipide	Température (°C)	
	transition	fusion des acides gras
Longueur de chaîne		
12 :0, 12 :0 (DLPC)	-2	44
14 :0, 14 :0 (DMPC)	25	54
16 :0, 16 :0 (DPPC)	41	63
18 :0, 18 :0 (DSPC)	55	70
Saturation des chaînes		
18 :0, 18 :0 PE	108	70
18 :1, 18 :1 PE	10	13
18 :2, 18 :2 PE	-20	-5
18 :3, 18 :3 PE	-30	-11

composant la vésicule (**Figure 4**) (Schechter, 2002). Lorsque celles-ci sont ordonnées, leurs interactions sont fortes et la fluidité est faible. Le passage d'un état de la bicouche du liposome à un état s'accompagne d'une brusque augmentation de la fluidité (**Figure 4**). Pour les mêmes raisons que la température de transition, à une même température, la fluidité est plus importante pour une bicouche composée de phospholipides à courtes chaînes acyles que pour une bicouche composée de phospholipides à longues chaînes acyles. Par contre, la présence de liaisons gauches ou *cis*, qui contrarient le parallélisme des chaînes acyles, accroît la fluidité.

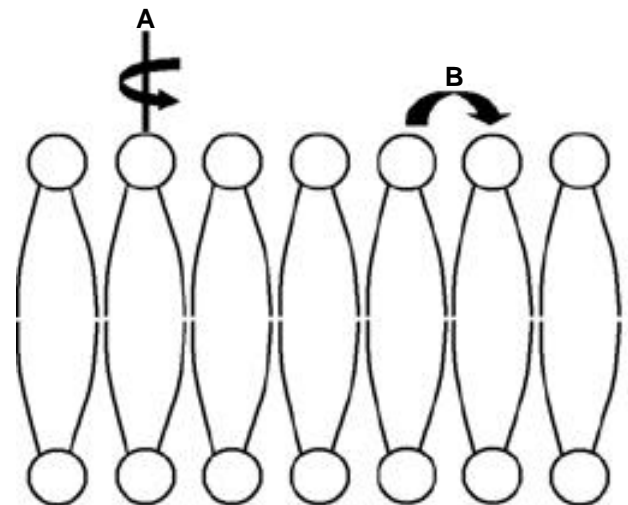


Figure 3. Représentation du mouvement des lipides — *Schematic lipid motions.*

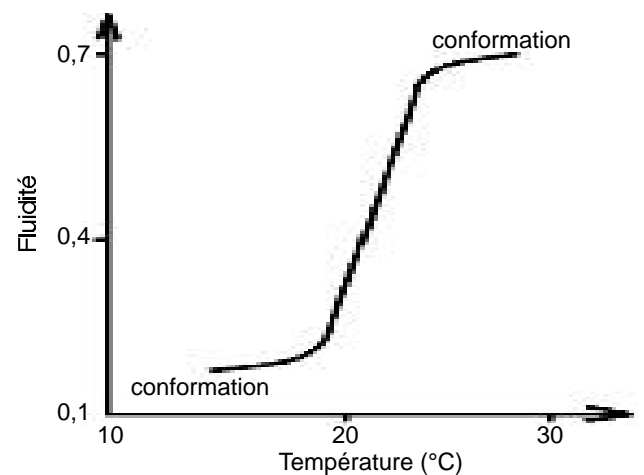


Figure 4. Mesure de la fluidité de la DiméthylPhosphatidylCholine (DMPC) en fonction de la température — *Temperature depending on the fluidity measurement for DimethylPhosphatidylCholine (DMPC).*

2.2. Asymétrie et diffusion transversale des lipides dans un liposome

Les lipides sont capables de passer d'une monocouche à l'autre. Il s'agit d'une diffusion transversale également appelée "flip-flop" (**Figure 5**). Un lipide diffuse d'une monocouche à l'autre ; la diffusion transversale d'un lipide implique le passage de sa partie polaire à travers la membrane d'une interface à l'autre (Kornberg, McConnell, 1971b ; Kirby, Green, 1977 ; Middelkoop *et al.*, 1986). Le "flip-flop" est un processus peu fréquent ; on estime qu'il faut plusieurs jours pour qu'un flip-flop se produise (Rothman, Dawidowicz, 1975). Dans les protéoliposomes, cette diffusion peut être facilitée par des protéines membranaires intégrales, la partie polaire du lipide évitant le contact avec la partie hydrophobe de la membrane (Barsukov *et al.*, 1982).

3. PRÉPARATION DE LIPOSOMES

La méthode la plus simple pour préparer des liposomes consiste à évaporer le solvant organique dans lequel sont dissous les lipides, puis à les remettre en suspension dans un solvant aqueux (Bangham *et al.*, 1965). Cette opération doit se dérouler dans des conditions de température dépendant de la nature du (des) lipide(s) choisi(s). En effet, les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase. Une agitation est souvent nécessaire pour améliorer les résultats. Dans un milieu aqueux, le film lipidique s'hydrate et les phospholipides s'associent de manière à ne pas exposer leurs chaînes acyles au solvant : il en résulte la formation de bicouches, qui se referment en emprisonnant du solvant. Des bicouches peuvent enfermer d'autres bicouches de plus petite taille. Ainsi, lors de cette préparation, des liposomes multilamellaires se constituent en bicouches lipidiques concentriques et séparées, les unes des autres, par des couches d'eau (MLV). Ces liposomes ont des tailles très hétérogènes et possèdent un volume aqueux interne relativement faible par rapport au poids du lipide (**Figure 1C**).

Un traitement physique doit être appliqué aux MLV pour les transformer en vésicules de taille

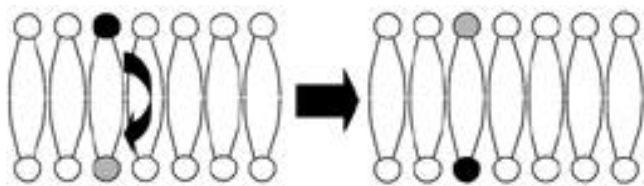


Figure 5. Représentation du mouvement flip-flop — *Flip-flop motion*.

homogène, formées d'une seule bicouche lipidique entourant un milieu aqueux. Suivant le traitement appliqué, les vésicules peuvent être de petite taille (SUV) ou de grande taille (LUV). Les SUV (**Figure 1C**) s'obtiennent le plus fréquemment en soumettant une suspension de MLV aux ultrasons (50 W pendant cinq minutes) (Lorin *et al.*, en préparation). Lors de cette étape, la suspension de liposomes doit être maintenue à une température supérieure à celle de transition. Pendant la sonication, les phospholipides risquent de s'oxyder (au niveau des liaisons C=C) et même de s'hydrolyser (Klein, 1970 ; Hauser, 1971 ; Huang, Charlton, 1972). Pour éviter la dégradation, un certain nombre de précautions doivent être prises en soniquant à basse fréquence, durant un temps court et sous atmosphère d'azote ou d'argon (Lorin *et al.*, en préparation). La tête de sonication produit des fragments de titane, qui sont éliminés en même temps que les MLV résiduels, soit par centrifugation (10.000 g pendant deux minutes), soit par tamisage moléculaire sur Sépharose (Elorza *et al.*, 1993 ; Lorin *et al.*, en préparation). Par définition, les SUV ont un diamètre inférieur à 200 nm.

En vue de préparer des LUV (**Figure 1C**), la solution de MLV est soumise à des cycles de congélation/décongélation, ce qui fragilise la membrane et permet de reconstruire des liposomes unilamellaires (Pillot *et al.*, 1996). Les MLV résiduels et les LUV de trop grande taille sont éliminés par filtration (pore de 100 nm). Du fait du grand diamètre des LUV, l'organisation des phospholipides est identique dans chacune des monocouches (Schieren *et al.*, 1978).

Des liposomes peuvent aussi être préparés par la technique de l'inversion de phase (Papahadjopoulos, Watkins, 1967) ou par dialyse de détergents contenant les phospholipides (Luna, McConnell, 1977).

4. APPLICATIONS DES LIPOSOMES

4.1. Applications thérapeutiques

Les liposomes peuvent véhiculer des médicaments dans l'organisme. Suivant la nature du médicament, sa localisation au niveau du liposome est différente. Si le médicament est soluble dans l'eau, il est encapsulé dans le volume intraliposomal, alors que s'il est hydrophobe, il est dissous dans la phase lipidique (Bouffieux, 1995 ; Yu, Lin, 2000 ; Redziniak, 2003). S'il est amphiphile, le composé est localisé au niveau de l'interface tête polaire/queue hydrophobe des phospholipides (Bouffieux, 1995 ; Espuelas *et al.*, 2003). Dans les trois cas, le principe actif peut être véhiculé dans l'organisme par simple injection (Gregoriadis, 1981). Dans la circulation, les liposomes fusionnent avec des membranes cellulaires ou sont

endocytés (Pagano, Weinstein, 1978). Le principe actif est alors délivré dans la cellule. La firme Theralipids Inc. a créé, en 1996, un liposome pouvant fusionner avec les parois bactériennes (http://www.theralipids.com/fr/strategy_fr.htm). Ces liposomes, qui peuvent être administrés directement par inhalation, favorisent de façon marquée la pénétration de l'agent antimicrobien (comme la tobramycine) dans les micro-organismes et améliorent l'efficacité de celui-ci en prolongeant sa durée de vie.

Le médicament peut être aussi délivré lentement et de manière continue par le liposome vers les cellules cibles sans qu'il y ait pénétration des liposomes dans les cellules. Ainsi, la morphine, composé amphiphile, peut être encapsulée dans des liposomes multilamellaires (Bouffieux, 1995). Après injection de ces liposomes à l'endroit où l'on désire l'anesthésie, la morphine diffuse lentement au travers des nombreuses bicouches des MLV avant d'être libérée de façon passive et continue dans le milieu. L'emploi de liposomes permet de prolonger l'action de la morphine et de réduire sa concentration locale et donc sa toxicité et ses effets secondaires (Bouffieux, 1995).

Les liposomes sont rapidement éliminés de la circulation par les macrophages (Schwendener *et al.*, 1984). Ils s'accumulent dans le foie et la rate, ce qui limite leur utilisation pour traiter des affections au niveau d'autres organes (Hinkle *et al.*, 1978 ; van Rooijen, van Nieuwmegen, 1984). Par contre, le traitement des affections spécifiques du foie et de la rate est plus facile *via* les liposomes. Pour augmenter le temps de vie des liposomes dans la circulation, une composition lipidique spéciale doit être utilisée afin d'éviter la phagocytose. L'addition de gangliosides ou de polyéthylène glycol augmente le temps de circulation (Klibanov *et al.*, 1990 ; Correa *et al.*, 1993).

Les liposomes peuvent encapsuler un gène ou un plasmide (Dimitriadis, 1979 ; Perrie, Gregoriadis, 2000). Dans ce cas, le liposome est utilisé comme vecteur de thérapie génique. Après injection, le liposome est endocyté au niveau de la membrane cellulaire (Zhou, Huang, 1994 ; Li *et al.*, 1996). Puis, le liposome fusionne avec l'endosome, permettant la libération de l'ADN. L'ADN peut alors s'exprimer dans la cellule. Pour cette utilisation, le liposome doit satisfaire à plusieurs conditions. Il doit tout d'abord présenter à sa surface un promoteur de fusion, qui permet une meilleure intégration dans les cellules cibles. Ce promoteur est fréquemment une glycoprotéine virale de surface (ex : protéine F du virus de Sendai) (Kunisawa, Mayumi, 2001 ; Kim, Park, 2002). Le liposome est aussi composé de certains phospholipides et/ou protéines qui diminuent leur capture par les cellules macrophages et permettent un ciblage tissulaire (Torchilin *et al.*, 1980 ; Moghimi,

Szebeni, 2003). Enfin, les liposomes employés en thérapie génique sont sensibles au pH (Leventis *et al.*, 1987). En effet, si le liposome est absorbé par la cellule, il se retrouve dans le lysosome à un pH acide. S'il est sensible au pH, il peut y avoir fusion avec le lysosome et libération du matériel génétique dans le cytoplasme de la cellule. Certains liposomes portent des charges cationiques en surface, qui permettent de déstabiliser la membrane des endosomes (Zhou, Huang, 1994 ; Noguchi *et al.*, 1998 ; Briane *et al.*, 2002). Malgré les avancées effectuées ces dernières années, l'emploi de liposomes comme vecteurs de matériel génétique reste limité. L'efficacité de transfection est plus faible qu'avec les vecteurs viraux (<http://www.medespace.com/cancero/doc/therageni.html>), en particulier des problèmes de ciblage du noyau sont observés et le temps d'expression du gène est souvent trop court. Néanmoins, certaines firmes fournissent des liposomes conçus pour transporter du matériel génétique et transfecter des cellules. Ainsi, le "Transfast Transfection Reagent" est un liposome composé d'un lipide cationique synthétique en association avec un lipide neutre, le DOPE, qui permet de transfecter des cultures primaires neuronales (<http://www.promega.com/fr/promegazette/Prom26/prom7.pdf>). Selon la firme qui le commercialise, ce liposome assure une transfection rapide (en 30 à 60 minutes), élevée (5 % des cellules neuronales traitées), stable, moyennant une relative facilité d'emploi.

Les liposomes sont aussi employés pour exposer des protéines à leur surface. Dans le cas de glycoprotéines virales, ces liposomes sont appelés virosomes (Almeida *et al.*, 1975 ; Kapczynski, Tumpey, 2003). Après injection, les virosomes sont en grande partie captés par les cellules macrophages (Wijburg *et al.*, 1998). Ils exposent ainsi directement l'agent antigène et activent le système immunitaire (<http://www.exopol.com/fr/base3.fr.html> ; Wijburg *et al.*, 1998). Ces virosomes sont donc employés comme vaccins. Leur avantage est de ne pas contenir de matériel génétique infectieux tout en présentant la molécule antigénique.

4.2. Applications cosmétologiques

De nombreuses substances utilisées en cosmétologie (antioxydants, collagène, etc.) sont en général appliquées localement sous forme d'émulsion huileuse ou de solution alcoolique. L'huile et l'alcool peuvent endommager la peau en cas d'application prolongée. L'encapsulation dans des liposomes permet de contourner ce problème (Lasic, 1998 ; Schechter, 2002 ; Redziniak, 2003). Aussi, en plus de la diffusion passive et continue du produit au travers des bicouches des liposomes, ceux-ci peuvent fusionner avec les

cellules de la peau et libérer le principe actif dans la cellule et augmenter son efficacité.

4.3. Applications biochimiques et biophysiques

Les liposomes sont largement utilisés pour l'étude des propriétés membranaires. En effet, ils constituent un modèle membranaire qui tente de reproduire la structure et les propriétés des membranes biologiques. L'avantage de leur utilisation réside dans la possibilité de moduler les conditions expérimentales pour mettre en évidence l'influence de certains facteurs sur les propriétés membranaires. L'effet de paramètres tels que la composition lipidique, la température, la force ionique, l'asymétrie lipidique et le pH du milieu peut être étudié (Szoka, Papahadjopoulos, 1980 ; Tonkonog *et al.*, 1982 ; Carrión *et al.*, 1994 ; Nacka *et al.*, 2001). Un large éventail de techniques a été développé. La plupart s'appliquent à l'étude de membranes biologiques (Owen, 1980 ; Struck *et al.*, 1981 ; Hoekstra *et al.*, 1984 ; Ehrenberg, 1986 ; Hong *et al.*, 1988 ; Hope *et al.*, 1989 ; Schanck *et al.*, 1992 ; Fenske, 1993 ; Winterhalter, Lasic, 1993). Elles donnent accès à des informations diverses, telles que la perméabilité, la fluidité ou encore l'organisation des vésicules.

Il importe cependant de rester vigilant avant d'extrapoler aux membranes biologiques les résultats obtenus avec des liposomes. Ces derniers ne miment pas parfaitement la complexité des structures membranaires. Ils ne reproduisent que pauvrement l'implication des facteurs extramembranaires dans la régulation de leurs fonctions. La matrice lipidique des liposomes peut assez bien correspondre à celle des membranes biologiques. Par contre, il est difficile de prendre en considération des éléments comme la variabilité des chaînes d'acides gras ou la présence de certains lipides et glycolipides dans les membranes biologiques. De plus, les membranes biologiques sont entourées par des milieux complexes et différents de part et d'autre, alors que les liposomes sont généralement dans un tampon de pH et de contenu ionique déterminés mais homogènes.

Toutefois, les liposomes constituent de bons modèles pour étudier ce qui se déroule au niveau membranaire lors de différents processus tels que la fusion (Martin, Ruysschaert, 2000).

4.4. Un exemple d'application biochimique : mesure de la fusion de membranes

La fusion membranaire est un mécanisme biologique important intervenant dans des processus aussi variés que la fécondation (fusion de deux cellules), la fusion virale, la division cellulaire, l'endocytose et l'exocytose. Elle implique le rapprochement, la

coalescence de deux bicouches lipidiques et une réorganisation structurale de ces bicouches. Lors de cette fusion, il y a mélange des lipides et des milieux aqueux de chaque vésicule.

Détection expérimentale de la fusion. Idéalement, la fusion entre deux liposomes s'effectue sans qu'il y ait contact entre le contenu des liposomes et le milieu extérieur.

Mélange de lipides. La technique la plus utilisée pour suivre le mélange de lipides consécutif à une fusion est le transfert d'énergie par résonance entre deux sondes de fluorescence (Hoekstra, 1982). En pratique, les donneurs et accepteurs utilisés sont, le plus souvent, des dérivés fluorescents de phospholipides. Le couple NBD/Rh (N[7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl]/N[lissamine rhodamine B sulfonyle]) est un exemple (formule fournie à la **figure 7**). Dans ce couple, le NBD (= longueur d'onde ; excitation = 460 nm ; émission = 535 nm) est le donneur d'énergie et le Rh (excitation = 563 nm ; émission = 585 nm) est l'accepteur (**Figure 6**). Le chromophore peut être attaché à la partie polaire ou à une chaîne hydrocarbonée du lipide, comme la phosphatidyl-éthanolamine ; le couple est alors NBD-PE/Rh-PE.

Les deux sondes sont fluorescentes. Excité à 460 nm, le NBD retourne à l'état fondamental en émettant à une longueur d'onde de 535 nm. Il faut exciter le Rh à 563 nm pour mesurer sa fluorescence à 585 nm (**Figure 6A**). Lorsqu'ils sont éloignés de plus de 2 nm, l'énergie libérée par l'excitation de NBD ne permet pas d'exciter le Rh. À plus courte distance, l'accepteur Rh est capable d'absorber l'énergie de fluorescence du donneur NBD. L'excitation du donneur suivie de son retour à l'état fondamental peut donc s'accompagner d'une excitation du receveur. Il s'agit d'un transfert d'énergie par résonance. On observe alors, en n'excitant que le donneur, l'apparition d'une fluorescence du receveur. L'efficacité du transfert d'énergie dépend de la distance entre le donneur et le receveur. Elle est nulle pour une distance supérieure à 2 nm. Le transfert d'énergie entre deux sondes fluorescentes nécessite, au moins de manière partielle, le recouvrement entre le spectre d'émission (fluorescence) du donneur et le spectre d'excitation (absorption) de l'accepteur.

Les deux dérivés lipidiques sont insérés dans des liposomes différents et aucun transfert d'énergie n'est possible avant fusion. La fusion s'accompagne d'un rapprochement des deux dérivés au sein d'une même membrane. L'émission à 460 nm excite alors le NBD qui transmet son énergie au Rh (**Figure 6B**). L'excitation de celui-ci provoque une émission mesurable à 585 nm. S'il y a fusion, la fluorescence du Rh-PE augmente sous l'application d'une excitation à

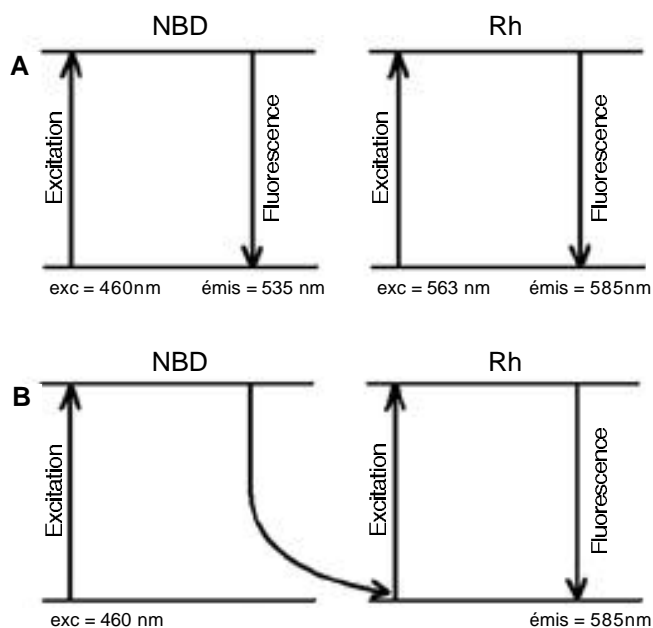


Figure 6. Principe du transfert d'énergie par résonance — *Principle of energy transfer by resonance.*

A. Les deux molécules fluorescentes sont à une distance qui ne permet pas le transfert d'énergie. Excitation à des longueurs d'onde différentes du NBD et de Rh — *The two fluorescent molecules are not close enough to allow energy transfer to occur. Excitation at different wavelengths of Rh and NBD.* **B.** Les deux molécules fluorescentes sont à une distance qui permet le transfert d'énergie. Excitation du NBD à 460 nm. Transfert d'énergie du NBD vers le Rh non excité. Excitation du Rh suivie de sa fluorescence mesurable à 585 nm — *The two fluorescent molecules are close enough for the energy transfer to occur. Excitation of NBD at 460 nm. Transfer of energy from NBD to non excited Rh. Excitation of Rh and emission measured at 585 nm.*

460 nm. Par contre, celle du NBD-PE diminue (**Figure 7**).

Par cette méthode, il n'est toutefois pas facile de distinguer la fusion de liposomes d'une simple agrégation. Cette dernière s'accompagne également d'un rapprochement des deux sondes.

Cette difficulté peut être contournée en insérant initialement les deux sondes dans une même population de vésicules et en suivant la fusion avec des vésicules dénuées de sondes fluorescentes. La simple agrégation avec des vésicules dénuées de sonde ne conduit pas à une variation du transfert d'énergie. Seule la fusion avec des liposomes dénués de dérivés fluorescents s'accompagne d'une augmentation de la distance moyenne des dérivés fluorescents, donc d'une diminution du transfert d'énergie. Excité à 460 nm, la fluorescence du Rh-PE diminue, alors que celle du NBD-PE augmente (**Figure 8**).

Dans d'autres essais, un dérivé d'acide gras fluorescent, tel que l'octadecylrhodamine B, peut être

inséré dans la membrane de liposomes (**Figure 9**) (Ellens *et al.*, 1985). À fortes concentrations de la sonde, une extinction de fluorescence est observée. La fusion avec des liposomes ne contenant pas la sonde conduit à sa dilution et donc à une augmentation de fluorescence.

Mélange des contenus intravésiculaires. La fusion de deux membranes peut également être suivie par le mélange des compartiments aqueux (Ellens *et al.*, 1985). Pour cela, deux composés dont les propriétés diffèrent selon qu'ils sont séparés ou mélangés, sont encapsulés séparément dans le compartiment aqueux de deux populations de liposomes. Le plus fréquemment, on encapsule une sonde fluorescente dans les compartiments d'une première population de liposomes et un "quencher" de cette sonde dans une seconde population. La fluorescence de la première population est notée avant la fusion. Lorsque la fusion a lieu, les deux compartiments aqueux se mélangent (**Figure 10**). Le "quencher" provoque alors l'extinction de la fluorescence de la sonde. L'ANTS est la sonde la plus fréquemment employée pour ce test, alors que le "quencher" utilisé est le DPX.

Les liposomes : utiles pour la compréhension des étapes de la fusion. Ces tests de fusion de liposomes ont permis d'étudier de nombreux mécanismes intervenant lors de la fusion.

L'analyse de la fusion des liposomes a tout d'abord montré que les deux bicouches devaient entrer en contact avant la fusion, impliquant au moins de manière transitoire un réarrangement de la bicouche et l'adoption par les lipides d'une structure d'énergie plus élevée (Wilschut, Hoekstra, 1986 ; White, 1992 ; Zimmerberg, Chernomordik, 1999). Cette augmentation d'énergie a été observée lors de l'analyse de la fusion de liposomes ou de bicouches (Wilschut, Hoekstra, 1986 ; Chernomordik, Kozlov, 2003). Cet assemblage ne se réalise pas spontanément. La présence de catalyseurs est nécessaire. Dans le cas de la fusion virale, il a été clairement montré, par analyse de fusion de liposomes, que le catalyseur pouvait être un petit fragment d'une glycoprotéine de surface virale, appelé peptide de fusion (White, 1992 ; Epand, 2003). C'est l'addition du peptide de fusion à des liposomes qui assure leur fusion (White, 1992 ; Glushakova *et al.*, 1992 ; Bailey *et al.*, 1997). Ces études ont permis de mieux caractériser la structure des peptides de fusion et leur mode d'action sur les bicouches. Ces segments protéiques agissent en s'insérant obliquement, sous forme hélicoïdale, dans la membrane (Tatulian *et al.*, 1995 ; Pereira *et al.*, 1995 ; Martin, Ruysschaert, 2000 ; Brasseur, 2000 ; Han *et al.*, 2001 ; Gordon *et al.*, 2002). L'insertion perturberait le parallélisme des chaînes acyles des

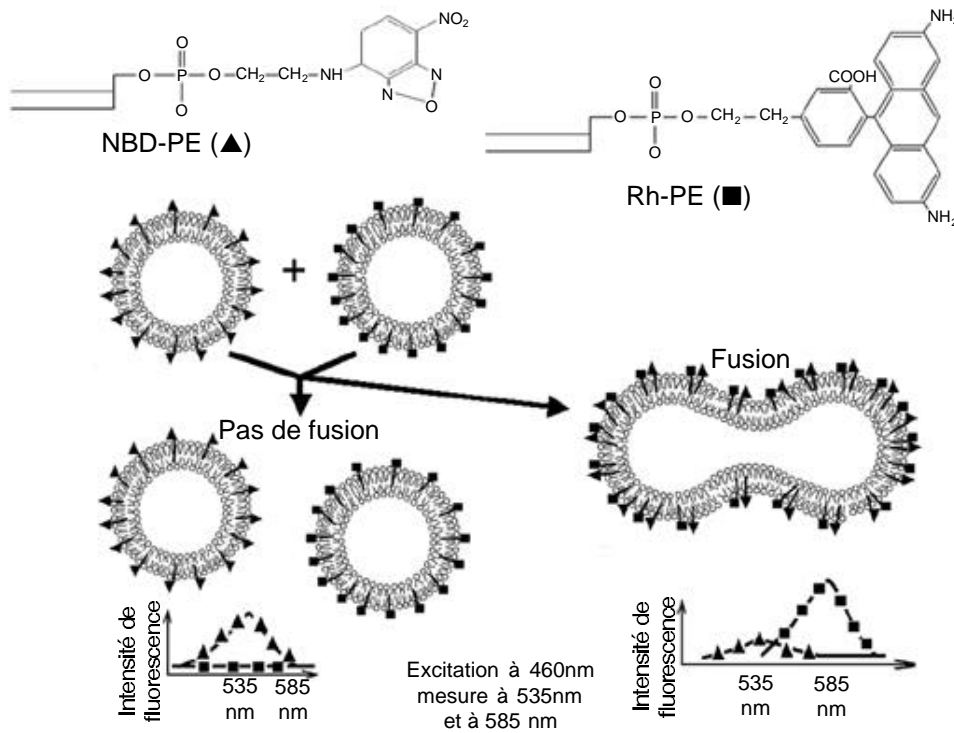


Figure 7. Analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes de fluorescence préalablement insérées dans deux populations de liposomes différentes — *Fusion analysis by the energy transfer method, by resonance between two fluorescence probes incorporated into two distinct populations of liposomes.*

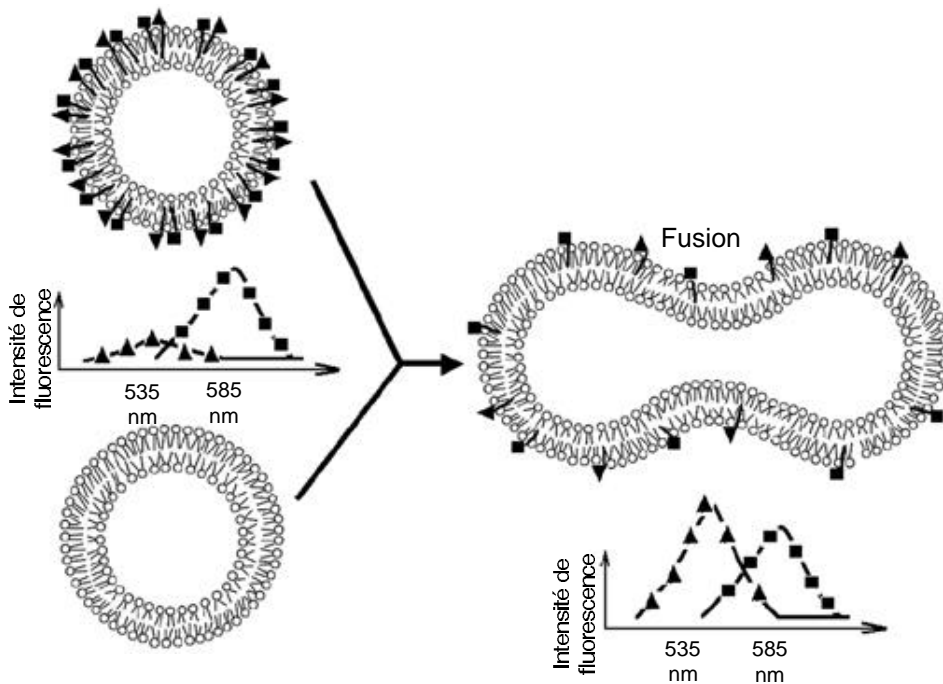


Figure 8. Analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes de fluorescence préalablement insérées dans la même population de liposomes — *Fusion analysis by the energy transfer method, by resonance between two probes of fluorescence incorporated into the same liposome population.*

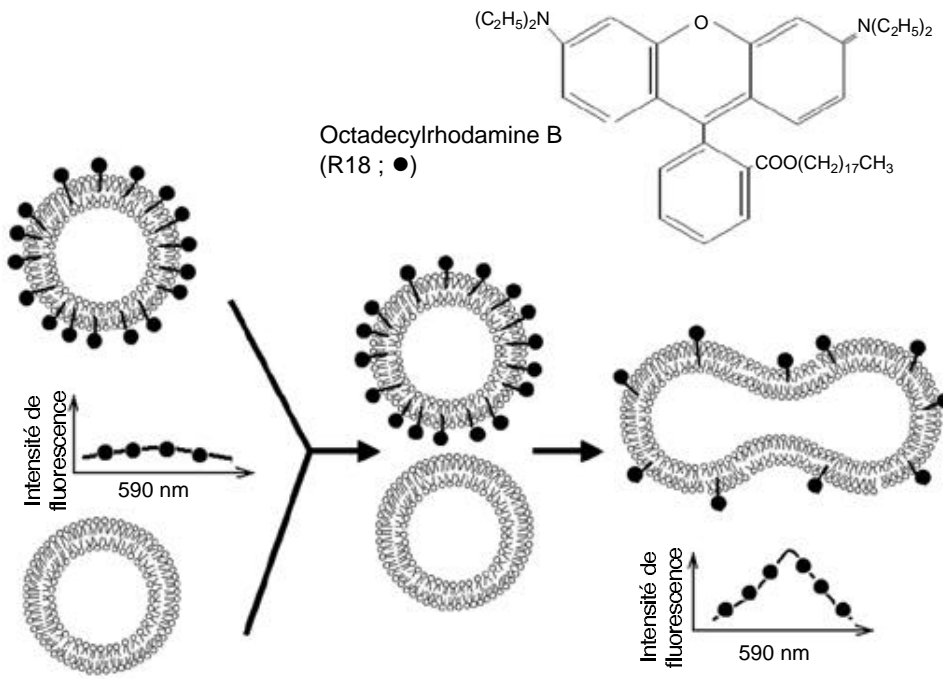


Figure 9. Analyse de la fusion par la méthode d'inhibition de fluorescence d'une sonde préalablement insérée dans une population de liposomes — *Fusion analysis by fluorescence quenching of a probe incorporated into a liposome population.*

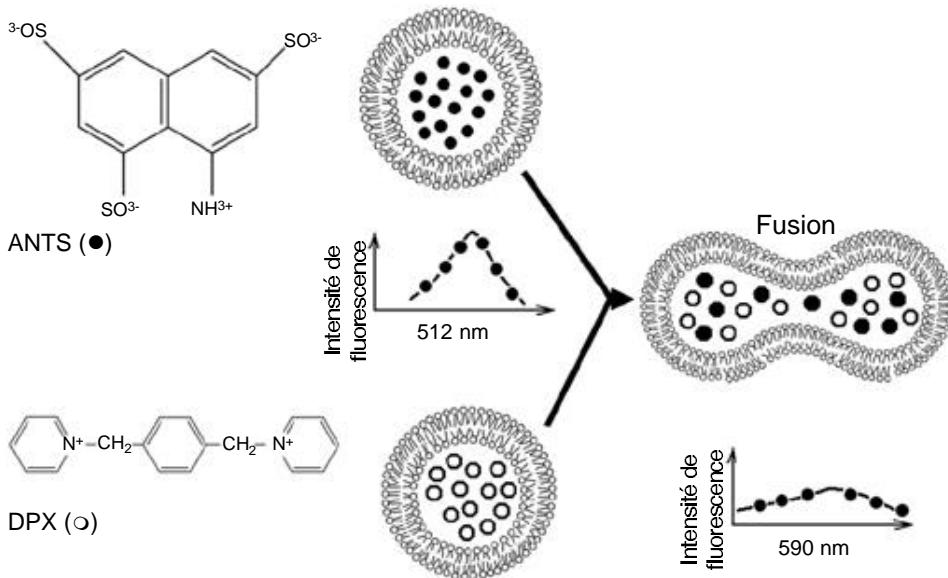


Figure 10. Analyse de la fusion par la méthode de transfert d'énergie par résonance entre deux sondes de fluorescence préalablement insérées dans le milieu aqueux de deux populations de liposomes — *Fusion analysis by the energy transfer method, by resonance between two probes of fluorescence incorporated into the aqueous medium of two distinct liposome populations.*

phospholipides (Brasseur, 2000), qui se réorganisent autour des peptides de fusion (Siegel, Epanand, 2000). Après rapprochement des deux bicouches, la fusion entre les zones déstabilisées peut s'opérer. Les deux membranes mélangent leurs composants et fusionnent (White, 1992). Les fusions sont toujours contrôlées par des protéines (Hooft van Huijsduijnen, 1998 ; Myles, Primakoff, 1997 ; Stegmann, 2000). Ces protéines déstabilisent la bicouche lipidique et jouent ainsi un rôle catalytique.

Ces études réalisées sur le liposome, moins complexe que la membrane cellulaire, ont permis de mieux comprendre les étapes de fusion, comme schématisé à la **figure 11** (Schechter, 2002).

Pour qu'une fusion puisse avoir lieu, il est nécessaire qu'un contact s'établisse entre les monocouches externes des deux liposomes. Dans la région de contact, l'équivalent de deux lamelles lipidiques séparées par une couche d'eau se formerait (**Figure 11A**). L'enroulement des deux monocouches externes conduirait à la formation d'une micelle inversée (**Figure 11B**) (Bentz, Ellens, 1987 ; Chernomordik, 1996 ; Lee, Lentz, 1997). Cette micelle est caractérisée par un contact étroit des têtes polaires englobant un volume aqueux. La rupture coordonnée des deux monocouches internes en contact avec la micelle conduirait à un pore reliant les liposomes initiaux : c'est le pore de fusion (**Figure 11C**) (Bentz, Ellens, 1987). La dilatation de ce pore conduirait à la fusion complète : les deux liposomes n'en font plus qu'un (**Figure 11D**). Les lipides sont de nouveau structurés en bicouches (Chernomordik, 1996).

Un autre mécanisme de fusion a été proposé. Dans celui-ci, le contact des monocouches externes conduirait à l'amorçage de deux micelles inversées,

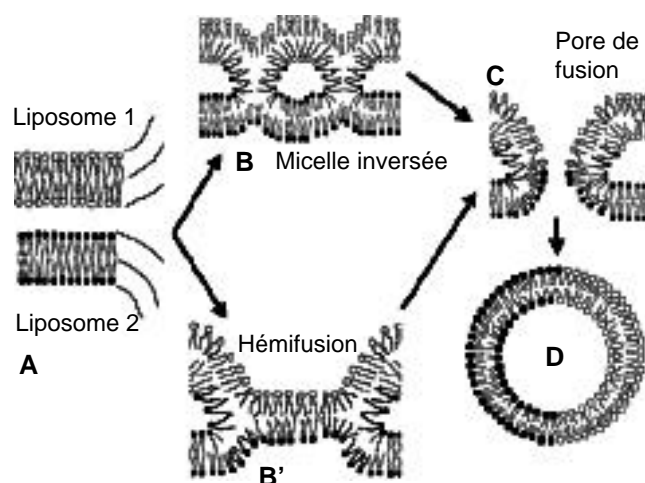


Figure 11. Structures adoptées par les lipides lors de la fusion — *Lipid structures during the fusion process.*

mais les micelles ne se formeraient pas entièrement (**Figure 11B'**) (Chernomordik, 1996 ; Hed, Safran, 2003). Ce premier contact forcerait plutôt un contact entre les monocouches internes. La rupture ultérieure des deux monocouches internes pourrait conduire au pore de fusion puis à la fusion des deux liposomes. Plusieurs études sur les liposomes soutiennent ce mécanisme (Bentz, Ellens, 1987 ; Chernomordik, 1996 ; Hed, Safran, 2003).

Les deux mécanismes postulent, entre le contact initial et la fusion, une étape de micelle inverse, appelée micelle de type III. Le passage par cet intermédiaire nécessite de franchir une barrière énergétique.

L'efficacité de la fusion dépend de la nature des lipides dans la zone de contact entre les deux liposomes. La composition de cette zone ne correspond pas nécessairement à la valeur moyenne attendue. En effet, les lipides sont animés d'une diffusion latérale importante, telle que la zone de contact est enrichie en lipides, tels que le cholestérol et les sphingolipides, qui ont tendance à adopter une organisation hexagonale favorable à la fusion (Wolf *et al.*, 2001 ; Shaikh *et al.*, 2003 ; Byström, Lindblom, 2003).

Bien que le mécanisme de la fusion soit de mieux en mieux compris, des questions persistent. Par quel mécanisme les bicouches se rapprochent-elles ? La déstabilisation d'une seule monocouche est-elle suffisante pour induire la fusion ? Comment le système permet-il une augmentation de l'énergie, même temporaire ? Comment le pore s'élargit-il ? Nul doute qu'un nouvel effort de recherche apportera des réponses à ces questions.

Liste des abréviations — Abbreviation list

- ANTS : acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique
- DOPE : dioléolphosphatidyl-éthanolamine
- DLPC : dilauréolphosphatidylcholine
- DMPC : diméthylphosphatidylcholine
- DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine
- DPX : bromure dip-xylène-bis-pyridinium
- DSPC : distéaroylphosphatidylcholine
- GUV : Liposome unilamellaire géant — *Giant Unilamellar Vesicle*
- LUV : Liposome unilamellaire de grande taille — *Large Unilamellar Vesicle*
- MLV : Liposome multilamellaire — *Multilamellar Vesicle*
- NBD : N[7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl]
- PE : phosphatidyléthanolamine
- Rh : N[lissamine rhodamine B sulfonyle]
- R18 : octadécylrhodamine B
- SUV : Liposome unilamellaire de petite taille — *Small Unilamellar Vesicle*.

Bibliographie

- Almeida JD., Edwards DC., Brand CM., Heath TD. (1975). Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet* **2**, p. 899–901.
- Bailey AL., Monck MA., Cullis PR. (1997). pH-induced destabilization of lipid bilayers by a lipopeptide derived from influenza hemagglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* **1324**, p. 232–244.
- Bangham AD., Standish MM., Watkins JC. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* **13**, p. 238–252.
- Barsukov LI., Kulikov VI., Bachmanova GI., Archakov AI., Bergelson LD. (1982). Cytochrome P-450 facilitates phosphatidylcholine flip-flop in proteoliposomes. *FEBS Lett.* **144**, p. 337–340.
- Bentz J., Ellens H. (1987). Membrane fusion: Kinetics and mechanisms. *Colloid. Surf.* **30**, p. 65–112.
- Berde CB., Andersen HC., Hudson BS. (1980). A theory of the effects of head-group structure and chain unsaturation on the chain melting transition of phospholipid dispersions. *Biochemistry* **19**, p. 4279–4293.
- Bouffieux O. (1995). *Utilisation des modèles moléculaires numériques dans la recherche industrielle pharmaceutique*. Travail de fin d'études. Bruxelles : Institut supérieur industriel de Bruxelles, 65 p.
- Brasseur R. (2000) Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis). *Mol. Membr. Biol.* **17**, p. 31–40.
- Briane D., Lesage D., Cao A., Coudert R., Lievre N., Salzmann JL., Taillandier E. (2002). Cellular pathway of plasmids vectorized by cholesterol-based cationic liposomes. *J. Histochem. Cytochem.* **50**, p. 983–991.
- Byström T., Lindblom G. (2003). Molecular packing in sphingomyelin bilayers and sphingomyelin/phospholipid mixtures. *Spectrochim. Acta A* **59**, p. 2191–2195.
- Callow RA., McGrath JJ. (1985). Thermodynamic modeling and cryomicroscopy of cell-size, unilamellar, and paucilamellar liposomes. *Cryobiology* **22**, p. 251–267.
- Carrión FJ., De La Maza A., Parra JL. (1994). The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *J. Colloid Interf. Sci.* **164**, p. 78–87.
- Cevc G. (1991). How membrane chain-melting phase-transition temperature is affected by the lipid chain asymmetry and degree of unsaturation: an effective chain-length model. *Biochemistry* **30**, p. 7186–7193.
- Chaudhury MK., Ohki S. (1981) Correlation between membrane expansion and temperature-induced membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **642**, p. 365–374.
- Chernomordik L. (1996). Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chem. Phys. Lipids* **81**, p. 203–213.
- Chernomordik LV., Kozlov MM. (2003). Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **72**, p. 175–207.
- Correa SG., Rivero VE., Yranzo-Volonté N., Romero-Piffiguer M., Ferro ME., Riera CM. (1993). Effect of gangliosides in the autoimmune response induced by liposome-associated antigens. *Autoimmunity* **15**, p. 195–200.
- Deamer DW., Bramhall J. (1986). Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. *Chem. Phys. Lipids* **40**, p. 167–188.
- Devaux P., McConnell HM. (1972). Lateral diffusion in spin-labeled phosphatidylcholine multilayers. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, p. 4475–4481.
- Dimitriadis GJ. (1979). Entrapment of plasmid DNA in liposomes. *Nucleic Acids Res.* **6**, p. 2697–2705.
- Ehrenberg B. (1986). Spectroscopic methods for the determination of membrane surface charge density. *Methods Enzymol.* **127**, p. 678–696.
- Ellens H., Bentz J., Szoka FC (1985). H⁺- and Ca²⁺-induced fusion and destabilization of liposomes. *Biochemistry* **24**, p. 3099–3106.
- Elorza B., Elorza MA., Sainz MC., Chantres JR. (1993). Analysis of the particle size distribution and internal volume of liposomal preparations. *J. Pharma. Sci.* **82**, p. 1160–1163.
- Epand RM. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, p. 116–121.
- Espuelas S., Haller P., Schuber F., Frisch B. (2003). Synthesis of an amphiphilic tetraantennary mannosyl conjugate and incorporation into liposome carriers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, p. 2557–2560.
- Fenske DB. (1993). Structural and motional properties of vesicles as revealed by nuclear magnetic resonance. *Chem. Phys. Lipids* **64**, p. 143–162.
- Gaede HC., Gawrisch K. (2003). Lateral diffusion rates of lipid, water, and a hydrophobic drug in a multilamellar liposome. *Biophys. J.* **85**, p. 1734–1740.
- Glushakova SE., Omelyanenko VG., Lukashevitch IS., Bogdanov AA.Jr., Moshnikova AB., Kozytch AT., Torchilin VP. (1992). The fusion of artificial lipid membranes induced by the synthetic arenavirus 'fusion peptide'. *Biochim. Biophys. Acta* **1110**, p. 202–208.
- Gordon LM., Mobley PW., Pilpa R., Sherman MA., Waring AJ. (2002). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using (13)C-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1559**, p. 96–120.
- Gregoriadis G. (1981). Targeting of drugs: implications in medicine. *Lancet* **2**, p. 241–246.
- Han X., Bushweller JH., Cafiso DS., Tamm LK. (2001). Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **8**, p. 715–720.

- Hauser HO. (1971). The effect of ultrasonic irradiation on the chemical structure of egg lecithin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, p. 1049–1055.
- Hed G., Safran SA. (2003). Initiation and dynamics of hemifusion in lipid bilayers. *Biophys. J.* **85**, p. 381–389.
- Hinkle GH., Born GS., Kessler W., Shaw SM. (1978). Preferential localization of radiolabeled liposomes in liver. *J. Pharma. Sci.* **67**, p. 795–798.
- Hoekstra D. (1982). Kinetics of intermixing of lipids and mixing of aqueous contents during vesicle fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **692**, p. 171–175.
- Hoekstra D., de Boer T., Klappe K., Wilschut J. (1984). Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes. *Biochemistry* **23**, p. 5675–5681.
- Hong K., Baldwin PA., Allen TM., Papahadjopoulos D. (1988). Fluorometric detection of the bilayer-to-hexagonal phase transition in liposomes. *Biochemistry* **27**, p. 3947–3955.
- Hooft van Huijsdijnen R. (1998). ADAM 20 and 21; two novel human testis-specific membrane metalloproteases with similarity to fertilin- α . *Gene* **206**, p. 273–282.
- Hope MJ., Redelmeier TE., Wong KF., Rodriguez W., Cullis PR. (1989). Phospholipid asymmetry in large unilamellar vesicles induced by transmembrane pH gradients. *Biochemistry* **28**, p. 4181–4187.
- Huang C., Charlton JP. (1972). Studies on the state of phosphatidylcholine molecules before and after ultrasonic and gel-filtration treatments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, p. 1660–1666.
- Inoue K. (1974). Permeability properties of liposomes prepared from dipalmitoyllecithin, dimyristoyllecithin, egg lecithin, rat liver lecithin and beef brain sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta* **339**, p. 390–402.
- Johnson SM., Bangham AD., Hill MW., Korn ED. (1971). Single bilayer liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **233**, p. 820–826.
- Kapczynski DR., Tumpsey TM. (2003). Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus. *Avian Dis.* **47**, p. 578–587.
- Keweloh H., Heipieper HJ. (1996). Trans unsaturated fatty acids in bacteria. *Lipids* **31**, p. 129–137.
- Kim HS., Park YS. (2002). Gene transfection by quantitatively reconstituted Sendai envelope proteins into liposomes. *Cancer Gene Ther.* **9**, p. 173–177.
- Kirby C., Green C. (1977). Transmembrane migration (“flip-flop”) of cholesterol in erythrocyte membranes. *Biochem. J.* **168**, p. 575–577.
- Klein RA. (1970). The detection of oxidation in liposome preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **210**, p. 486–489.
- Klibanov AL., Maruyama K., Torchilin VP., Huang L. (1990). Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* **268**, p. 235–237.
- Kornberg RD., McConnell HM. (1971a). Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, p. 2564–2568.
- Kornberg RD., McConnell HM. (1971b). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* **10**, p. 1111–1120.
- Kunisawa J., Mayumi T. (2001). Application of novel drug delivery system, fusogenic liposome, for cancer therapy. *Gan To Kagaku Ryoho* **28**, p. 577–583.
- Lasic DD. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends Biotech.* **16**, p. 307–321.
- Lebed’ OI., Stefanov AV., Primak RG. (1989). Effect of the conditions of ultrasonic treatment on the characteristics of forming liposomes. *Ukr. Biochem. J.* **61**, p. 96–101.
- Lee J., Lentz BR. (1997) Evolution of lipidic structures during model membrane fusion and the relation of this process to cell membrane fusion. *Biochemistry* **36**, p. 6251–6259.
- Leventis R., Diacovo T., Silvius JR. (1987). pH-dependent stability and fusion of liposomes combining protonatable double-chain amphiphiles with phosphatidylethanolamine. *Biochemistry* **26**, p. 3267–3276.
- Li S., Gao X., Son K., Sorgi F., Hofland H., Huang L. (1996). DC-Chol lipid system in gene transfer. *J. Control. Rel.* **39**, p. 373–381.
- Luna EJ., McConnell HM. (1977). The intermediate monoclinic phase of phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* **466**, p. 381–392.
- Martin I., Ruyschaert JM. (2000). Common properties of fusion peptides from diverse systems. *Biosci. Rep.* **20**, p. 483–500.
- Middelkoop E., Lubin BH., Op den Kamp JA., Roelofsen B. (1986). Flip-flop rates of individual molecular species of phosphatidylcholine in the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **855**, p. 421–424.
- Moghimi SM., Szebeni J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* **42**, p. 463–478.
- Myles DG., Primakoff P. (1997). Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol. Reprod.* **56**, p. 320–327.
- Nacka F., Cansell M., Entressangles B. (2001). *In vitro* behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts, and phospholipase A2. *Lipids* **36**, p. 35–42.
- Naoi M., Naoi M., Shimizu T., Malviya AN., Yagi K. (1977). Permeability of amino acids into liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **471**, p. 305–310.
- Noguchi A., Furuno T., Kawaura C., Nakanishi M. (1998). Membrane fusion plays an important role in gene transfection mediated by cationic liposomes. *FEBS Lett.* **433**, p. 169–173.
- Owen CS. (1980). A membrane-bound fluorescent probe to detect phospholipid vesicle-cell fusion. *J. Memb. Biol.*

- 54, p. 13–20.
- Pagano RE., Weinstein JN. (1978). Interactions of liposomes with mammalian cells. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**, p. 435–468.
- Papahadjopoulos D., Watkins JC. (1967). Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochim. Biophys. Acta* **135**, p. 639–652.
- Pereira FB., Goñi FM., Nieva JL. (1995). Liposome destabilization induced by the HIV-1 fusion peptide effect of a single amino acid substitution. *FEBS Lett.* **362**, p. 243–246.
- Perrie Y., Gregoriadis G. (2000). Liposome-entrapped plasmid DNA: characterisation studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1475**, p. 125–132.
- Pillot T., Goethals M., Vanloo B., Talussot C., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Lins L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **271**, p. 28757–28765.
- Poznansky MJ., Weglicki WB. (1974). Lysophospholipid induced volume changes in lysosomes and in lysosomal lipid dispersions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **58**, p. 1016–1021.
- Redziniak G. (2003). Liposomes et peau : passé, présent, futur : Liposomes and skin: past, present, future. *Pathol. Biol.* **51**, p. 279–281.
- Rigaud JL. (2002). Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**, p. 753–766.
- Rothman JE., Dawidowicz EA. (1975). Asymmetric exchange of vesicle phospholipids catalyzed by the phosphatidylcholine exchange protein. Measurement of inside-outside transitions. *Biochemistry* **14**, p. 2809–2816.
- Schanck A., Mingeot-Leclercq MP., Tulkens PM., Carrier D., Smith IC., Jarrell HC. (1992). Interactions of aminoglycoside antibiotics with phospholipids. A deuterium nuclear magnetic resonance study. *Chem. Phys. Lipids* **62**, p. 153–163.
- Schechter (2002). *Biochimie et biophysique des membranes. Aspects structuraux et fonctionnels*. 2e éd. Paris : Masson, 466 p.
- Schieren H., Rudolph S., Finkelstein M., Coleman P., Weissmann G. (1978). Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **542**, p. 137–153.
- Schwendener RA., Lagocki PA., Rahman YE. (1984). The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **772**, p. 93–101.
- Seydel U., Brandenburg K., Lindner B., Moll H. (1981). The influence of phospholipidosis inducing drugs on the phase transition of lipids. *Thermochim. Acta* **49**, p. 35–48.
- Shaikh SR., Cherezov V., Caffrey M., Stillwell W., Wassall S. (2003). Interaction of cholesterol with a docosahexaenoic acid-containing phosphatidylethanolamine: trigger for microdomain/raft formation? *Biochemistry* **42**, p. 12028–12037.
- Siegel DP., Epan RM. (2000). Effect of influenza hemagglutinin fusion peptide on lamellar/inverted phase transitions in dipalmitoleoylphosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**, p. 87–98.
- Stegmann T. (2000). Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* **1**, p. 598–604.
- Struck DK., Hoekstra D., Pagano RE. (1981). Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**, p. 4093–4099.
- Szoka F., Papahadjopoulos D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**, p. 467–508.
- Tahara Y., Fujiyoshi Y. (1994). A new method to measure bilayer thickness: cryo-electron microscopy of frozen hydrated liposomes and image simulation. *Micron* **25**, p. 141–149.
- Tatlian SA., Hinterdorfer P., Baber G., Tamm LK. (1995). Influenza hemagglutinin assumes a tilted conformation during membrane fusion as determined by attenuated total reflection FTIR spectroscopy. *EMBO J.* **14**, p. 5514–5523.
- Tonkonog LA., Bondarenko VA., Belous AM., Bondarenko TP. (1982). Permeability of liposomes with different cholesterol content as affected by low temperature. *Ukrainian Biochem. J.* **54**, p. 293–297.
- Torchilin VP., Berdichevsky VR., Barsukov AA., Smirnov VN. (1980). Coating liposomes with protein decreases their capture by macrophages. *FEBS Lett.* **111**, p. 184–188.
- van Rooijen N., van Nieuwmegen R. (1984). Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res.* **238**, p. 355–358.
- White JM. (1992). Membrane fusion. *Science* **258**, p. 917–924.
- Wijburg OL., van den Dobbelen GP., Vadolas J., Sanders A., Strugnell RA., van Rooijen N. (1998). The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens. *Eur. J. Immunol.* **28**, p. 479–487.
- Wilschut J., Hoekstra D. (1986). Membrane fusion: lipid vesicles as a model system. *Chem. Phys. Lipids* **40**, p. 145–166.
- Winterhalter M., Lasic DD. (1993). Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chem. Phys. Lipids* **64**, p. 35–43.

- Wolf C., Koumanov K., Tenchov B., Quinn PJ. (2001). Cholesterol favors phase separation of sphingomyelin. *Bioph. Chem.* **89**, p. 163–172.
- Yu HY., Lin JH. (2000). Intracellular delivery of membrane-impermeable hydrophilic molecules to a hepatoblastoma cell line by asialoglycoprotein-labeled liposomes. *J. Form. Med. Assoc.* **99**, p. 936–941.
- Zhou X., Huang L. (1994). DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim. Biophys. Acta* **1189**, p. 195–203.
- Zimmerberg J., Chernomordik LV. (1999). Membrane fusion. *Adv. Drug Deliver. Rev* **38**, p. 197–205.
- <http://www.theralipids.com/fr/strategy_fr.htm> date de consultation : 08/10/2003
- <<http://www.medespace.com/cancero/doc/therageni.html>> date de consultation : 12/10/2003
- <<http://www.promega.com/fr/promegazette/Prom26/prom7.pdf>> date de consultation : 22/10/2003
- <<http://www.exopol.com/fr/base3.fr.html>> date de consultation : 08/10/2003

(101 réf.)

Annexe II

Lorin, A., Charlotiaux, B., Lins, L. & Brasseur, R. Implication des peptides de fusion des glycoprotéines de fusion virales de classe I dans la fusion membranaire. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **accepté pour publication**

L'infection virale, impliquant la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule cible, est induite par une glycoprotéine ancrée dans l'enveloppe virale. Après activation, la glycoprotéine subit un changement de conformation lui permettant d'exposer une région appelée « peptide de fusion » indispensable à l'induction de la fusion. L'étude des glycoprotéines ainsi que des peptides de fusion en l'absence du reste de la glycoprotéine a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la fusion membranaire. Il a ainsi été montré que les peptides de fusion induisent la fusion et la perméabilisation de membranes. Ces peptides sont capables de s'insérer de manière oblique dans la membrane sous forme hélicoïdale. Cette orientation induirait la déstabilisation lipidique, favorisant la fusion membranaire. Toutefois, jusqu'à présent, aucune étude *in vivo*, *in vitro* ou *in silico* ne s'était intéressée à déterminer la séquence minimale impliquée dans la fusion membranaire. En utilisant la relation obliquité-fusogénicité, cette séquence a été déterminée par modélisation moléculaire pour deux virus, le Virus de l'Immunodéficience Humaine et le Virus de la Leucémie Bovine. Ces nouveaux résultats sont particulièrement intéressants pour le développement de vaccins et de molécules antivirales.

Implication des peptides de fusion des glycoprotéines de fusion virales de classe I dans la fusion membranaire

Article de synthèse bibliographique en vue de la présentation d'un essai

Titre abrégé : les peptides de fusion viraux

Aurélien Lorin ⁽¹⁾, Benoit Charlotheaux ⁽¹⁾, Laurence Lins ⁽¹⁾, Robert Brasseur ^{(1)*}

⁽¹⁾ Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

* Tél : +32-(0)81.62.25.21 ; Fax : +32-(0)81.62.25.22 ; E-mail: brasseur.r@fsagx.ac.be

Remerciements. Nous remercions le Fonds National de la recherche scientifique (FNRS) pour le soutien financier ainsi que toutes les personnes qui ont collaboré à l'étude des interactions peptides-membranes : Benoît Adam, Jean-Marc Crowet, Marc Decaffmeyer, Sébastien Deshayes, Christelle Flore, Gaëtan Gillet, Nicolas Delsaux, Didier Bastogne, Stéphanie Ravault, Sébastien Santini, Marie-Hélène Van Heyck et Annick Thomas. A.L. est supporté financièrement par une bourse Télévie (projet Télévie 7.4.511.03.F). B.C. est supporté financièrement par le programme d'attraction des pôles interuniversitaires (contrat PAI phase 6). R.B. et L.L. sont respectivement Directeur de Recherche et Chercheur Qualifié au FNRS.

Résumé

L'infection virale, impliquant la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la cellule cible, est induite par une glycoprotéine ancrée dans l'enveloppe virale. Après activation, la glycoprotéine subit un changement de conformation lui permettant d'exposer une région appelée « peptide de fusion » indispensable à l'induction de la fusion. L'étude des glycoprotéines ainsi que des peptides de fusion en l'absence du reste de la glycoprotéine a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la fusion membranaire. Il a ainsi été montré que les peptides de fusion induisent la fusion et la perméabilisation de membranes. Ces peptides sont capables de s'insérer de manière oblique dans la membrane sous forme hélicoïdale. Cette orientation induirait la déstabilisation lipidique, favorisant la fusion membranaire. Toutefois, jusqu'à présent, aucune étude *in vivo*, *in vitro* ou *in silico* ne s'était intéressée à déterminer la séquence minimale impliquée dans la fusion membranaire. En utilisant la relation obliquité-fusogénicité, cette séquence a été déterminée par modélisation moléculaire pour deux virus, le Virus de l'Immunodéficience Humaine et le Virus de la Leucémie Bovine. Ces nouveaux résultats sont particulièrement intéressants pour le développement de vaccins et de molécules antivirales.

Mots-clés. VIH, BLV, Influenza A, infection virale, modélisation moléculaire, peptide oblique, bicouche lipidique, membrane, structure secondaire.

Abstract. The implication of fusion peptides of class I viral fusion glycoproteins in the membrane fusion

Viral infection involves fusion between the viral envelope and the target cell plasmic membrane. The fusion is induced by a glycoprotein anchored in the viral envelope. After activation, the glycoprotein undergoes a conformational change inducing the exposure of a region named "fusion peptide" essential for the fusion process. Studies on glycoproteins and on isolated fusion peptides have allowed to better understand the mechanisms involved in membrane fusion. It was notably shown that fusion peptides induce fusion and leakage of membranes. These peptides are able to insert obliquely in a membrane when helical. This orientation induces lipid destabilisation, favouring membrane fusion. However, to date, none of these *in vitro*, *in vivo* or *in silico* studies has determined the minimal sequence required for membrane fusion. Using the obliquity – fusogenicity relationship, the latter was determined by molecular modelling for two viruses, the Human Immunodeficiency Virus and the Bovine Leukaemia Virus. These new results are of particular interest in the development of vaccines and antiviral drugs.

Keywords: HIV, BLV, Influenza A, viral infection, molecular modelling, tilted peptide, membrane, lipid bilayer, secondary structure

Liste des abréviations.

VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (HIV-1 : Human Immunodeficiency Virus type 1)

VIH-2 : Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 2 (HIV-2 : Human Immunodeficiency Virus type 2)

Influenza A : virus de l'Influenza (grippe) de type A

Influenza B : virus de l'Influenza (grippe) de type B

BLV : Virus de la Leucémie Bovine (Bovine Leukemia Virus)

HA2 : Sous-unité membranaire de l'hémagglutinine

SIV : Virus de l'Immunodéficience Simienne (Simian Immunodeficiency Virus)

FLV : Virus de la Leucémie Féline (Feline Leukemia Virus)

ESR : Résonance de Spin Electronique (Electron Spin Resonance)

FTIR : Spectroscopie Infrarouge par Transformée de Fourier (Fourier Transform InfraRed)

ATR-FTIR : Spectroscopie Infrarouge par Transformée de Fourier – Réflexion Totale Atténuée (Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform InfraRed)

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

EPR : Résonance Paramagnétique Electronique (Electron Paramagnetic Resonance)

HCA : Analyse d'Amas Hydrophobes (Hydrophobic Cluster Analysis)

MHP : Potentiel Hydrophobicité Moléculaire (Molecular Hydrophobicity Potential)

Å : Angström

PrP : protéine prion

A β : peptide β -amyloïde

Apo : Apolipoprotéine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

CD : Dichroïsme Circulaire (Circular Dichroism)

IMPALA : Integral Membrane Protein and Lipid Association

SDS : Sodium DodécylSulfate

SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

HRSV : Human Respiratory Syncytial Virus

SV5 : Virus para-influenza Simien 5

PDB : Banque de Données de Protéines (Protein Data Bank)

La fusion virale

La fusion membranaire intervient dans de nombreux processus biologiques, comme le transport intracellulaire (Rothman, 1994), le développement musculaire (Towler et al., 2004), la neurotransmission (Gianinazzi et al., 2005 ; Jena, 2005), la fécondation (Longo and Yanagimachi, 1993) et l'infection virale (Hughson, 1995 ; Chizmadzhev, 2004).

Etapas de la fusion membranaire

Qu'elle soit intracellulaire ou extracellulaire, la fusion est un processus qui implique le rapprochement de deux membranes, leur fusion et la formation d'un pore de fusion aqueux (Jahn et al., 2002) (**Figure 1**).

Malgré le développement de techniques permettant de contrôler la fusion, les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de fusion ne sont toujours pas connus avec exactitude. Deux modèles contradictoires de la fusion membranaire ont été proposés : l'hypothèse du pore protéique (« proteinaceous » en anglais) et l'hypothèse du pore lipidique. Selon la première hypothèse, le pore de fusion initial consiste en un canal aqueux constitué de protéines connectées aux deux membranes (Almers, Tse, 1990 ; Lindau, Almers, 1995). Suite à son expansion, ce pore incorpore des lipides des membranes pour atteindre sa taille optimale (Jahn, Grubmüller, 2002). Cette hypothèse n'est cependant pas en accord avec les nombreuses études suggérant que la fusion membranaire implique une étape intermédiaire exclusivement lipidique (Chernomordik et al., 1993, 1995 ; Kemble et al., 1994 ; Chernomordik, Zimmerberg, 1995 ; Lee, Lentz, 1998 ; Melikyan et al., 2000 ; Gaudin et al., 2000 ; Russell et al., 2001 ; Xu et al., 2005 ; Reese et al., 2005 ; Giraudo et al. 2005 ; Dennison et al., 2006). Cette étape est prise en compte dans la deuxième hypothèse. La **figure 1** détaille les différentes étapes du modèle du pore lipidique. Tout d'abord, pour que la fusion se réalise, il faut un rapprochement et une mise en contact des deux membranes à fusionner. Un apport énergétique est nécessaire pour contrecarrer la barrière énergétique constituée par la barrière d'eau existant entre les membranes. Dans le cas de la fusion induite par des virus enveloppés, cet apport est fourni par les glycoprotéines de fusion virales ancrées dans l'enveloppe virale. Le mode d'action de ces glycoprotéines sera expliqué plus en détail dans la suite de l'article. Lorsque les deux membranes sont en contact, la fusion des monocouches externes se réalise. Un intermédiaire lipidique, appelé « stalk » est alors formé. Le « raft » est constitué des monocouches externes des deux membranes qui ont fusionné et des monocouches internes des deux membranes non fusionnées (**Figure 1**). Les monocouches externes fusionnées adoptent une courbure négative (Siegel, 1993 ; Chernomordik et al., 1995). Cet état « stalk » n'est que transitoire et évolue, par expansion radiale, en « diaphragme d'hémifusion » où les deux monocouches internes se mettent en contact (**Figure 1**) (Melikyan et al., 1995 ; Chernomordik et al., 1998 ; Gaudin, 2000). Que ce soit au niveau du stalk ou du diaphragme d'hémifusion, aucun transfert aqueux n'est possible puisque les monocouches internes n'ont pas fusionné. Tout comme le stalk, le diaphragme d'hémifusion n'est que transitoire et évolue en pore de fusion exclusivement lipidique suite à la fusion des monocouches internes (Jahn, Grubmüller, 2002). En plus d'être supporté par de nombreux résultats expérimentaux, le modèle du pore lipidique est également supporté par de nombreuses études théoriques et de modélisation moléculaire (Kuzmin et al., 2001 ; Noguchi, Tasaku, 2002 ; Kozlovsky et al., 2002, 2004 ; Koslovsky, Kozlov, 2002 ; Katsov et al., 2004 ; Marrink, Mark, 2004 ; Smeijers et al., 2006). Récemment, la structure stalk, a été observée après déshydratation de bicouches lipidiques, ce qui renforce également la deuxième hypothèse (Yang, Huang, 2002). Toutefois, à l'heure actuelle, ni la structure « stalk », ni un canal de protéines n'ont été observés lors de la fusion *in vivo* (Lentz, 2006).

Les glycoprotéines de fusion virales : des protéines indispensables à la fusion virale

La fusion membranaire ne se réalise pas spontanément et nécessite la présence de catalyseurs (Basanez, 2002). Dans le cas de l'infection virale, ces catalyseurs sont des glycoprotéines localisées à la surface de l'enveloppe des virus. Lorsque ces protéines sont inhibées par des anticorps (Cleveland et al., 2000 ; Zhang, Chen, 2003 ; Heap et al., 2005) ou mutées (Gething et al., 1986 ; Kowalski et al., 1987 ; Bosch et al., 1989 ; Freed et al., 1990 ; Vonèche et al., 1992 ; Buchschacher et al., 1995 ; Schaal et al., 1995 ; Fredericksen, Whitt, 1995 ; Steinhauer et al., 1995 ; Delahunty et al., 1996 ; Durell et al., 1997 ; Pritsker et al., 1999 ; Rothenberg et al., 2001 ; Russell et al., 2004 ; Zhu et al., 1998), la fusion virale est diminuée ou n'est plus observée.

L'analyse par rayons X de cristaux constitués de parties solubles de glycoprotéines virales montre deux classes structurales différentes (**Figure 2**). Les glycoprotéines de classe II sont constituées de 3 domaines principalement repliés en feuillets bêta, « couchés » sur l'enveloppe virale (**Figure 2A**) (Kielian, 2006). Cette classe contient les protéines de fusion de deux membres des familles Togaviridae et Flaviviridae : les alphavirus et les flavivirus (Rey et al., 1995 ; Gibbons et al., 2004 ; Kielian, 2006). Des études récentes suggèrent que d'autres membres des Togaviridae et Flaviviridae ainsi que certains membres des Bunyaviridae expriment également des protéines de fusion de classe II (Yagnik et al., 2000 ; Garry, Dash, 2003 ; Gary, Garry, 2004 ; Plassmeyer et al., 2005). Malgré des similitudes avec les protéines de classe II concernant leurs mécanismes d'action (Söllner, 2004 ; Schibli, Weissenhorn, 2004 ; Zaitseva et al., 2005), les protéines virales de classe I adoptent une structure complètement différente. Elles sont majoritairement hélicoïdales et forment une projection d'une hauteur de 135 Å (contre 30 Å pour les glycoprotéines de classe II ; **Figure 2B**) (Skehel, Wiley, 2000 ; Harrison, 2005). Ces glycoprotéines sont exprimées par les familles virales Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Filoviridae, Coronaviridae et Retroviridae, dont font partie les virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) et de la Leucémie Bovine (BLV) (Caffrey et al., 1998 ; Weissenhorn et al., 1998 ; Malashkevich et al., 1999 ; Kobe et al., 1999 ; Bosch et al., 2003 ; Schibli and Weissenhorn, 2004). L'analyse cristallographique indique également que ces protéines sont assemblées sous forme d'homotrimères formant un triple faisceau d'hélices (« coiled-coil » en anglais) (**Figure 2B**). Récemment, il a été suggéré que d'autres classes de glycoprotéines virales existent (Da Poian et al., 2005 ; Roche et al., 2007).

Mécanismes d'action des glycoprotéines virales de classe I

Alors que peu de choses sont connues concernant le mode d'action des glycoprotéines de classe II, la compréhension du mode d'action des glycoprotéines de classe I lors de la fusion a progressé suite à l'analyse des glycoprotéines du virus Influenza A, du virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et du virus para-influenza simien 5 (SV5) (Wilson et al., 1981 ; Carr, Kim, 1993 ; Bullough et al., 1994 ; Baker et al., 1999 ; Supekar et al., 2004 ; Yin et al., 2006 ; Hakansson-McReynolds et al., 2006). Pour ces trois glycoprotéines, deux structures différentes ont été mesurées par analyse R-X ou RMN (**Figure 2B**). Ces deux structures correspondent à la conformation pré-fusion (avant fusion) et post-fusion (après fusion) des glycoprotéines (Wilson et al., 1981 ; Carr, Kim, 1993 ; Bullough et al., 1994 ; Baker et al., 1999 ; Supekar et al., 2004 ; Yin et al., 2006 ; Hakansson-McReynolds et al., 2006). Sous conformation pré-fusion, les hélices C-terminales des trois monomères (en gris dans la **Figure 2B**) interagissent ensemble pour former un trimère d'hélices. Ce trimère d'hélices C-terminales peut être entouré par les hélices N-terminales (en noir dans la **Figure 2B**), comme dans le cas de la sous-unité membranaire de l'hémagglutinine (HA2) du virus

Influenza A. Par contre, sous conformation post-fusion, ce sont les hélices N-terminales qui interagissent ensemble et sont entourées par les hélices C-terminales (**Figure 2B**). Cette différence structurale frappante entre les deux états révèle que les glycoprotéines de classe I subissent un changement de conformation lors de la fusion virale (Carr, Kim, 1993 ; Schibli, Weissenhorn, 2004). Pour HA2, il a été déterminé que la structure post-fusion est plus stable d'un point de vue thermodynamique que la structure pré-fusion (Carr et al., 1997). L'énergie libre libérée lors du changement de conformation induirait la fusion membranaire.

Les glycoprotéines de fusion de nombreux autres virus, dont le VIH-1, ont également été analysées par R-X ou RMN (Weissenhorn et al., 1997, 1998 ; Fass et al., 1996 ; Caffrey et al., 1998 ; Kobe et al., 1999 ; Zhao et al., 2000 ; Malashkevich et al., 2001 ; Xu et al., 2004a, 2004b ; Yin et al., 2005 ; Lou et al., 2006 ; Zheng et al., 2006). Pour ces glycoprotéines, seule la structure correspondant à la conformation post-fusion a pu être mise en évidence (à droite dans la **Figure 2B**). Comme pour les glycoprotéines des virus Influenza A, du SRAS et SV5, les hélices N-terminales interagissent ensemble et sont entourées par les hélices C-terminales. Cette grande similarité entre les structures post-fusion suggère que toutes les glycoprotéines de classe I adoptent une conformation pré-fusion similaire à celle des glycoprotéines des virus Influenza A, du SRAS et SV5 et subissent un changement de conformation lors de la fusion virale.

Des résultats obtenus sur les glycoprotéines du virus du SRAS, HIV-1 et SV5 ont fourni de nouvelles informations sur le changement de conformation s'opérant entre les conformations pré- et post-fusion : les glycoprotéines adoptent une structure intermédiaire étirée (**Figures 1B et 2C**). En effet, l'ajout de peptides correspondant aux hélices C de ces protéines (appelés peptides C) bloque la fusion (Wild et al., 1992, 1994 ; Lu et al., 1995 ; Chen et al., 1995 ; Kilby et al., 1998, 2002 ; Furuta et al., 1998 ; Bosch et al., 2003, 2004 ; Eckert, Kim, 2001 ; Russell et al., 2001). Ces peptides agiraient sur la fusion en se liant aux hélices N du coiled-coil de gp41 (Wild et al., 1994 ; Chen et al., 1995). Pour gp41, il a été montré que l'effet de ces peptides n'est perceptible que lorsque la glycoprotéine est exposée à une membrane cible, indiquant que ces peptides ne sont pas capables d'interagir avec les hélices N lorsque la glycoprotéine adopte une conformation pré-fusion mais en sont capables lorsque la glycoprotéine adopte une conformation différente (Furuta et al., 1998). Des peptides correspondant aux hélices N (peptides N) des glycoprotéines de VIH-1 et du virus du SRAS bloquent également la fusion induite par ces glycoprotéines (Jiang et al., 1993 ; Russell et al., 2001). Il a été suggéré que ces peptides se lient aux hélices C de gp41 (Lu et al., 1995). Toutes ces études d'inhibition suggèrent que lors du changement de conformation intervenant entre les structures pré et post-fusion, la gp41 adopte une conformation intermédiaire étirée qui expose ses hélices N et C, cibles des peptides C et N respectivement (**Figures 1B et 2C**).

La détermination des structures pré- et post-fusion ainsi que les études d'inhibition ont permis l'élaboration de plusieurs modèles expliquant l'action sur les membranes des glycoprotéines de classe I lors de la fusion virale (Stegmann et al., 1989 ; Lindau, Almers, 1995 ; Hughson, 1997 ; Kozlov, Chernomordik, 1998 ; Stegmann, 2000 ; Bentz, 2000 ; Jahn, Grubmüller, 2002 ; Jahn et al., 2003). Le modèle le plus proposé dans la littérature et le mieux accepté est le modèle « jackknife » (**Figure 1**) (Hughson, 1997 ; Weissenhorn et al., 1997 ; Skehel, Wiley, 2000 ; Chernomordik et al., 1999 ; Eckert, Kim, 2001 ; Russell et al., 2001 ; Jahn et al., 2003, Colman, Lawrence, 2003 ; Jardetzky, Lamb, 2004 ; Korazim et al., 2006). Selon ce modèle, les glycoprotéines sont sécrétées sous une forme latente métastable, correspondant à la conformation pré-fusion (**Figures 1A et 2C**). Lorsque le virus s'approche d'une cellule cible, ses glycoprotéines de fusion sont activées et adoptent alors une structure intermédiaire étirée (**Figures 1B et 2C**). La partie N-terminale est alors repositionnée vers la membrane cible, permettant son interaction avec elle (Carr, Kim, 1993 ; Bullough et al., 1994). Des mesures de photolabeling ont d'ailleurs montré que l'extrémité N-terminale de

HA2 s'insère dans la membrane, comme indiqué dans la **Figure 1B** (Harter et al., 1989 ; Stegmann et al., 1991 ; Tsurudome et al., 1992 ; Durrer et al., 1996). La structure étirée de la glycoprotéine lui permet ainsi d'être connectée aux deux membranes à fusionner : le domaine transmembranaire est ancré dans l'enveloppe virale alors que la partie N-terminale est insérée dans la membrane de la cellule cible (Baker et al., 1999 ; Doms, Moore, 2000 ; Skehel, Wiley, 2000 ; Eckert, Kim, 2001 ; Russel et al., 2001 ; Gruenke et al., 2002). Par la suite, les glycoprotéines subissent de nouveau un changement de conformation leur permettant d'adopter la conformation post-fusion. Les glycoprotéines passent donc d'un état étiré à un état replié. Les glycoprotéines virales étant ancrées à la membrane plasmique et l'enveloppe virale, leur passage d'une conformation étirée à une conformation repliée induit le rapprochement des deux membranes et leur contact (**Figure 1C**) (Eckert, Kim, 2001). Par la suite, les monocouches externes fusionnent, induisant la formation du stalk (**Figure 1D**) puis du diaphragme d'hémifusion (**Figure 1E**). La fusion des monocouches internes permet enfin de finir le processus de fusion, en créant un pore de fusion permettant l'entrée de la capsid virale à l'intérieur de la cellule cible.

Le premier changement de conformation permet de « connecter » la membrane plasmique à la l'enveloppe virale. Le second changement de conformation permet le rapprochement de ces deux membranes et leur fusion (Russel et al., 2001 ; Gruenke et al., 2002). Toutefois, il a été montré que ces changements de conformation ne sont pas à eux seuls responsables de la fusion. En effet, gp41 n'est pas capable d'induire la fusion cellulaire ni la déstabilisation membranaire lorsque son extrémité N-terminale est mutée, alors qu'elle subit toujours des changements de conformation (Dimitrov et al., 2003). Cette étude indique un rôle important de l'extrémité N-terminale dans le processus de fusion, confirmé par l'observation d'une diminution ou d'une perte de fusion de HA2 (Gething et al., 1986 ; Steinhauer et al., 1995 ; Durell et al., 1997), gp41 (Freed et al., 1990 ; Schaal et al., 1995 ; Buchschacher et al., 1995 ; Delahunty et al., 1996 ; Pritsker et al., 1999), gp30 (Vonèche et al., 1992) et d'autres protéines virales (Bosch et al., 1989 ; Russel et al., 2004 ; Rothenberg et al., 2001 ; Zhu et al., 1998) lorsque leur extrémité N-terminale est modifiée.

Il a été suggéré que l'extrémité N-terminale intervient directement dans la fusion virale. De par ses propriétés hydrophobes, l'exposition de l'extrémité N-terminale dans l'espace aqueux intermembranaire pourrait induire une déshydratation de cet espace et favoriser la fusion (Bentz et al., 1990). De nombreuses publications suggèrent plutôt une déstabilisation de la membrane suite à son insertion dans la membrane plasmique (**Figure 1B**), favorisant la fusion virale (Weissenhorn et al., 1997 ; Dimitrov et al., 2003 ; Nieva, Agirre, 2003). Il a d'ailleurs été proposé que la capacité des glycoprotéines virales à induire la fusion dépend exclusivement de la capacité intrinsèque de leur extrémité N-terminale à désorganiser la membrane après insertion (Nieva, Agirre, 2003). Toutefois, il a été montré que des glycoprotéines mutées pouvaient s'insérer dans les membranes cibles sans toutefois induire leur déstabilisation (Gething et al., 1986 ; Qiao et al., 1999 ; Shome and Kielian, 2001), suggérant que le mode d'insertion de l'extrémité N-terminale dans les membranes est également important.

Les peptides correspondant à l'extrémité des glycoprotéines de fusion virales : des peptides de fusion

Afin de mieux comprendre l'implication de l'extrémité N-terminale des glycoprotéines virales dans la fusion, des études sur l'interaction membranaire de peptides correspondant à ces extrémités ont été menées. Ces dernières montrent que ces peptides induisent la fusion de bicouches lipidiques (Gallaher, 1987 ; Wharton et al., 1988 ; Rafalski et al., 1990, 1991 ; Yeagle et al., 1991 ; Martin et al., 1994, 1996), confortant l'hypothèse que

l'extrémité N-terminale des glycoprotéines joue un rôle direct dans la fusion virale. De par leur capacité à induire la fusion, ces peptides et les segments des glycoprotéines correspondant ont été appelés « peptides de fusion ». Afin de simplifier la compréhension, le terme « peptide de fusion » se référera dans la suite de cet article au peptide alors que la région protéique correspondante sera appelée « région peptide de fusion », comme précédemment proposé (Eband, 2003).

L'analyse de mutations a montré une relation entre la capacité des peptides de fusion à déstabiliser les membranes et la capacité des protéines apparentées à favoriser la fusion (HA de Influenza A : Gething et al., 1986 ; Wharton et al., 1988 ; Rafalski et al., 1991, gp32 de SIV : Horth et al., 1991 ; Martin et al., 1994, gp41 de VIH-1 : Martin et al., 1996 ; Schaal et al., 1995 ; Sendai : Rapaport, Shai, 1994). Par exemple, la mutation V2E abolit le pouvoir fusogène du peptide de fusion de la gp41 et de la gp41 entière (Freed et al., 1990 ; Kliger et al., 1997). De plus, des conditions favorables à la fusogénicité du peptide de fusion de HA2 augmentent également la fusogénicité de HA2 (Skehel et al., 2001). La bonne corrélation entre les expériences réalisées sur les peptides de fusion et celles réalisées sur les glycoprotéines entières indique que les peptides de fusion sont de bons modèles pour étudier la fusion virale, comme indiqué par Nieva et Agirre (2003).

Peptide de fusion et séquence

Les peptides de fusion présentent une séquence conservée au sein d'une même famille virale (White, 1992). L'identité de séquence entre les peptides de fusion de virus de mêmes familles peut être supérieure à 90% (Gallaher, 1987) (**Table 1**). Par contre, entre des virus appartenant à des familles différentes, l'identité de séquence des peptides de fusion est relativement faible (inférieure à 20%). Malgré cette faible identité, les peptides de fusion présentent des similarités. Ils sont tous majoritairement hydrophobes et contiennent également des résidus de petite taille (Alanine, Glycine, Thréonine, Sérine) (Hernandez et al., 1996 ; Durell et al., 1997 ; Del Angel et al., 2000) (**Table 1**). Cette haute proportion en petits résidus n'est pas retrouvée dans les autres segments interagissant avec les membranes (Phoenix et al., 2002). De plus, les glycines de nombreux peptides de fusion (VIH-1, SIV, Influenza A, Influenza B) sont répartis de manière bien définie. Lorsque les peptides de fusion sont repliés en hélice α , une face de leur hélice est alors plus riche en glycines (Delahunty et al., 1996 ; Del Angel et al., 2002). Ces données suggèrent un rôle de cette succession de glycines localisée sur une face hélicoïdale dans les propriétés des peptides de fusion. D'ailleurs, le remplacement des résidus glycines des peptides de fusion de gp41 ou HA2 résulte en une diminution de leur fusogénicité (Wharton et al., 1988 ; Delahunty et al., 1996). Il a été suggéré que cette succession de glycines intervient dans l'oligomérisation des peptides de fusion, dans la balance d'amphipathicité nécessaire pour la fusion des membranes et/ou dans l'orientation des peptides de fusion dans la membrane (Delahunty et al. 1996).

En plus du ratio important en petits résidus, des motifs communs entre peptides de fusion sont également retrouvés. Par exemple, le motif GFLG est retrouvé chez les peptides de fusion des rétrovirus VIH-1, VIH-2, SIV et chez le peptide de fusion du virus de l'hépatite B humain (Durell et al., 1997 ; Allison et al., 2001). Une mutation au sein du motif GFLG du peptide de fusion de gp41 diminue fortement ou abolit la fusogénicité de ce peptide, indiquant un rôle de ce motif dans les propriétés des peptides de fusion (Pritsker et al., 1999).

Effet des peptides de fusion sur la membrane.

L'utilisation de marqueurs fluorescents lipidiques et solubles a permis de montrer que les peptides de fusion des virus de la rougeole (Wharton et al., 1988 ; Rafalski et al., 1991),

Influenza A (Gething et al., 1986 ; Haque et al., 2001), VIH-1 (Rafalski et al., 1990 ; Martin et al., 1996 ; Charloteaux et al., 2006), BLV (Lorin et al., 2007), Ebola (Adam et al., 2004) et SIV (Martin et al., 1994) induisent la fusion et la perméabilité de vésicules lipidiques (liposomes). Les peptides de fusion des virus Influenza A, VIH-1 et hépatite B induisent également l'hémolyse de cellules (Wharton et al., 1988 ; Rodriguez-Crespo et al., 1995 ; Mobley et al., 1992, 1995, 1999 ; Han et al., 1999).

Même si toutes les études réalisées sur les peptides de fusion n'ont pas permis d'expliquer leur mode d'action de manière précise, elles ont permis de proposer des mécanismes induits par ces peptides, qui favorisent la fusion.

De nombreuses techniques expérimentales (fluorescence du tryptophane, spectroscopie infrarouge, sensibilité à une acidification,...) montrent que les peptides de fusion de gp41, de HA2 et de gp32 pénètrent dans les membranes (Duzgunes, Gambale, 1988 ; Rafalski et al., 1990, 1991 ; Clague et al., 1991 ; Martin et al., 1994, 1996). Leur tendance à s'insérer dans la membrane est due à leur hydrophobicité élevée (Nir, Nieva, 2000). Le mutant G1E du peptide de fusion de HA2, incapable de s'insérer dans la membrane, n'induit pas de fusion membranaire alors que le peptide sauvage ainsi que le mutant G4E s'insèrent dans la membrane et induisent la fusion (Rafalski et al., 1991). Les mesures expérimentales effectuées sur le peptide de fusion de gp41 et des mutants suggèrent également une relation fusogénicité et insertion (Mobley et al., 1999). Par modélisation moléculaire, cette relation a été confirmée : le peptide sauvage fusogène s'insère dans une membrane modélisée au contraire de peptides mutants non fusogènes (Kamath, Wong, 2002 ; Maddox, Longo, 2002). Une relation entre la fusion membranaire et la profondeur de pénétration des peptides de fusion des virus Influenza A, VIH-1 et Sendai a été observée (Rapaport, Shai, 1994 ; Pereira et al., 1997 ; Morris et al., 2004). L'insertion des peptides de fusion induit un stress latéral au niveau des monocouches externes de bicouches lipidiques (Agirre et al., 2000), expliquant que les peptides ne s'insérant pas dans la membrane n'induisent pas la fusion. Toutefois, de nombreuses études indiquent que l'insertion membranaire des peptides de fusion n'est pas transmembranaire (Ishiguro et al., 1993, 1996 ; Martin et al., 1993, 1994, 1996, Lüneberg et al., 1995, Kliger et al., 1997 ; Durell et al., 1997). De plus, des résultats de changement de conductance induit par le peptide de fusion de HA2 dans des bicouches lipidiques sont plus caractéristiques de perturbations lipidiques que de canaux (Duzgunes, Gambale, 1988). Au vu de ces résultats, les peptides de fusion ne s'inséreraient que dans une monocouche des membranes.

Les peptides de fusion de Influenza A, de SIV et du virus de la Leucémie Féline (FLV) favorisent la courbure négative des bicouches lipidiques (Eband and Eband, 1994 ; Eband et al., 1994 ; Colotto et al., 1996 ; Eband, 1998 ; Davies et al., 1998). Or, de nombreuses études indiquent que la fusion est initiée par une augmentation de la courbure négative des deux monocouches externes (Chernomordik, 1996 ; Eband, 2000). En effet, l'addition dans les monocouches membranaires externes de lipides favorisant la courbure négative des membranes augmente la fusion alors que les molécules favorisant la courbure positive inhibent la fusion (Martin et al., 1993 ; Chernomordik et al., 1993, 1995 ; Eband et al., 1997, 1998 ; Chizmadzhev et al., 2004). De plus, une étude récente révèle une corrélation entre la capacité du peptide de fusion de HA2 à induire une courbure négative et sa capacité à induire la fusion (Eband et al., 2001). Les peptides de fusion induiraient donc la fusion des monocouches externes de membranes (stalk), en augmentant la courbure négative des membranes au niveau de leur site d'insertion.

Longo et al. (1997) ont montré que le peptide de fusion de HA2 induit également la rupture des membranes. Par contre, un mutant non fusogène n'induit pas de rupture. Ces données permettent d'expliquer la capacité des peptides de fusion à perméabiliser les membranes. Durant la fusion, les membranes doivent se rompre puis se reformer afin de

généraliser le pore de fusion. Il a donc été suggéré que les peptides de fusion induisent la rupture des monocouches externes, favorisant ainsi la formation de l'intermédiaire de fusion « stalk » (Eband, 2000) ou la déstabilisation de cet intermédiaire (Siegel, Eband, 2000). Cette hypothèse est confortée par le fait que le peptide de fusion de HA2 (Eband et al., 1994 ; Colotto, Eband, 1997), de gp41 (Pereira et al., 1999) et gp32 (Eband et al., 1994 ; El-Kirat et al., 2006) favorise la formation de phases non lamellaires cubiques ou hexagonales au niveau de bicouches (Eband, 2000). Pour se former, ces structures nécessitent une rupture membranaire.

Il a également été montré que les peptides de fusion de gp41 et de HA2 forment des pores au sein de la membrane (Slepushkin et al., 1992 ; Schoch, Blumenthal, 1993). Cette propriété serait due à la capacité des peptides de fusion à s'auto-associer dans la membrane (Nieva et al., 1994 ; Schwarz, Taylor, 1999 ; Pritsker et al., 1999 ; Nir, Nieva, 2000 ; Pereira et al., 1997 ; Yang et al., 2001 ; Sackett, Shai, 2005). Ainsi, le mutant V2E du peptide de fusion de gp41, incapable de former de gros complexes, est non fusogène alors que le peptide sauvage en est capable (Kliger et al., 1997). La formation de pores pourrait induire la fusion de monocouches externes, comme suggéré par Monck et Fernandez (1996). Toutefois, il a également été suggéré que la formation de pores peut n'avoir aucune répercussion sur la fusion (Nieva, Agirre, 2003).

Ces études suggèrent donc que le stress induit par l'insertion des peptides de fusion dans les membranes a deux répercussions: la formation de courbure négative et la rupture des membranes. Ces deux mécanismes réduiraient l'énergie nécessaire à la formation de l'intermédiaire de fusion stalk, et/ou du pore de fusion (Siegel, Eband, 1997 ; Siegel, 1999). Toutefois, des mutants des peptides de fusion de HA2 et gp41 capables de s'insérer dans la membrane mais incapables de déstabiliser la membrane indiquent que d'autres paramètres que l'insertion interviennent dans le processus (Wharton et al., 1988 ; Rafalski et al., 1991 ; Gray et al., 1996 ; Kliger et al., 1997).

Peptide de fusion et structure

Les peptides de fusion sont sujets à des changements de conformation selon leur environnement (Davies et al., 1998 ; Chang et al., 2000 ; Pécheur et al., 2000). Par exemple, le peptide de fusion du VIH-1 adopte une structure non ordonnée dans le DMSO (Buzon et al., 2005), une structure β dans un milieu aqueux (Slepushkin et al., 1992 ; Gordon et al., 2002) alors qu'en présence de lipides, il adopte un mélange α/β dont la proportion dépend de la composition lipidique, de l'environnement, de la pression latérale membranaire et du degré d'hydratation (Nieva et al., 1994 ; Schwartz, Taylor, 1999 ; Charloteaux et al., 2006).

Comme déjà indiqué ci-dessus, les peptides de fusion sont riches en résidus de petite taille (Del Angel et al., 2002). Par exemple, celui de la gp41 contient 20 % de glycines et 23 % d'alanines et celui de HA2 contient 29 % de glycines et 8 % d'alanines (Tamm et al., 2002). Cette composition inhabituelle en acides aminés permet d'expliquer la flexibilité structurale des peptides de fusion.

De nombreuses études mutagenèse suggèrent que la plasticité structurale des peptides de fusion est cruciale pour le processus de fusion. Il a ainsi été montré que des changements de structure du peptide de fusion de HA2 diminuent l'insertion et la déstabilisation membranaire (Longo et al., 1998). Lorsqu'il est inséré dans les membranes, ce peptide adopte une hélice α N-terminale et une hélice 3-10 C-terminale séparées par un coude. Lorsque ce coude est remplacé par une structure plus ordonnée (hélice), le peptide devient non fusogène (Tamm et al., 2002). L'importance de la plasticité structurale pour la fusion est également confortée par des études de mutation montrant que lorsque les glycines des peptides de fusion de HA2 ou de p15E du virus de la Leucémie Murine de Monoley sont remplacées par des

résidus plus volumineux, l'activité fusogène de ces peptides diminue (Rafalski et al., 1991 ; Duzgunes, Gambale, 1988 ; Zhu et al., 1998 ; Han et al. 1999).

Une des principales interrogations est de connaître la structure qu'adopte les peptides lors de la fusion membranaire. Si les études effectuées à l'heure actuelle n'ont pas permis d'y répondre entièrement, elles ont tout de même permis de livrer la structure des peptides de fusion dans les membranes. De manière générale, la proportion en hélice α des peptides de fusion augmente en présence de lipides (Martin et al., 1994, 1996, 1999). Une relation entre le taux d'hélicité du peptide de fusion de HA2 dans la membrane et sa fusogénicité a été montrée : sous forme hélicoïdale, il induit la fusion alors que sous conformation β , il en est incapable (Takahashi, 1990). De nombreuses autres études expérimentales, utilisant les techniques EPR, CD, ATR-FTIR, ont confirmé que le peptide de fusion de HA2 adopte une structure majoritairement hélicoïdale dans les membranes (Luneberg et al., 1995 ; Macosko et al. 1997 ; Han et al., 1999 ; Tamm et al., 2002). L'utilisation de ces techniques a également montré que les peptides de fusion de gp30 (Lorin et al., 2007), gp32 (Martin et al., 1994) et de la protéine F1 du Canine Distemper Virus (Aranda et al., 2003) sont majoritairement hélicoïdaux dans les membranes.

Alors que pour ces peptides de fusion, les études expérimentales indiquent une structure hélicoïdale membranaire, pour le peptide de fusion de gp41, les résultats divergent. En effet, suivant sa longueur, son environnement, sa concentration et la technique d'analyse utilisée, le peptide de fusion de gp41 adopte une structure majoritairement hélicoïdale (Rafalski et al., 1990 ; Martin et al., 1996 ; Gordon et al., 1992, 2002, 2004), majoritairement β (Rafalski et al., 1990 ; Pereira et al., 1997 ; Yang et al., 2001 ; Sackett, Shai, 2003, 2005) ou un mélange des deux (Martin et al., 1993 ; Castano, Desbats, 2006 ; Saez-Cirion, Nieva, 2002 ; Buzon et al., 2005) dans les membranes. Des études suggèrent que la fusion est induite par le peptide de fusion lorsqu'il adopte une structure β (Sackett, Shai, 2003, 2005 ; Buzon et al., 2005). Toutefois, il a été montré que le peptide de fusion de gp41 adopte une conformation β en présence de membranes dont il n'induit pas la fusion alors que la structure α est observée en présence de membranes dont il induit la fusion, suggérant que la structure β ne permettrait que l'agrégation des membranes alors que la structure α interviendrait dans la déstabilisation et la fusion membranaire (Rafalski et al., 1990). D'autres études suggèrent également que le peptide de fusion de gp41 induit la fusion lorsqu'il adopte une structure hélicoïdale (Martin et al., 1996 ; Gordon et al., 1992, 2002, 2004). Ces différences de résultats suggèrent finalement que ces deux structures sont essentielles au bon déroulement de la fusion membranaire, confirmant l'importance de la labilité structurale de ces peptides.

Toutes ces données indiquent un rôle de la structure hélicoïdale dans la fusion membranaire. Toutefois, il a été montré que des peptides mutants non fusogènes de VIH-1 et SIV adoptent la même proportion en hélice α que le peptide sauvage fusogène (Martin et al., 1994, 1996) et ont des affinités membranaires identiques (Morris et al., 2004). Ces résultats montrent qu'un autre paramètre est important dans la fusogénicité des peptides de fusion. De nombreuses études indiquent que ce paramètre est l'orientation adoptée par les peptides de fusion dans la membrane (Martin et al., 1994, 1996 ; Maddox, Longo, 2002 ; Charlotheaux et al., 2006 ; Lorin et al., 2007).

Les peptides obliques

En 1988, Brasseur et al. ont montré par modélisation moléculaire que, lorsqu'il est replié en hélice α , le peptide de fusion de la glycoprotéine virale du virus de la maladie de Newcastle adopte un angle de 55° dans une monocouche de DPPC, suggérant une insertion oblique dans la membrane (Brasseur et al., 1988). Ce fût la première fois qu'une telle orientation fût prédite.

Hélices insérées obliquement dans les membranes

Quelques années plus tard, l'équipe du professeur Brasseur a également prédit une insertion membranaire oblique des peptides de fusion des virus de la rougeole, VIH-1, SIV, Influenza A, BLV, Ebola et Sendai lorsqu'ils sont hélicoïdaux (Brasseur et al., 1988 ; Brasseur, 1991 ; Peuvot et al., 1999 ; Lins et al., 2001 ; Adam et al., 2004), (**Figure 3**). Une insertion membranaire oblique du peptide de fusion de HA2 et de gp41 a également été prédite par des études de modélisation entreprises par d'autres laboratoires (Efremov et al., 1999; Kamath, Wong, 2002 ; Maddox, Longo, 2003).

L'orientation oblique des peptides de fusion sous forme hélicoïdale a été confirmée par des analyses expérimentales. L'utilisation de la spectroscopie infrarouge (ATR-FTIR) a permis de mesurer un angle de 50°, 45° et 50° respectivement entre le peptide de fusion de gp41 (Martin et al., 1996), de HA2 (Luneberg et al., 1995) et de gp32 (Martin et al., 1994) et la surface membranaire. D'autres techniques expérimentales ont été utilisées pour connaître plus précisément l'interaction de peptides avec la membrane. L'analyse EPR du peptide de fusion de HA2 indique que la partie hélicoïdale s'insère à environ 15 Å des groupes phosphates avec un angle de 25° (Macosko et al., 1997). Les analyses ESR et FTIR ont montré un remaniement de ce peptide lorsqu'il se rapproche de la membrane, suivi d'une insertion oblique et d'une diminution de la mobilité (Luneberg et al., 1995). Enfin, l'utilisation de l'EPR et de la RMN a fourni la structure complète et l'orientation de ce peptide dans une membrane, confirmant une structure hélicoïdale orientée obliquement (Han et al., 2001). Par diffraction de neutrons, l'équipe de Bradshaw a, quant à elle, confirmé que le peptide de fusion de gp32 pouvait s'insérer dans la membrane avec un angle de 55° sous forme hélicoïdale (Bradshaw et al., 2000).

Une comparaison des résultats expérimentaux avec ceux de modélisation moléculaire montre que cette dernière approche prédit l'orientation membranaire des peptides de fusion. Par exemple, l'algorithme IMPALA développé au Centre de Biophysique Moléculaire Numérique (Ducarme et al., 1998) prédit une insertion membranaire de 50° par rapport à la surface membranaire du peptide de fusion de gp32 (Lins et al., 2002), comme la spectroscopie ATR-FTIR (Martin et al., 1994).

En plus des peptides de fusion, d'autres peptides ont également été prédits comme obliques dans les membranes lorsqu'ils sont hélicoïdaux (Lins et al., 2001 ; Ravault et al., 2005 ; Nguyen et al., 2006). Ces peptides correspondent à des fragments de protéines impliquées dans des processus variés, comme les apolipoprotéines (Apo), les enzymes lysolipitiques, les séquences signaux, les protéines membranaires, les protéines anti-angiogénèses et les protéines neurotoxiques (Lins et al., 2001 ; Nguyen et al., 2006) (**Figure 3**). L'orientation oblique de certains de ces peptides a été confirmée expérimentalement (Lambert et al., 1998 ; Decout et al. 1999). Récemment, une orientation membranaire oblique a également été mesurée pour des peptides *de novo* (Lorin et al., 2006 ; Hsu et al., 2002) ainsi que pour un peptide composé d'acides aminés non naturels (Lins et al., 2006), indiquant que cette orientation n'est pas spécifique à des fragments de protéines biologiques (**Figure 3**). De par leur capacité à adopter une orientation oblique dans la membrane, tous ces peptides, dont font partie les peptides de fusion, ont été appelés « peptides obliques ».

Peptide oblique et structure

La structure des peptides de fusion dépend fortement de son environnement (cf. section ci-dessus peptide de fusion et structure). Il en est de même pour les autres peptides obliques. Par exemple, le peptide oblique de la protéine prion adopte une structure majoritairement hélicoïdale dans des micelles de SDS qui disparaît dans un milieu aqueux

(Figure 3). Tout comme les peptides de fusion, les autres peptides obliques contiennent une proportion importante de petits résidus (alanine, glycine), expliquant leur polymorphisme structural. Lorsque les peptides obliques sont repliés sous forme hélicoïdale, une face est généralement plus riche en glycines (Bosch et al., 1989 ; White, 1990, 1992 ; Delahunty et al., 1996 ; Martin et al., 1999 ; Harris et al., 2000 ; Phoenix et al., 2002). Cette distribution asymétrique en résidus glycines a été utilisée récemment pour détecter de nouveaux peptides obliques (Daman et al., 2001).

La relation peptide oblique – labilité structurale a récemment été renforcée par l'analyse d'un peptide *de novo*, le peptide caméléon. Ce peptide a été conçu pour adopter une conformation α ou β selon sa position dans une protéine (Minor, Kim, 1996). De plus, le peptide caméléon, sous forme isolée, adopte un mélange d'hélice et de structure β dont les proportions varient suivant l'hydrophobicité du milieu (**Figure 3**). L'analyse de ce peptide, par des approches expérimentales et de modélisation, a montré que ce peptide adopte une orientation membranaire oblique (Lorin et al., 2006). Cette étude indique donc qu'un peptide connu pour ses propriétés de labilité structurale est un peptide oblique, renforçant le lien peptide oblique – labilité structurale.

La labilité structurale des peptides obliques semble importante pour leurs propriétés ainsi que pour celles des protéines contenant un peptide oblique. Il a ainsi été proposé que durant les processus pathologiques induits par la protéine prion (PrP), le polymorphisme structural de la zone protéique 119-137, contenant le peptide oblique, joue un rôle dans la déstabilisation membranaire et induit l'agrégation protéine-protéine à la surface membranaire (Saez-Cirion et al., 2003).

Une asymétrie hydrophobe à l'origine de l'orientation oblique

Malgré la faible homologie de séquence entre peptides obliques, ils possèdent des caractères communs, étant notamment majoritairement hydrophobes. Toutefois, la répartition de l'hydrophobicité diffère de celle des hélices amphipathiques (adoptant une orientation parallèle par rapport à la surface membranaire) ou transmembranaires (orientation perpendiculaire par rapport à la surface membranaire) (Brasseur, 1991 ; Brasseur et al., 1997 ; Rahman et al., 1997 ; Decout et al., 1999 ; Brasseur, 2000 ; Phoenix et al., 2002 ; Thomas et al., 2006). En effet, les peptides obliques présentent un gradient d'hydrophobicité le long de l'axe de leur hélice (Brasseur, 1991, 2000 ; Lins et al., 2001) (**Figure 3**). Par contre, sous forme β , les peptides obliques ne présentent pas ce gradient (Brasseur, 2000 ; Lorin et al., 2006).

Le gradient hydrophobe est responsable de l'orientation oblique des peptides. L'extrémité la plus hydrophobe de l'hélice s'insère profondément dans le cœur apolaire membranaire alors que l'autre extrémité, plus hydrophile se localise préférentiellement au niveau des têtes polaires ou du milieu aqueux (Perez-Mendez et al., 1998). L'importance du gradient hydrophobe pour l'orientation des peptides obliques a été confirmée par des études de mutation. Des mutations modifiant le gradient d'hydrophobicité modifient l'orientation des peptides (Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2001, 2002).

Les peptides de fusion faisant partie des peptides obliques, leur orientation membranaire est également reliée à leur profil hydrophobe. La perte du gradient hydrophobe des peptides de fusion d'Ebola (Adam et al., 2004), SIV (Horth et al., 1991) et BLV (Vonèche et al. 1992) correspond à la perte de l'orientation oblique pour une orientation parallèle ou perpendiculaire. Par contre, l'orientation oblique de ces peptides est récupérée suite à la restauration du gradient hydrophobe.

La présence d'un gradient hydrophobe au sein d'un peptide oblique est utilisée à l'heure actuelle pour rechercher la présence de tels motifs dans les protéines. De nombreuses

méthodes permettent d'identifier le profil hydrophobe d'une protéine et ainsi d'identifier la présence d'un peptide oblique. La méthode Jähnig et Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) repose sur l'analyse de l'hydrophobicité de la séquence des protéines (Gaboriaud et al., 1987 ; Jähnig, 1990). La méthode Molecular Hydrophobicity Potential (MHP) permet de visualiser la répartition de l'hydrophobicité le long d'un peptide modélisé (Brasseur, 1991). Ces méthodes sont généralement associées pour prédire l'existence d'un peptide oblique dans une protéine (Lorin et al., 2006).

Relation oblicité-fusogénicité

Tout comme les peptides de fusion, les autres peptides obliques induisent la déstabilisation de liposomes. Celle-ci est mesurée par fusion des phases lipidiques et la perméabilisation des liposomes (Lins et al., 2002 ; Pillot et al., 1996, 1997 ; Perez-Mendez et al., 1998 ; Lambert et al., 1998 ; Decout et al., 1999 ; Lorin et al., 2004 ; Nguyen et al., 2006 ; Crowet et al., accepted) (**Figure 3**). Les peptides obliques de la PrP, de α -synucléine, de la protéine prolactine et du peptide β -amyloïde (A β), qui induisent de la fusion de liposomes, provoquent également la mort cellulaire, confirmant le pouvoir déstabilisateur de ces peptides (Pillot et al., 1999, 2000 ; Nguyen et al., 2006 ; Crowet et al., accepted).

Cette propriété n'est pas liée au simple caractère hydrophobe des peptides obliques, leur permettant de s'insérer dans les membranes. En effet, des mutants des peptides obliques des protéines ApoC-III (Lins et al., 2002), Apo A-II (Lambert et al., 1998), lécithine cholestérol acyltransférase (Perez-Mendez et al., 1998 ; Decout et al., 1999), A β (Pillot et al., 1996) et PrP (Pillot et al., 1997) induisent moins de déstabilisation membranaire que les peptides sauvages alors que l'hydrophobicité générale est conservée. Par contre, ces études indiquent que la perte de l'orientation oblique coïncide avec la perte du pouvoir fusogène des peptides obliques (Pillot et al., 1996, 1997 ; Lambert et al., 1998 ; Perez-Mendez et al., 1998 ; Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2002). Par contre, lorsque le caractère oblique des peptides est restauré par de nouvelles mutations, sa fusogénicité est également retrouvée (Lins et al., 2002 ; Pillot et al., 1996, 1997 ; Perez-Mendez et al., 1998 ; Lambert et al., 1998). Puisque l'orientation oblique des peptides est gouvernée par la présence d'un gradient hydrophobe asymétrique le long de l'axe de l'hélice (cf. section ci-dessus), la perte de ce gradient induit une perte de fusogénicité des peptides (Perez-Mendez et al., 1998 ; Decout et al., 1999 ; Lins et al., 2002).

La même relation entre oblicité et fusogénicité a également été mesurée pour les peptides de fusion par modélisation moléculaire et analyses FTIR. Des peptides de fusion perdant leur orientation oblique dans la membrane suite à des mutations perdent également leur capacité à déstabiliser les liposomes (Martin et al., 1994, 1996 ; Maddox, Longo, 2002 ; Adam et al., 2004 ; Charlotiaux et al., 2006 ; Lorin et al., 2007). Une relation entre l'oblicité du peptide de fusion et l'activité fusogène de la glycoprotéine entière a également été mesurée pour gp30 de BLV et gp32 de SIV (Horth et al., 1991 ; Vonèche et al., 1992).

L'orientation oblique qu'adoptent les hélices semble donc être le mécanisme responsable de la fusion membranaire. Il a été suggéré que l'insertion oblique désorganise le parallélisme des chaînes acylées lipidiques et par conséquent induit l'apparition d'une courbure négative au niveau des membranes (Brasseur, 2000 ; Bradshaw et al., 2000 ; Epan, 2000). De nombreux résultats vont dans le sens de cette hypothèse. Tout d'abord, il a été montré par modélisation moléculaire, via Hypermatrice, que les peptides obliques induisent une perturbation de l'organisation de monocouches de lipides (Brasseur et al., 1990) (**Figure 3**). Les lipides, qui en l'absence de peptide s'organisent en structure lamellaire avec une courbure positive, adoptent une courbure négative lorsque des peptides obliques y sont insérés. D'autres programmes informatiques montrent également que le peptide de fusion

de gp41 induit une déstabilisation membranaire lorsqu'il s'insère obliquement dans celle-ci (Kamath, Wong, 2002). De même, le peptide oblique de la protéine A β induit la formation de structures lipidiques non-lamellaire ainsi qu'une courbure négative à l'interface membrane/eau (Mingeot-Leclercq et al. 2002, 2003). Par contre, il perd son caractère déstabilisateur lorsque du piracétam, une molécule qui induirait une courbure positive au niveau membranaire, est ajouté (Mingeot-Leclercq et al., 2003). Il a également été montré que les peptides de fusion de gp32 et de HA2 diminuent la température de transition phase lamellaire-phase hexagonale de bicouches lipidiques, alors que des mutants adoptant une orientation perpendiculaire n'ont aucun effet sur la température de transition (Eband et al., 1994 ; Eband et al., 2001).

Toutefois, l'effet précis des peptides obliques au niveau de l'organisation membranaire n'en reste qu'à l'état de suggestion et est toujours sous débat. Des calculs théoriques proposent ainsi un autre mécanisme : une insertion cylindrique oblique au niveau d'une monocouche résulte en un fléchissement anisotropique de la surface de la monocouche autour de l'insertion, sans inclinaison des chaînes carbonées des lipides (Kozlovsky et al., 2004). Toutefois, selon les auteurs, ce fléchissement ne serait pas à lui seul suffisant pour permettre la fusion.

Utilisation de la théorie des peptides obliques pour déterminer la région des peptides de fusion indispensable pour la fusion

Comme indiqué par Eband (2003), bien que le terme « peptide de fusion » soit largement employé dans la littérature, il n'y a pas de définition précise de ce que ce terme signifie. Bien entendu, un peptide de fusion induit la fusion membranaire. Cependant, suivant les publications, le peptide de fusion a une longueur différente et donc une séquence différente. Par exemple, le peptide de fusion de VIH-1 correspond soit aux 16 (Martin et al., 1993 ; Kamath et Wong, 2002 ; Wong et al., 2003), 23 (Pereira et al., 1995, 1999 ; Delahunty et al., 1996 ; Yang et al., 2001 ; Gordon et al., 2002) ou 33 (Pritsker et al., 1999) premiers résidus de gp41.

L'équipe du professeur Brasseur s'est donc récemment intéressée à mieux définir les peptides de fusion. Une nouvelle définition fût employée, celle du « peptide de fusion minimal ». Le peptide de fusion minimal correspond à la plus courte séquence du peptide de fusion induisant une déstabilisation membranaire optimale (Charloteaux et al., 2006 ; Lorin et al., 2007).

Comme indiqué ci-dessus (« peptide oblique et fusogénicité »), un peptide hélicoïdal adoptant une orientation oblique dans la membrane déstabilise cette dernière, ce qui n'est pas le cas des peptides hélicoïdaux adoptant une orientation parallèle ou perpendiculaire (Brasseur, 2000). De plus, il a été montré que plus l'angle de l'hélice est proche de 45°, plus la membrane est déstabilisée (Brasseur, 2000). Cette relation pouvoir fusogène – angle d'insertion membranaire a été utilisée pour déterminer le peptide de fusion minimal de gp41 et gp30. Pour chacune de ces glycoprotéines virales, le peptide de fusion minimal correspond donc au plus court peptide hélicoïdal adoptant un angle d'insertion oblique optimal (le plus proche de 45° par rapport à la surface membranaire) dans la membrane. L'algorithme IMPALA a été utilisé pour prédire l'orientation membranaire de ces peptides.

Les résultats *in silico* indiquent que les peptides hélicoïdaux adoptant un angle d'insertion oblique optimal sont respectivement les 12 et 15 premiers résidus de gp41 et gp30 (Charloteaux et al., 2006 ; Lorin et al., 2007). Afin de confirmer ces prédictions, la fusogénicité de ces deux peptides a été analysée expérimentalement (Lorin et al., 2004). Les mesures de fusion et de perméabilité de liposomes montrent que ces deux peptides induisent autant de déstabilisation membranaire que des peptides plus longs mais sont plus fusogènes

que des peptides plus courts (Charloteaux et al., 2006 ; Lorin et al., 2007). Ces résultats confirment la prédiction *in silico*. Les peptides N-terminaux de 12 et 15 résidus sont donc les peptides de fusion minimaux respectivement de gp41 et gp30. Cette étude a également permis de mesurer pour la première fois la capacité fusogène du peptide de fusion de gp30.

L'algorithme IMPALA a également été utilisé pour analyser des mutations connues pour avoir un effet sur la fusogénicité des gp30 et gp41 entières. Les résultats montrent que les glycoprotéines fusogènes sont corrélées avec un peptide de fusion inséré obliquement dans la membrane alors que les glycoprotéines peu fusogènes contiennent un peptide de fusion non oblique. De plus, plus l'angle adopté par le peptide de fusion est proche de 45°, plus la glycoprotéine correspondante induit de la fusion membranaire. Dans le cas de gp30, des analyses complémentaires sur le peptide de fusion ont été effectuées. Un peptide de fusion mutant adoptant une orientation perpendiculaire dans la membrane n'induit pas de déstabilisation significative de liposomes alors qu'un peptide de fusion mutant adoptant une orientation oblique induit de la déstabilisation membranaire. Ces différences ne sont pas dues à une différence de structure secondaire dans la membrane, puisque les deux peptides, ainsi que le peptide de fusion sauvage, adoptent une structure majoritairement hélicoïdale. Cette étude complémentaire confirme la relation entre la capacité des peptides de fusion à s'insérer obliquement dans la membrane et sa capacité à déstabiliser les membranes.

Ces résultats obtenus sur gp30 et gp41 indiquent donc que la relation obliquité – fusogénicité de peptides hélicoïdaux permet de déterminer le peptide de fusion nécessaire et suffisant pour induire une déstabilisation membranaire. Ils montrent également que l'étude des propriétés membranaires des peptides de fusion permet d'expliquer les propriétés fusogènes des glycoprotéines entières.

Conclusion :

Les nombreuses études réalisées sur les peptides de fusion ont permis de proposer des mécanismes d'action par lesquels ils induisent la déstabilisation et la fusion membranaire. La structure, le niveau d'insertion ainsi que l'orientation de ces peptides dans la membrane semblent cruciaux. Toutefois, de nombreux résultats divergent entre différentes études, suivant la méthode, l'environnement, la concentration et la séquence du peptide de fusion utilisés lors de ces études. La détermination de la région du peptide de fusion de gp41 et gp30 nécessaire et suffisante pour l'induction de la fusion permettra d'éviter les problèmes liés à la longueur du peptide. De plus, de nombreuses études suggèrent des propriétés communes entre les peptides de fusion de ces virus et ceux des autres virus (voir Lorin et al., 2007), suggérant que la détermination de cette région pour d'autres virus est possible.

Puisque de nombreuses relations existent entre les résultats obtenus avec les peptides de fusion et ceux obtenus avec la glycoprotéine entière, il a été suggéré que les peptides de fusion étaient de bons modèles pour étudier la fusion virale (Nieva, Agirre, 2003). Toutefois, dans le cas de la fusion *in vivo*, les nombreuses autres régions de la glycoprotéine doivent être prises en compte. La région cytoplasmique, le domaine transmembranaire, la région pré-transmembranaire ainsi que la région post-« peptide de fusion » de certaines glycoprotéines ont, comme le peptide de fusion, un effet de déstabilisation membranaire, indiquant un rôle de ces domaines protéiques dans la fusion virale (Ghosh, Shai, 1999 ; Eband, 2000 ; Kozerski et al., 2000 ; Shai, 2000 ; Schroth-Diez et al., 2000 ; Sackett, Shai, 2002 ; Peisajovich et al., 2002 ; Peisajovich, Shai, 2003).

Références bibliographiques

- Adam B., Lins L., Stroobant V., Thomas A., Brasseur R. (2004). Distribution of hydrophobic residues is crucial for the fusogenic properties of the Ebola virus GP2 fusion peptide. *J. Virol.* **78**, p. 2131-2136.
- Agirre A., Flach C., Goni FM., Mendelsohn R., Valpuesta JM., Wu F.J., Nieva JL. (2000). Interactions of the HIV-1 fusion peptide with large unilamellar vesicles and monolayers. A cryo-TEM and spectroscopic study. *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, p. 153-164.
- Allison SL., Schalich J., Stiasny K., Mandl CW., Heinz FX. (2001). Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J. Virol.* **75**, p. 4268-4275.
- Almers W., Tse FW. (1990). Transmitter Release from Synapses - Does A Preassembled Fusion Pore Initiate Exocytosis. *Neuron* **4**, p. 813-818.
- Aranda FJ., Teruel JA., Ortiz A. (2003). Interaction of a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of canine distemper virus fusion protein with phospholipid vesicles: a biophysical study. *Biochim. Biophys. Acta* **1618**, p. 51-58.
- Baker KA., Dutch RE., Lamb RA., Jardetzky TS. (1999). Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol. Cell* **3**, p. 309-319.
- Basanez G. (2002). Membrane fusion: the process and its energy suppliers. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, p. 1478-1490.
- Bentz J. (1990). An architecture for the fusion site of influenza hemagglutinin. *FEBS Lett.* **276**, p. 1-5
- Bentz J. (2000). Membrane fusion mediated by coiled coils: A hypothesis. *Biophys. J.* **78**, p. 886-900.
- Bosch ML., Earl PL., Fargnoli K., Picciafuoco S., Giombini F., Wongstaal F., Franchini G. (1989). Identification of the Fusion Peptide of Primate Immunodeficiency Viruses. *Science* **244**, p. 694-697.
- Bosch BJ., van der Zee R., de Haan CAM., Rottier PJM. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex. *J. Virol.* **77**, p. 8801-8811.
- Bosch BJ., Martina BEE., van der Zee R., Lepault J., Haijema BJ., Versluis C., Heck AJR., de Groot R., Osterhaus ADME., Rottier PJM. (2004). Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, p. 8455-8460.
- Bradshaw JP., Darkes MJM., Harroun TA., Katsaras J., Epanand RM. (2000). Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffractions. *Biochemistry* **39**, p. 6581-6585.

Brasseur R., Cornet B., Burny A., Vandenbranden M., Ruyschaert JM. (1988). Mode of Insertion Into A Lipid-Membrane of the N-Terminal Hiv Gp41 Peptide Segment. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **4**, p. 83-90.

Brasseur, R., Lorge, P., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, JM., Espion, D., Burny, A. (1988). The mode of insertion of the paramyxovirus F1 N-terminus into lipid matrix, an initial step in host cell/virus fusion. *Virus Genes* 1(4), p. 325-332.

Brasseur R., Vandenbranden M., Cornet B., Burny A., Ruyschaert JM. (1990). Orientation Into the Lipid Bilayer of An Asymmetric Amphipathic Helical Peptide Located at the N-Terminus of Viral Fusion Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1029**, p. 267-273.

Brasseur R. (1991). Differentiation of Lipid-Associating Helices by Use of 3-Dimensional Molecular Hydrophobicity Potential Calculations. *J. Biol. Chem.* **266**, p. 16120-16127.

Brasseur R., Pillot T., Lins L., Vandekerckhove J., Rosseneu M. (1997). Peptides in membranes: Tipping the balance of membrane stability. *Trends Biochem. Sci.* **22**, p. 167-171.

Brasseur R. (2000). Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis). *Mol. Membr. Biol.* **17**, p. 31-40.

Buchschacher GL., Freed EO., Panganiban AT. (1995). Effects of 2Nd-Site Mutations on Dominant Interference by A Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Envelope Glycoprotein Mutant. *J. Virol.* **69**, p. 1344-1348.

Bullough PA., Hughson FM., Skehel JJ., Wiley DC. (1994). Structure of Influenza Hemagglutinin at the Ph of Membrane-Fusion. *Nature* **371**, p. 37-43.

Buzon V., Padros E., Cladera J. (2005). Interaction of fusion peptides from HIV gp41 with membranes: A time-resolved membrane binding, lipid mixing, and structural study. *Biochemistry* **44**, p. 13354-13364.

Caffrey M., Cai ML., Kaufman J., Stahl SJ., Wingfield PT., Covell DG., Gronenborn AM., Clore G.M. (1998). Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *Embo J.* **17**, p. 4572-4584.

Carr CM., Kim PS. (1993). A Spring-Loaded Mechanism for the Conformational Change of Influenza Hemagglutinin. *Cell* **73**, p. 823-832.

Carr, CM., Chaudhry, C., Kim, PS. (1997). Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, p. 14306-14313.

Castano S., Desbat B. (2005). Structure and orientation study of fusion peptide FP23 of gp41 from HIV-1 alone or inserted into various lipid membrane models (mono-, bi- and multilayers) by FT-IR spectroscopies and Brewster angle microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1715**, p. 81-95.

Chan DC., Fass D., Berger JM., Kim PS. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, p. 263-273.

Chang DK., Cheng SF., Trivedi VD., Yang SH. (2000). The amino-terminal region of the fusion peptide of influenza virus hemagglutinin HA2 inserts into sodium dodecyl sulfate

micelle with residues 16-18 at the aqueous boundary at acidic pH - Oligomerization and the conformational flexibility. *J. Biol. Chem.* **275**, p. 19150-19158.

Charloteaux B., Lorin A., Crowet JM., Stroobant V., Lins L., Thomas A., Brasseur R. (2006). The N-terminal 12 residue long peptide of HIV gp41 is the minimal peptide sufficient to induce significant T-cell-like membrane destabilization in vitro. *J. Mol. Biol.* **359**, p. 597-609.

Chen CH., Matthews TJ., Mcdanal CB., Bolognesi DP., Greenberg M.L. (1995). A Molecular Clasp in the Human-Immunodeficiency-Virus (Hiv) Type-1 Tm Protein Determines the Anti-Hiv Activity of Gp41 Derivatives - Implication for Viral Fusion. *J. Virol.* **69**, p. 3771-3777.

Chernomordik L., Chanturiya A., Green J., Zimmerberg J. (1995). The Hemifusion Intermediate and Its Conversion to Complete Fusion - Regulation by Membrane-Composition. *Biophys. J.* **69**, p. 922-929.

Chernomordik L. (1996). Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chem. Phys. Lipids* **81**, p. 203-213.

Chernomordik LV., Vogel SS., Sokoloff A., Onaran HO., Leikina EA., Zimmerberg J. (1993). Lysolipids Reversibly Inhibit Ca²⁺-Dependent, Gtp-Dependent and Ph-Dependent Fusion of Biological-Membranes. *Febs Lett.* **318**, p. 71-76.

Chernomordik LV., Zimmerberg J. (1995). Bending Membranes to the Task - Structural Intermediates in Bilayer Fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, p. 541-547.

Chernomordik LV., Frolov VA., Leikina E., Bronk P., Zimmerberg J. (1998). The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: Restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J. Cell Biol.* **140**, p. 1369-1382.

Chernomordik LV., Leikina E., Kozlov MM., Frolov VA., Zimmerberg J. (1999). Structural intermediates in influenza haemagglutinin-mediated fusion. *Mol. Membr. Biol.* **16**, p. 33-42.

Chizmadzhev YA. (2004). The mechanisms of lipid-protein rearrangements during viral infection. *Bioelectrochemistry* **63**, 129-136.

Clague MJ., Knutson JR., Blumenthal R., Herrmann A. (1991). Interaction of Influenza Hemagglutinin Amino-Terminal Peptide with Phospholipid-Vesicles - A Fluorescence Study. *Biochemistry* **30**, p. 5491-5497.

Cleveland SM., Jones TD., Dimmock NJ. (2000). Properties of a neutralizing antibody that recognizes a conformational form of epitope ERDRD in the gp41 C-terminal tail of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* **81**, p. 1251-1260.

Colman PM., Lawrence M.C. (2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nature Reviews Mol. Cell Biology* **4**, p. 309-319.

Colotto A., Martin I., Ruyschaert JM., Sen A., Hui SW., Epand RM. (1996). Structural study of the interaction between the SIV fusion peptide and model membranes. *Biochemistry* **35**, p. 980-989.

Colotto A., Epand RM. (1997). Structural study of the relationship between the rate of membrane fusion and the ability of the fusion peptide of influenza virus to perturb bilayers. *Biochemistry* **36**, p. 7644-7651.

Crowet JM., Lins L., Dupiereux I., Elmoualija B, Lorin A., Charlotiaux B., Stroobant V., Heinen E., Brasseur R. (2007). In silico/tilted properties of the 67-78 fragment of α -synuclein are responsible for membrane destabilization and neurotoxicity, *accepted*

Da Poian AT., Carneiro FA., Stauffer F. (2005). Viral membrane fusion: is glycoprotein G of rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, p. 813-823.

Daman A., Harris F., Biwas S., Wallace J., Phoenix DA. (2001) A theoretical investigation into the lipid interactions of m-calpain. *Mol.Cell. Bioch.* **223**, p. 159-163.

Davies SMA., Epand RF., Bradshaw JP., Epand RM. (1998). Modulation of lipid polymorphism by the feline leukemia virus fusion peptide: Implications for the fusion mechanism. *Biochemistry* **37**, p. 5720-5729.

Decout A., Labeur C., Vanloo B., Goethals M., Vandekerckhove J., Brasseur R., Rosseneu M. (1999). Contribution of the hydrophobicity gradient to the secondary structure and activity of fusogenic peptides. *Mol. Membr. Biol.* **16**, p. 237-246.

Del Angel VD., Dupuis F., Mornon JP., Callebaut I. (2002). Viral fusion peptides and identification of membrane-interacting segments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, p. 1153-1160.

Delahunty MD., Rhee I., Freed EO., Bonifacino JS. (1996). Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: Identification of critical glycine residues. *Virology* **218**, p. 94-102.

Dennison SM., Bowen ME., Brunger AT., Lentz BR. (2006). Neuronal SNAREs do not trigger fusion between synthetic membranes but do promote PEG-mediated membrane fusion. *Biophys. J.* **90**, p. 1661-1675.

Dimitrov AS., Rawat SS., Jiang S., Blumenthal R. (2003). Role of the fusion peptide and membrane-proximal domain in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Biochemistry* **42**, p. 14150-14158.

Doms RW., Moore JP. (2000). HIV-1 membrane fusion: Targets of opportunity. *J. Cell Biol.* **151**, F9-F13.

Ducarme P., Rahman M., Brasseur R. (1998). IMPALA: A simple restraint field to simulate the biological membrane in molecular structure studies. *Proteins* **30**, p. 357-371.

Durell SR., Martin I., Ruyschaert JM., Shai Y., Blumenthal R. (1997). What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Mol. Membr. Biol.* **14**, p. 97-112.

Durrer P., Galli C., Hoenke S., Corti C., Gluck R., Vorherr T., Brunner J. (1996). H⁺-induced membrane insertion of influenza virus hemagglutinin involves the HA2 amino-terminal fusion peptide but not the coiled coil region. *J. Biol. Chem.* **271**, p. 13417-13421.

- Duzgunes N., Gambale F. (1988). Membrane Action of Synthetic N-Terminal Peptides of Influenza-Virus Hemagglutinin and Its Mutants. *Febs Lett.* **227**, p. 110-114.
- Eckert DM., Kim PS. (2001) Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, p. 777-810.
- Efremov RG., Nolde DE., Volynsky PE., Chernyavsky AA., Dubovskii PV., Arseniev AS. (1999). Factors important for fusogenic activity of peptides: molecular modeling study of analogs of fusion peptide of influenza virus hemagglutinin. *Febs Lett.* **462**, p. 205-210.
- El Kirat K., Dufrene YF., Lins L., Brasseur R. (2006). The SIV tilted peptide induces cylindrical reverse micelles in supported lipid bilayers. *Biochemistry* **45**, p. 9336-9341.
- Eband, RF., Martin, I., Ruyschaert, JM., and Eband, RM. (1994). Membrane orientation of the SIV fusion peptide determines its effect on bilayer stability and ability to promote membrane fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, p. 1938-1943.
- Eband RM., Eband RF. (1994). Relationship Between the Infectivity of Influenza-Virus and the Ability of Its Fusion Peptide to Perturb Bilayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, p. 1420-1425.
- Eband RM. (1997). Studies of membrane physical properties and their role in biological function. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, p. 1073-1079.
- Eband, RM. (1998). Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, p. 353-368.
- Eband, RM. (2000). Membrane fusion. *Biosci. Rep.* **20**, p. 435-441.
- Eband R.M., Eband R.F., Martin I., Ruyschaert J.M. (2001) Membrane interactions of mutated forms of the influenza fusion peptide. *Biochemistry* **40**, p. 8800-8807.
- Eband RM. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, p. 116-121.
- Fass D., Harrison SC., Kim PS. (1996). Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nat. Struct. Biol.* **3**, p. 465-469.
- Fredericksen BL., Whitt MA. (1995). Vesicular Stomatitis-Virus Glycoprotein Mutations That Affect Membrane-Fusion Activity and Abolish Virus Infectivity. *J. Virol.* **69**, p. 1435-1443.
- Freed EO., Myers DJ., Risser R. (1990). Characterization of the Fusion Domain of the Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Envelope Glycoprotein Gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, p. 4650-4654.
- Furuta RA., Wild CT., Weng YK., Weiss CD. (1998). Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* **5**, p. 276-279.
- Gaboriaud C., Bissery V., Benchetrit T., Mornon JP. (1987). Hydrophobic Cluster-Analysis - An Efficient New Way to Compare and Analyze Amino-Acid-Sequences. *Febs Lett.* **224**, p. 149-155.

Gallaher WR. (1987). Detection of A Fusion Peptide Sequence in the Transmembrane Protein of Human-Immunodeficiency-Virus. *Cell* **50**, p. 327-328.

Garry, CE., Garry, RF. (2004). Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes). *Theor. Biol. Med. Model.* **15**, p. 1-16.

Garry RF., Dash S. (2003). Proteomics computational analyses suggest that hepatitis C virus E1 and pestivirus E2 envelope glycoproteins are truncated class II fusion proteins. *Virology* **307**, p. 255-265.

Gaudin Y. (2000). Rabies virus-induced membrane fusion pathway. *J. Cell Biol.* **150**, p. 601-611.

Gething, MJ., Doms, RW., York, D., White, J. (1986). Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus. *J. Cell Biol.* **102**, p. 11-23.

Ghosh JK., Shai Y. (1999). Direct evidence that the N-terminal heptad repeat of sendai virus fusion protein participates in membrane fusion. *J. Mol. Biol.* **292**, p. 531-546.

Gianinazzi C.F., Raiteri E., Collesi C., Benfenati F., Cremona O. (2005). Dynamics of secretion. *Arch. Ital. Biol.* **143**, p. 133-142.

Gibbons DL., Vaney MC., Roussel A., Vigouroux A., Reilly B., Lepault J., Kielian M., Rey FA. (2004). Conformational change and protein protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature* **427**, p. 320-325.

Giraud CG., Hu C., You DQ., Slovic AM., Mosharov EV., Sulzer D., Melia TJ., Rothman JE. (2005). SNAREs can promote complete fusion and hemifusion as alternative outcomes. *J. Cell Biol.* **170**, p. 249-260.

Gordon LM., Curtain CC., Zhong YC., Kirkpatrick A., Mobley PW., Waring AJ. (1992). The Amino-Terminal Peptide of Hiv-1 Glycoprotein-41 Interacts with Human Erythrocyte-Membranes - Peptide Conformation, Orientation and Aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* **1139**, p. 257-274.

Gordon LM., Mobley PW., Pilpa R., Sherman MA., Waring AJ. (2002). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in membrane environments using C-13-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1559**, p. 96-120.

Gordon LM., Mobley PW., Lee W., Eskandari S., Kaznessis YN., Sherman MA., Waring AJ. (2004). Conformational mapping of the N-terminal peptide of HIV-1 gp41 in lipid detergent and aqueous environments using C-13-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy. *Protein Sci.* **13**, p. 1012-1030.

Gray C., Tatulian SA., Wharton SA., Tamm LK. (1996). Effect of the N-terminal glycine on the secondary structure, orientation, and interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers. *Biophys. J.* **70**, p. 2275-2286.

- Gruenke JA., Armstrong RT., Newcomb WW., Brown JC., White JM. (2002). New insights into the spring-loaded conformational change of influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* **76**, p. 4456-4466.
- Hakansson-McReynolds S., Jiang SK., Rong LJ., Caffrey M. (2006). Solution structure of the severe acute respiratory syndrome-coronavirus heptad repeat 2 domain in the prefusion state. *J. Biol. Chem.* **281**, p. 11965-11971.
- Han X., Steinhauer DA., Wharton SA., Tamm LK. (1999). Interaction of mutant influenza virus hemagglutinin fusion peptides with lipid bilayers: Probing the role of hydrophobic residue size in the central region of the fusion peptide. *Biochemistry* **38**, p. 15052-15059.
- Han X., Bushweller JH., Cafiso DS., Tamm LK. (2001) Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol.* **8**, p. 715-720.
- Haque ME., Mccoy AJ., Glenn J., Lee JK., Lentz BR. (2001) Effects of hemagglutinin fusion peptide on poly(ethylene glycol)-mediated fusion of phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* **40**, p. 14243-14251.
- Harris, F., Wallace, J., Phoenix, DA. (2000). Use of hydrophobic moment plot methodology to aid the identification of oblique orientated alpha-helices. *Mol. Membr. Biol.* **17**, p. 201-207.
- Harrison SC. (2005). Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins. *Adv. Virus Res.* **64**, p. 231-261.
- Harter C., James P., Bachi T., Semenza G., Brunner J. (1989). Hydrophobic Binding of the Ectodomain of Influenza Hemagglutinin to Membranes Occurs Through the Fusion Peptide. *J. Biol. Chem.* **264**, p. 6459-6464.
- Heap CJ., Reading SA., Dimmock NJ. (2005). An antibody specific for the C-terminal tail of the gp41 transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1 mediates post-attachment neutralization, probably through inhibition of virus-cell fusion. *J. Gen. Virol.* **86**, p. 1499-1507.
- Hernandez, LD., Hoffman, LR., Wolfsberg, TG., White, JM. (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, p. 627-661.
- Horth M., Lambrecht B., Khim MCL., Bex F., Thiriart C., Ruyschaert JM., Burny A., Brasseur R. (1991). Theoretical and Functional-Analysis of the Siv Fusion Peptide. *Embo J.* **10**, p. 2747-2755.
- Hsu CH., Wu SH., Chang DK., Chen CP. (2002). Structural characterizations of fusion peptide analogs of influenza virus hemagglutinin - Implication of the necessity of a helix-hinge-helix motif in fusion activity. *J. Biol. Chem.* **277**, p. 22725-22733.
- Hughson FM. (1995). Molecular Mechanisms of Protein-Mediated Membrane-Fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, p. 507-513.
- Hughson F.M. (1997). Enveloped viruses: A common mode of membrane fusion? *Curr. Biol.* **7**, R565-R569.

- Ingallinella P., Bianchi E., Finotto M., Cantoni G., Eckert DM., Supekar VM., Bruckmann C., Carfi A., Pessi A. (2004). Structural characterization of the fusion-active complex of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, p. 8709-8714.
- Ishiguro R., Kimura N., Takahashi S. (1993). Orientation of Fusion-Active Synthetic Peptides in Phospholipid-Bilayers - Determination by Fourier-Transform Infrared-Spectroscopy. *Biochemistry* **32**, p. 9792-9797.
- Ishiguro R., Matsumoto M., Takahashi S. (1996). Interaction of fusogenic synthetic peptide with phospholipid bilayers: Orientation of the peptide alpha-helix and binding isotherm. *Biochemistry* **35**, p. 4976-4983.
- Jahn R., Sudhof TC. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, p. 863-911.
- Jahn R., Grubmuller H. (2002). Membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, p. 488-495.
- Jahn R., Lang T., Sudhof TC. (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, p. 519-533.
- Jahnig F. (1990). Structure Predictions of Membrane-Proteins Are Not That Bad. *Trends Biochem. Sci.* **15**, p. 93-95.
- Jardetzky TS., Lamb RA. (2004). Virology - A class act. *Nature* **427**, p. 307-308.
- Jena BP. (2005). Cell secretion and membrane fusion. *Domest. Anim. Endocrinol.* **29**, p. 145-165.
- Jiang SB., Lin K., Strick N., Neurath AR. (1993). Hiv-1 Inhibition by A Peptide. *Nature* **365**, p. 113.
- Kamath S., Wong TC. (2002). Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion domain by molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* **83**, p. 135-143.
- Katsov K., Muller M., Schick M. (2004). Field theoretic study of bilayer membrane fusion. I. Hemifusion mechanism. *Biophys. J.* **87**, p. 3277-3290.
- Kemble GW., Danieli T., White JM. (1994). Lipid-Anchored Influenza Hemagglutinin Promotes Hemifusion, Not Complete Fusion. *Cell* **76**, p. 383-391.
- Kielian M. (2006). Class II virus membrane fusion proteins. *Virology* **344**, p. 38-47.
- Kilby JM., Hopkins S., Venetta TM., DiMassimo B., Cloud GA., Lee JY., Alldredge L., Hunter E., Lambert D., Bolognesi D., Mathews T., Johnson MR., Nowak MA., Shaw GM., Saag MS. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* **4**, p. 1302-1307.
- Kilby JM., Lalezari JP., Eron JJ., Carlson M., Cohen C., Arduino RC., Goodgame JC., Gallant JE., Volberding P., Murphy RL., Valentine F., Saag MS., Nelson EL., Sista PR., Dusek A. (2002). The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**, p. 685-693.

Kliger Y., Aharoni A., Rapaport D., Jones P., Blumenthal R., Shai Y. (1997). Fusion peptides derived from the HIV type 1 glycoprotein 41 associate within phospholipid membranes and inhibit cell-cell fusion - Structure-function study. *J. Biol. Chem.* **272**, p. 13496-13505.

Kobe B., Center RJ., Kemp BE., Pountourios P. (1999). Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, p. 4319-4324.

Korazim, O., Sackett, K., Shai, Y. (2006). Functional and structural characterization of HIV-1 gp41 ectodomain regions in phospholipid membranes suggests that the fusion-active conformation is extended. *J. Mol. Biol.* **364**, p. 1103-1117.

Kowalski M., Potz J., Basiripour L., Dorfman T., Wei CG., Terwilliger E., Dayton A., Rosen C., Haseltine W., Sodroski J. (1987). Functional Regions of the Envelope Glycoprotein of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1. *Science* **237**, p. 1351-1355.

Kozerski C., Ponimaskin E., Schroth-Diez B., Schmidt MFG., Herrmann A. (2000). Modification of the cytoplasmic domain of influenza virus hemagglutinin affects enlargement of the fusion pore. *J. Virol.* **74**, p. 7529-7537.

Kozlov MM., Chernomordik LV. (1998). A mechanism of protein-mediated fusion: Coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements. *Biophys. J.* **75**, p. 1384-1396.

Kozlovsky Y., Chernomordik LV., Kozlov MM. (2002). Lipid intermediates in membrane fusion: Formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys. J.* **83**, p. 2634-2651.

Kozlovsky Y., Kozlov MM. (2002). Stalk model of membrane fusion: Solution of energy crisis. *Biophys. J.* **82**, p. 882-895.

Kozlovsky Y., Efrat A., Siegel DA., Kozlov MM. (2004). Stalk phase formation: Effects of dehydration and saddle splay modulus. *Biophys. J.* **87**, p. 2508-2521.

Kuzmin PI., Zimmerberg J., Chizmadzhev YA., Cohen FS. (2001) A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, p. 7235-7240.

Lambert G., Decout A., Vanloo B., Rouy D., Duverger N., Kalopissis A., Vadekerckhove J., Chambaz J., Brasseur R., Rosseneu M. (1998). The C-terminal helix of human apolipoprotein AII promotes the fusion of unilamellar liposomes and displaces apolipoprotein AI from high-density lipoproteins. *Eur. J. Biochem.* **253**, p. 328-338.

Lee J., Lentz BR. (1998). Secretory and viral fusion may share mechanistic events with fusion between curved lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, p. 9274-9279.

Lentz BR. (2006). Seeing is believing: The stalk intermediate. *Biophys. J.* **91**, p. 2747-2748.

Lindau M., Almers W. (1995). Structure and Function of Fusion Pores in Exocytosis and Ectoplasmic Membrane-Fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, p. 509-517.

- Lins L., Charloreaux B., Thomas A., Brasseur R. (2001) Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: Towards a comprehensive view of tilted peptides. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **44**, p. 435-447.
- Lins L., Flore C., Chapelle L., Talmud PJ., Thomas A., Brasseur R. (2002). Lipid-interacting properties of the N-terminal domain of human apolipoprotein C-III. *Protein Eng.* **15**, p. 513-520.
- Lins L., Charloreaux B., Heinen C., Thomas A., Brasseur R. (2006). "De novo" design of peptides with specific lipid-binding properties. *Biophys. J.* **90**, p. 470-479.
- Longo FJ., Yanagimachi R. (1993). Detection of Sperm-Egg Fusion. *Methods in Enzymology* **221**, p. 249-260.
- Longo ML., Waring AJ., Hammer DA. (1997). Interaction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers: Area expansion and permeation. *Biophys. J.* **73**, p. 1430-1439.
- Longo ML., Waring AJ., Gordon LM., Hammer DA. (1998). Area expansion and permeation of phospholipid membrane bilayers by influenza fusion peptides and melittin. *Langmuir* **14**, p. 2385-2395.
- Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., Brasseur, R. (2004). Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **8**, p. 163-176.
- Lorin A., Thomas A., Stroobant V., Brasseur R., Lins L. (2006). Lipid-destabilising properties of a peptide with structural plasticity. *Chem. Phys. Lipids* **141**, p. 185-196.
- Lorin, A., Lins, L., Stroobant, V., Brasseur, R., and Charloreaux, B. (2007). Determination of the minimal fusion peptide of bovine leukemia virus gp30. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.182.
- Lou ZY., Xu YH., Xiang K., Su N., Qin L., Li X., Gao GF., Bartlam M., Rao ZH. (2006). Crystal structures of Nipah and Hendra virus fusion core proteins. *Febs Journal* **273**, p. 4538-4547.
- Lu M., Blacklow SC., Kim PS. (1995). A Trimeric Structural Domain of the Hiv-1 Transmembrane Glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* **2**, p. 1075-1082.
- Luneberg J., Martin I., Nussler F., Ruyschaert JM., Herrmann A. (1995). Structure and Topology of the Influenza-Virus Fusion Peptide in Lipid Bilayers. *J. Biol. Chem.* **270**, p. 27606-27614.
- Macosko JC., Kim C.H., Shin YK. (1997). The membrane topology of the fusion peptide region of influenza hemagglutinin determined by spin-labeling EPR. *J. Mol. Biol.* **267**, p. 1139-1148.
- Maddox MW., Longo ML. (2002). A Monte Carlo study of peptide insertion into lipid bilayers: Equilibrium conformations and insertion mechanisms. *Biophys. J.* **82**, p. 244-263.

- Malashkevich VN., Schneider BJ., McNally ML., Milhollen MA., Pang JX., Kim PS. (1999). Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-angstrom resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, p. 2662-2667.
- Malashkevich VN., Singh M., Kim PS. (2001) The trimer-of-hairpins motif in membrane fusion: Visna virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, p. 8502-8506.
- Marrink SJ., Mark AE. (2004). Molecular view of hexagonal phase formation in phospholipid membranes. *Biophys. J.* **87**, p. 3894-3900.
- Martin I., Defrisequertain F., Decroly E., Vandenbranden M., Brasseur R., Ruyschaert JM. (1993). Orientation and Structure of the Nh2-Terminal Hiv-1 Gp41 Peptide in Fused and Aggregated Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1145**, p. 124-133.
- Martin I., Dubois MC., Defrisequertain F., Saermark T., Burny A., Brasseur R., Ruyschaert JM. (1994). Correlation Between Fusogenicity of Synthetic Modified Peptides Corresponding to the Nh2-Terminal Extremity of Simian Immunodeficiency Virus Gp32 and Their Mode of Insertion Into the Lipid Bilayer - An Infrared-Spectroscopy Study. *J. Virol.* **68**, p. 1139-1148.
- Martin I., Dubois MC., Defrisequertain F., Saermark T., Burny A., Brasseur R., Ruyschaert JM. (1994). Correlation Between Fusogenicity of Synthetic Modified Peptides Corresponding to the Nh2-Terminal Extremity of Simian Immunodeficiency Virus Gp32 and Their Mode of Insertion Into the Lipid Bilayer - An Infrared-Spectroscopy Study. *J. Virol.* **68**, p. 1139-1148.
- Martin I., Schaal H., Scheid A., Ruyschaert JM. (1996). Lipid membrane fusion induced by the human immunodeficiency virus type 1 gp41 N-terminal extremity is determined by its orientation in the lipid bilayer. *J. Virol.* **70**, p. 298-304.
- Martin I., Ruyschaert JM., Epanand RM. (1999). Role of the N-terminal peptides of viral envelope proteins in membrane fusion. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **38**, p. 233-255.
- Melikyan GB., White JM., Cohen FS. (1995). Gpi-Anchored Influenza Hemagglutinin Induces Hemifusion to Both Red-Blood-Cell and Planar Bilayer-Membranes. *J. Cell Biol.* **131**, p. 679-691.
- Melikyan GB., Markosyan RM., Roth MG., Cohen FS. (2000). A point mutation in the transmembrane domain of the hemagglutinin of influenza virus stabilizes a hemifusion intermediate that can transit to fusion. *Mol. Biol. Cell.* **11**, p. 3765-3775.
- Mingeot-Leclercq MP., Lins L., Bensliman M., Van Bambeke F., Van der Smissen P., Peuvot J., Schanck A., Brasseur R. (2002). Membrane destabilization induced by beta-amyloid peptide 29-42: Importance of the amino-terminus. *Chem. Phys. Lipids* **120**, p. 57-74.
- Mingeot-Leclercq MP., Lins L., Bensliman M., Thomas A., Van Bambeke F., Peuvot J., Schanck A., Brasseur R. (2003). Piracetam inhibits the lipid-destabilising effect of the amyloid peptide A beta C-terminal fragment. *Biochim. Biophys. Acta* **1609**, p. 28-38.
- Minor DL., Kim PS. (1996). Context-dependent secondary structure formation of a designed protein sequence. *Nature* **380**, p. 730-734.

- Mobley PW., Curtain CC., Kirkpatrick A., Rostamkhani M., Waring AJ., Gordon LM. (1992). The Amino-Terminal Peptide of Hiv-1 Glycoprotein-41 Lyses Human Erythrocytes and Cd4+ Lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1139**, p. 251-256.
- Mobley PW., Waring AJ., Sherman MA., Gordon LM. (1999). Membrane interactions of the synthetic N-terminal peptide of HIV-1 gp41 and its structural analogs. *Biochim. Biophys. Acta* **1418**, p. 1-18.
- Monck JR., Fernandez JM. (1996). The fusion pore and mechanisms of biological membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, p. 524-533.
- Morris KF., Gao XF., Wong TC. (2004). The interactions of the HIV gp41 fusion peptides with zwitterionic membrane mimics determined by NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, p. 67-81.
- Nguyen NQN., Tabruyn SP., Lins L., Lion M., Cornet AM., Lair F., Rentier-Delrue F., Brasseur R., Martial JA., Struman I. (2006). Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, p. 14319-14324.
- Nieva JL., Nir S., Muga A., Goni FM., Wilschut J. (1994). Interaction of the Hiv-1 Fusion Peptide with Phospholipid-Vesicles - Different Structural Requirements for Fusion and Leakage. *Biochemistry* **33**, p. 3201-3209.
- Nieva JL., Agirre A. (2003). Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion? *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, p. 104-115.
- Nir S., Nieva JL. (2000). Interactions of peptides with liposomes: pore formation and fusion. *Prog. Lipid Res.* **39**, p. 181-206.
- Noguchi H., Takasu M. (2002). Adhesion of nanoparticles to vesicles: A Brownian dynamics simulation. *Biophys. J.* **83**, p. 299-308.
- Pecheur EI., Martin I., Bienvenue A., Ruysschaert JM., Hoekstra D. (2000). Protein-induced fusion can be modulated by target membrane lipids through a structural switch at the level of the fusion peptide. *J. Biol. Chem.* **275**, p. 3936-3942.
- Peisajovich SG., Shai Y. (2002). New insights into the mechanism of virus-induced membrane fusion. *Trends Biochem. Sci.* **27**, p. 183-190.
- Peisajovich SG., Shai Y. (2003). Viral fusion proteins: multiple regions contribute to membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, p. 122-129.
- Pereira FB., Goni FM., Nieva JL. (1995). Liposome Destabilization Induced by the Hiv-1 Fusion Peptide Effect of A Single Amino-Acid Substitution. *Febs Lett.* **362**, p. 243-246.
- Pereira FB., Goni FM., Muga A., Nieva JL. (1997). Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: Dose and sequence effects. *Biophys. J.* **73**, p. 1977-1986.
- Pereira FB., Valpuesta JM., Basanez G., Goni FM., Nieva JL. (1999). Interbilayer lipid mixing induced by the human immunodeficiency virus type-1 fusion peptide on large

unilamellar vesicles: the nature of the nonlamellar intermediates. *Chem. Phys. Lipids* **103**, p. 11-20.

Perez-Mendez O., Vanloo B., Decout A., Goethals M., Peelman F., Vandekerckhove J., Brasseur R., Rosseneu M. (1998). Contribution of the hydrophobicity gradient of an amphipathic peptide to its mode of association with lipids. *Eur. J. Biochem.* **256**, p. 570-579.

Peuvot J., Schanck A., Lins L., Brasseur R. (1999). Are the fusion processes involved in birth, life and death of the cell depending on tilted insertion of peptides into membranes? *J. Theor. Biol.* **198**, p. 173-181.

Phoenix DA., Harris F. (2002). The hydrophobic moment and its use in the classification of amphiphilic structures (Review). *Mol. Membr. Biol.* **19**, p. 1-10.

Phoenix DA., Harris F., Daman OA., Wallace J. (2002). The prediction of amphiphilic alpha-helices. *Curr. Protein Pept. Sci.* **3**, p. 201-221.

Pillot T., Goethals M., Vanloo B., Talussot C., Brasseur R., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Lins L. (1996). Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* **271**, p. 28757-28765.

Pillot, T., Lins, L., Goethals, M., Vanloo, B., Baert, J., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M., Brasseur, R. (1997). The 118-135 Peptide of the Human Prion Protein forms Amyloid Fibrils and Induces Liposome Fusion. *J. Mol. Biol.* **274**, p. 381-393.

Pillot T., Drouet B., Queille S., Labeur C., Vandekerckhove J., Rosseneu M., Pincon-Raymond M., Chambaz J. (1999). The nonfibrillar amyloid beta-peptide induces apoptotic neuronal cell death: Involvement of its C-terminal fusogenic domain. *J. Neurochem.* **73**, p. 1626-1634.

Pillot T., Drouet B., Pincon-Raymond RL., Vandekerckhove J., Rosseneu T., Chambaz J. (2000). A nonfibrillar form of the fusogenic prion protein fragment [118-135] induces apoptotic cell death in rat cortical neurons. *J. Neurochem.* **75**, p. 2298-2308.

Plassmeyer ML., Soldan SS., Stachelek KM., Martin-Garcia J., Gonzalez-Scarano F. (2005). California serogroup, GC (GI) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virology* **338**, p. 121-132.

Pritsker M., Rucker J., Hoffman TL., Doms RW., Shai Y. (1999). Effect of nonpolar substitutions of the conserved Phe(11) in the fusion peptide of HIV-1 gp41 on its function, structure, and organization in membranes. *Biochemistry* **38**, p. 11359-11371.

Qiao H., Armstrong RT., Melikyan GB., Cohen FS., White JM. (1999). A specific point mutant at position 1 of the influenza hemagglutinin fusion peptide displays a hemifusion phenotype. *Mol. Biol. Cell.* **10**, p. 2759-2769.

Rafalski M., Lear JD., Degrado WF. (1990). Phospholipid Interactions of Synthetic Peptides Representing the N-Terminus of Hiv Gp41. *Biochemistry* **29**, p. 7917-7922.

Rafalski M., Ortiz A., Rockwell A., Vanginkel LC., Lear JD., Degrado WF., Wilschut J. (1991). Membrane-Fusion Activity of the Influenza-Virus Hemagglutinin - Interaction of Ha2 N-Terminal Peptides with Phospholipid-Vesicles. *Biochemistry* **30**, p. 10211-10220.

Rahman M., Lins L., ThomasSoumarmon A., Brasseur R. (1997). Are amphipathic asymmetric peptides ubiquitous structures for membrane destabilisation? *Journal of Molecular Modeling* **3**, p. 203-215.

Rapaport D., Shai Y. (1994). Interaction of Fluorescently Labeled Analogs of the Amino-Terminal Fusion Peptide of Sendai Virus with Phospholipid-Membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, p. 15124-15131.

Ravault S., Soubias O., Saurel O., Thomas A., Brasseur R., Milon A. (2005). Fusogenic Alzheimer's peptide fragment A beta (29-42) in interaction with lipid bilayers: Secondary structure, dynamics, and specific interaction with phosphatidyl ethanolamine polar heads as revealed by solid-state NMR. *Protein Sci.* **14**, p. 1181-1189.

Reese C., Heise F., Mayer A. (2005). Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion. *Nature* **436**, p. 410-414.

Rey FA., Heinz FX., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C. (1995). The Envelope Glycoprotein from Tick-Borne Encephalitis-Virus at 2 Angstrom Resolution. *Nature* **375**, p. 291-298.

Roche S., Rey FA., Gaudin Y., Bressanelli S. (2007). Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **315**, p. 843-848.

Rodriguezcrespo I., Nunez E., Gomezgutierrez J., Yelamos B., Albar JP., Peterson DL., Gavilanes F. (1995). Phospholipid Interactions of the Putative Fusion Peptide of Hepatitis-B Virus Surface-Antigen S-Protein. *J. Gen. Virol.* **76**, p. 301-308.

Rothenberg SM., Olsen MN., Laurent LC., Crowley RA., Brown PO. (2001) Comprehensive mutational analysis of the moloney murine leukemia virus envelope protein. *J. Virol.* **75**, p. 11851-11862.

Rothman JE. (1994). Mechanism of Intracellular Protein-Transport. *Nature* **372**, p. 55-63.

Russell CJ., Jardetzky TS., Lamb RA. (2001). Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *Embo J.* **20**, p. 4024-4034.

Russell, CJ., Jardetzky, TS., and Lamb, RA. (2004). Conserved glycine residues in the fusion peptide of the paramyxovirus fusion protein regulate activation of the native state. *J. Virol.* **78**, p. 13727-13742.

Sackett K., Shai Y. (2002). The HIV-1 gp41 N-terminal heptad repeat plays an essential role in membrane fusion. *Biochemistry* **41**, p. 4678-4685.

Sackett K., Shai Y. (2003). How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain. *J. Mol. Biol.* **333**, p. 47-58.

Sackett K., Shai Y. (2005). The HIV fusion peptide adopts intermolecular parallel beta-sheet structure in membranes when stabilized by the adjacent N-terminal heptad repeat: A C-13 FTIR study. *J. Mol. Biol.* **350**, p. 790-805.

Saez-Cirion A., Nieva JL. (2002). Conformational transitions of membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**, p. 57-65.

- Saez-Cirion A., Nieva JL., Gallaher WR. (2003). The hydrophobic internal region of bovine prion protein shares structural and functional properties with HIV type 1 fusion peptide. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **19**, p. 969-978.
- Schaal H., Klein M., Gehrman P., Adams O., Scheid A. (1995). Requirement of N-Terminal Amino-Acid-Residues of Gp41 for Human-Immunodeficiency-Virus Type 1-Mediated Cell-Fusion. *J. Virol.* **69**, p. 3308-3314.
- Schibli DJ., Weissenhorn W. (2004). Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion (Review). *Mol. Membr. Biol.* **21**, p. 361-371.
- Schoch C., Blumenthal R. (1993). Role of the Fusion Peptide Sequence in Initial-Stages of Influenza Hemagglutinin-Induced Cell-Fusion. *J. Biol. Chem.* **268**, p. 9267-9274.
- Schroth-Diez, B., Ludwig, K., Baljinnyam, B., Kozerski, C., Huang, Q., Herrmann, A. (2000). The Role of the Transmembrane and of the Intraviral Domain of Glycoproteins in Membrane Fusion of Enveloped Viruses. *Biosci. Rep.* **20**, p. 571-595.
- Schwarz G., Taylor SE. (1999). Polymorphism and interactions of a viral fusion peptide in a compressed lipid monolayer. *Biophys. J.* **76**, p. 3167-3175.
- Shai, Y. Functional domains within fusion proteins: prospectives for development of peptide inhibitors of viral cell fusion. (2000). *Biosci. Rep.* **20**, p. 535-555.
- Shome SG., Kielian M. (2001) Differential roles of two conserved glycine residues in the fusion peptide of Semliki Forest Virus. *Virology* **279**, p. 146-160.
- Siegel DP. (1993). Stalk Structures As Intermediates in Membrane-Fusion and Bilayer Nonbilayer Phase-Transitions. *Biophys. J.* **64**, p. 2124-2140.
- Siegel DP. (1999). The modified stalk mechanism of lamellar/inverted phase transitions and its implications for membrane fusion. *Biophys. J.* **76**, p. 291-313.
- Siegel DP., Epand RM. (2000). Effect of influenza hemagglutinin fusion peptide on lamellar/inverted phase transitions in dipalmitoleoylphosphatidylethanolamine: implications for membrane fusion mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **1468**, p. 87-98.
- Skehel JJ., Wiley DC. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, p. 531-569.
- Skehel JJ., Cross K., Steinhauer D., Wiley D.C. (2001) Influenza fusion peptides. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, p. 623-626.
- Slepushkin VA., Andreev SM., Sidorova MV., Melikyan GB., Grigoriev VB., Chumakov VM., Grinfeldt AE., Manukyan RA., Karamov EV. (1992). Investigation of Human-Immunodeficiency-Virus Fusion Peptides - Analysis of Interrelations Between Their Structure and Function. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**, p. 9-18.
- Smeijers AF., Markvoort AJ., Pieterse K., Hilbers PAJ. (2006). A detailed look at vesicle fusion. *J. Phys. Chem. B* **110**, p. 13212-13219.

- Sollner TH. (2004). Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, p. 429-435.
- Stegmann T., Doms RW., Helenius A. (1989). Protein-Mediated Membrane-Fusion. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, p. 187-211.
- Stegmann T., Delfino JM., Richards FM., Helenius A. (1991). The Ha2 Subunit of Influenza Hemagglutinin Inserts Into the Target Membrane Prior to Fusion. *J. Biol. Chem.* **266**, p. 18404-18410.
- Stegmann T. (2000). Membrane fusion mechanisms: The influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* **1**, p. 598-604.
- Steinhauer DA., Wharton SA., Skehel JJ., Wiley DC. (1995). Studies of the Membrane-Fusion Activities of Fusion Peptide Mutants of Influenza-Virus Hemagglutinin. *J. Virol.* **69**, p. 6643-6651.
- Takahashi S. (1990). Conformation of Membrane Fusion-Active 20-Residue Peptides with Or Without Lipid Bilayers - Implication of Alpha-Helix Formation for Membrane-Fusion. *Biochemistry* **29**, p. 6257-6264.
- Tamm, LK., Han, X., Li, Y., and Lai, AL. (2002). Structure and Function of membrane fusion peptides. *Biopolymers* **66**, p. 249-260.
- Thomas A., Brasseur R. (2006). Tilted peptides: The history. *Curr. Protein Pept. Sci.* **7**, p. 523-527.
- Towler MC., Kaufman SJ., Brodsky FM. (2004). Membrane traffic in skeletal muscle. *Traffic* **5**, p. 129-139.
- Tsurudome M., Gluck R., Graf R., Falchetto R., Schaller U., Brunner J. (1992). Lipid Interactions of the Hemagglutinin Ha2 Nh2-Terminal Segment During Influenza Virus-Induced Membrane-Fusion. *J. Biol. Chem.* **267**, p. 20225-20232.
- Voneche V., Portelle D., Kettmann R., Willems L., Limbach K., Paoletti E., Ruyschaert JM., Burny A., Brasseur R. (1992). Fusogenic Segments of Bovine Leukemia-Virus and Simian Immunodeficiency Virus Are Interchangeable and Mediate Fusion by Means of Oblique Insertion in the Lipid Bilayer of Their Target-Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, p. 3810-3814.
- Weissenhorn W., Dessen A., Harrison SC., Skehel JJ., Wiley DC. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, p. 426-430.
- Weissenhorn W., Calder LJ., Wharton SA., Skehel JJ., Wiley DC. (1998). The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, p. 6032-6036.
- Wharton SA., Martin SR., Ruigrok RWH., Skehel JJ., Wiley DC. (1988). Membrane-Fusion by Peptide Analogs of Influenza-Virus Hemagglutinin. *J. Gen. Virol.* **69**, p. 1847-1857.
- White JM. (1990). Viral and Cellular Membrane-Fusion Proteins. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, p. 675-697.

White JM. (1992). Membrane-Fusion. *Science* **258**, p. 917-924.

Wild CT., Shugars DC., Greenwell TK., Mcdanal CB., Matthews TJ. (1994). Peptides Corresponding to A Predictive Alpha-Helical Domain of Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Gp41 Are Potent Inhibitors of Virus-Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, p. 9770-9774.

Wilson IA., Skehel JJ., Wiley DC. (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**, p. 366-373.

Wong TC. (2003). Membrane structure of the human immunodeficiency virus gp41 fusion peptide by molecular dynamics simulation II. The glycine mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1609**, p. 45-54.

Xu YB., Zhang F., Su ZL., Mcnew JA., Shin YK. (2005). Hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, p. 417-422.

Xu YH., Lou ZY., Liu YW., Cole DK., Su N., Qin L., Li X., Bai ZH., Rao ZH., Gao GF. (2004). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the fusion core from two new zoonotic paramyxoviruses, Nipah virus and Hendra virus. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, p. 1161-1164.

Xu YH., Lou ZY., Liu YW., Pang H., Tien P., Gao GF., Rao ZH. (2004). Crystal structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein fusion core. *J. Biol. Chem.* **279**, p. 49414-49419.

Yagnik AT., Lahm A., Meola A., Roccasecca RM., Ercole BB., Nicosia A., Tramontano A. (2000). A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **40**, p. 355-366.

Yang J., Gabrys CM., Weliky DP. (2001) Solid-state nuclear magnetic resonance evidence for an extended beta strand conformation of the membrane-bound HIV-1 fusion peptide. *Biochemistry* **40**, p. 8126-8137.

Yang L., Huang H.W. (2002). Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* **297**, p. 1877-1879.

Yeagle PL., Epand RM., Richardson CD., Flanagan TD. (1991). Effects of the Fusion Peptide from Measles-Virus on the Structure of N-Methyl Dioleoylphosphatidylethanolamine Membranes and Their Fusion with Sendai Virus. *Biochim. Biophys. Acta* **1065**, p. 49-53.

Yin H.S., Paterson R.G., Wen X.L., Lamb RA., Jardetzky TS. (2005). Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, p. 9288-9293.

Yin H.S., Wen X.L., Paterson R.G., Lamb RA., Jardetzky TS. (2006). Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature* **439**, p. 38-44.

Zaitseva E., Mittal A., Griffin D.E., Chernomordik L.V. (2005). Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins. *J. Cell Biol.* **169**, p. 167-177.

Zhang G., Chen YH. (2003). ELDKWA-epitope-specific monoclonal antibodies inhibit HIV env-mediated syncytium formation. *Immunobiology* **207**, p. 259-264.

Zhao X., Singh M., Malashkevich VN., Kim PS. (2000). Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, p. 14172-14177.

Zheng Q., Deng YQ., Liu J., van der Hoek L., Berkhout B., Lu M. (2006). Core structure of S2 from the human coronavirus NL63 spike Glycoprotein. *Biochemistry* **45**, p. 15205-15215.

Zhu NL., Cannon PM., Chen DG., Anderson WF. (1998). Mutational analysis of the fusion peptide of Moloney murine leukemia virus transmembrane protein p15E. *J. Virol.* **72**, p. 1632-1639.

Wild C., Oas T., Mcdanal C., Bolognesi D., Matthews T. (1992). A Synthetic Peptide Inhibitor of Human-Immunodeficiency-Virus Replication - Correlation Between Solution Structure and Viral Inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, p. 10537-10541.

Virus répertoriés selon leur familles virales	Glycoprotéine associée	Entrée SwissProt	Loc.	Séquence des peptides de fusion
Orthomyxoviridae				
Influenza A virus (A/Aichi/2/68)	Hémagglutinine (HA)	P03437	346	G L F G A I A G F I E N G W E G M I D G W Y G F
Influenza A virus (A/Hong Kong/157/1997 H5N1)	Hémagglutinine (HA)	O56140	347	G L F G A I A G F I E G G W Q G M I D G W Y G Y
Influenza A virus (Japan/305/57)	Hémagglutinine (HA)	P03451	341	G L F G A I A G F I E G G W Q G M V D G W Y G Y
Influenza B virus (B/Beijing/1/87)	Hémagglutinine (HA)	P17504	363	G F F G A I A G F I E G G W E G M I A G W H G Y Y
Influenza C virus (C/California/78)	Hémagglutinine (HA)	P03465	346	I F G I D D L I I G L L F V A I V E A G I G G Y
Paramyxoviridae				
Canine Distemper Virus (Onderstepoort)	Protéine F1	P12569	225	F A G V V L A G V A L G V A T A A Q I T A G I A
Measles Virus (ALK-C)	Protéine F1	P35973	113	F A G V V L A G A A L G V A T A A Q I T A G I A
Mumps virus (SBL)	Protéine F1	P33481	103	F A G V V L A G A A L G V A T A A Q I T A G I A
Rinderspest virus (L)	Protéine F1	P10864	109	F A G V V L A G A A L G V A T A A Q I T A G I A
Bovine Respiratory Syncytial Virus (A51908)	Protéine F1	P29791	137	F L G F L L G I G S A A S G V A V S K V L H L
Newcastle Disease Virus (Australia-Victoria/32)	Protéine F1	P12572	117	F I G A I I G S V A L G V A T A A Q I T A A S I A
Human Parainfluenza 1 Virus (C39)	Protéine F1	P12605	113	F A G I A I G I A A L G V A T A A Q I T A G I A
Human Parainfluenza 3 Virus (NIH 47885)	Protéine F1	P06828	110	F A G I A I G I A A L G V A T A A Q I T A G I A
Bovine Parainfluenza 3 Virus	Protéine F1	P09990	110	F F G E I I G T I A I G I A T S A Q I T A A V A
Human Respiratory Syncytial Virus (B/18537)	Protéine F1	P13843	137	F L G F L L G V G S A I A S G I A V S K V L H L
Pneumonia Virus of Mice (15)	Protéine F1	P35949	102	F L G L I L G L G A A V T A G V A L A K T V Q
Simian Virus 41	Protéine F1	P25181	103	F A G V V I G L A A L G V A T A A Q V T A A V A
Simian Virus 5 (W3)	Protéine F1	P04849	103	F A G V V I G L A A L G V A T A A Q V T A A V A
Turkey Rhinotracheitis Virus	Protéine F1	P24614	103	F V L G A I A L G V A T A A A V T A G V A L A K
Sendai Virus (Fushimi)	Protéine F1	P12575	117	F F G A V I G T I A L G V A T S A Q I T A G I A
Hendra Virus	Protéine F1	O89342	110	L A G V V M A G I A I G I A T A A Q I T A A V A
Nipah Virus	Protéine F1	Q9IH63	110	L A G V I M A G V A I G I A T A A Q I T A A V A
Filoviridae				
Ebola (Zaire/Eckron-76) *	Protéine GP2	P87671	524	G A A I G L A W I P Y F G P A A E G I Y T E G L
Marburg (Popp 67) *	Protéine GP2	P35254	525	D L A A G L S W I P F F G P G I E G L Y T A V L
Coronaviridae				
Virus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère *	Protéine S2	P59594	770	M Y K T P T L K Y F G G F N F S Q I L P D P F L
Human Coronavirus (strain NL63) *	Protéine S2	Q6G1S2	839	A F S L A N V T S F G D Y N L S S V L P Q R N I
Retroviridae				
Murine Leukemia Retrovirus (isolate 57)	p15E	P03390	480	E P V S L T L A L L L G G L T M G G I A A G V G
Feline Leukemia Virus (Strain A/Glasgow-1)	p15E	P08359	446	E P I S L T V A L M L G G L T V G G I A A G V G
Gibbon Ape Leukemia Virus	p15E	P21415	490	E A V S L T L A V L L G L G I T A G I G T G S T
Mink Cell Focus-Forming Murine Leukemia Virus	p15E	P15073	441	E P V S L T L A L L L G G L T M G G I A A G V G
Sheep Pulmonary Adenomatosis Virus	gp36	P31621	379	G L S L I I L G I V S L I T L I A T A V T A C V
Squirrel Monkey Retrovirus (SMRV-H)	gp20	P21412	387	A V T L I P L V G L G V S T A V A T G T A G L
Simian Mason-Pfizer Virus	gp20	P07575	395	A I Q L I P L F V G L G I T T A V S T G A A G L
Simian Retrovirus SRV-1	gp20	P04027	396	A I Q F I P L V I G L G I T T A V S T G T A G L
Avian reticuloendotheliosis virus	gp22	P03399	396	A V Q F I P L V G L G I T G A T L A G G T G L
Mouse Mammary Tumor Virus (BR6)	gp36	P10259	456	F V A A I I L G I S A L I A I I T S F A V A T T
Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (ATK)	gp21	P03381	313	A V P V A V W L V S A L A M G A G V A G G I T G
Human T-Cell Leukemia Virus Type 2	gp21	P03383	309	A V P I A V W L V S A L A A G T G I A G G V T G
Bovine Leukemia Virus (Belgium LB285)	gp30	P25506	302	S P A A A L T L G L A L S V G L T G I N V A V S
Virus de l'Immunodéficience Humaine de Type 1 (HXB2)	gp41	P04578	510	A V G I G A L F L G F L G A A G S T M G A V S L
Virus de l'Immunodéficience Humaine de Type 2 (BEN A)	gp41	P18094	501	G V F V L G F L G F L A T A G S A M G A R S L T
Virus de l'Immunodéficience Simienne (AGM-155)	gp32	P27757	535	V P F V L G F L G F L G A A G T A M G A A A T A
Bovine Immunodeficiency Virus (127)	gp40	P19557	556	A V G L A I F L L V L A I M A I T S S L V A A T
Equine Infectious Anemia Virus (P3.2-1)	gp45	P22427	446	F G I S A I V A A I V A A T A I A R S A T M S Y
Feline Immunodeficiency Virus (Petaluma)	gp36	P16090	612	A A I H V M L A L A T V L S T A G A G T G A T A
Caprine Arthritis Encephalitis Virus (Cork)	gp38	P31626	633	G V G L V I M L V I M A I V A A A G A S L G V A
Visna Lentivirus (1514)	gp46	P03379	657	G I G L V I V L A I M A I I A A A G A G L G V A
Hepadnaviridae				
Virus de l'Hépatite B (Hôte : humain) **	Protéine S	ADA856	175	M E N I T S G E L G P L L V L Q A G F F L L T R
Virus de l'Hépatite B (Hôte : canard) **	Protéine S	Q6QJC6	164	M S G T F G G I L A G L I G L L V S F F L L I K
Virus de l'Hépatite B (Hôte : marmotte) **	Protéine S	P03143	205	M S P S S L L G L L A G L Q V V Y F L W T K I L

Tableau 1

Légende du tableau :

Tableau 1 : Séquences de peptides de fusion de différentes glycoprotéines de classe 1. Adapté de Del Angel et al. (2002). La souche du virus, lorsqu'elle est connue, est notée entre parenthèse. Pour les virus de la famille Hepadnaviridae, l'hôte naturel des virus est notée entre parenthèse. La séquence des peptides de fusion a été limitée à 24 résidus. La troisième colonne (Entrée Swissprot) correspond au code fourni à la glycoprotéine dans SwissProt (<http://us.expasy.org/sprot>). La quatrième colonne (loc.) indique la localisation du premier résidu du peptide de fusion dans la séquence protéique. Les résidus hydrophobes (L, F, I, W, M, Y, V, P, C) sont notés en blanc sur fond noir, les résidus glycines (G) sont notés en blanc sur fond gris foncé, les petits résidus à l'exception des glycines (A, T, S) sont notés en noir sur fond gris clair, les résidus hydrophiles (E, N, D, Q, H, R, K) sont notés en noir sur fond blanc. La séquence GFLG des peptides de fusion des virus VIH-1, VIH-2, SIV et de l'Hépatite B humaine est soulignée.

* Les peptides de fusion des familles virales Filoviridae et Coronaviridae n'ont pas été détectés en extrémité N-terminale mais à proximité de cette extrémité. Les peptides de fusion des virus Ebola, Marburg, SRAS et Human Coronavirus débutent respectivement à partir du résidu 22, 26, 102, 121 de leur glycoprotéine associée.

** Aucune structure n'est connue à l'heure actuelle concernant les glycoprotéines de cette famille virale. Toutefois, les prédictions de structure secondaire (via NPS@ <http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) et la localisation des peptides de fusion en N-terminal suggèrent que ses glycoprotéines sont de classe I.

Sequences of fusion peptides of different class I viral glycoproteins. Adapted from Del Angel et al. (2002). The stain of viruses is noted between brackets. For Hepadnaviridae viruses, the natural host is noted between brackets. The sequence of fusion peptides is limited to 24 residues. The third column (entrée Swissprot) corresponds to the SwissProt code (<http://us.expasy.org/sprot>). The fourth column (loc.) indicates the location of the fusion peptide first residue in the protein sequence. Hydrophobic residues (L, F, I, W, M, Y, V, P, C) are white on black shade, glycine residues (G) are white on gray shade, small residues except glycine (A, T, S) are black on gray shade and hydrophilic residues (E, N, D, Q, H, R, K) are black on white shade. The GFLG sequence of fusion peptides of HIV-1, HIV-2, SIV and Human Hepatitis B virus is underlined.

** Fusion peptides of Filoviridae and Coronaviridae families are not in the N-terminal extremity but at proximity. Fusion peptide of Ebola, Marburg, SARS and Human Coronavirus begin respectively from residues 22, 26, 102, 121 of their glycoprotein.*

*** For the moment, no structure is known for glycoprotein of this viral family. However, secondary structure predictions (with NPS@ <http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) and fusion peptide location at the N-terminal extremity suggest that these glycoproteins are of class I. .*

Légende des figures :

Figure 1 : Description de la fusion membranaire selon l'hypothèse du pore lipidique. L'implication des glycoprotéines de fusion virales de classe I lors de la fusion tient compte du modèle « jackknife ». Pour simplifier, un seul trimère de glycoprotéines est représenté. Les hélices N des glycoprotéines sont représentées en noir alors que les hélices C sont représentées en blanc. La membrane plasmique est située en haut, l'enveloppe virale est située en bas. Les têtes polaires des lipides des monocouches externes de la membrane plasmique et de l'enveloppe virale sont noires. Les têtes polaires des lipides des monocouches internes de la membrane plasmique et de l'enveloppe virale sont blanches. Au niveau de l'intermédiaire « stalk », la courbure négative des monocouches internes fusionnées est indiquée. Au niveau du pore de fusion, la courbure positive des monocouches internes fusionnées est indiquée.

1 : glycoprotéines de fusion virales sous conformation pré-fusion ; 2 : glycoprotéines de fusion virales sous conformation étirée ; 3 : glycoprotéines de fusion virales sous conformation post-fusion.

Membrane fusion description according to the lipidic pore hypothesis. The implication of class I viral fusion glycoproteins during the fusion takes into account the « jackknife » model. To simplify, only one glycoprotein trimer is shown. N helices of glycoproteins are in black, C helices are in white. The plasmic membrane is at the top, the viral envelope is at the bottom. Lipids headgroups of external monolayers are in black, lipids headgroups of internal monolayers are in white. The negative curvature of external monolayers of stalk and the positive curvature of internal monolayers of the fusion pore are indicated.

1 : pre-fusion conformation of fusion glycoproteins; 2 : elongated conformation of fusion glycoproteins; 3 : post-fusion conformation of fusion glycoproteins.

Figure 2 : A. structures de l'ectodomain des glycoprotéines de fusion de classe II des virus Semliki Forest (membre des alphavirus) et Tick-Borne Encephalitis (membre des flavivirus). Ces structures sont reprises dans la banque de données de protéines (Protein Data Bank : <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) sous le code d'accès 2ALA (Virus Semliki Forest) et 1URZ (Virus Tick-Borne Encephalitis) ; B : structures de l'ectodomain des glycoprotéines de fusion de classe I des virus. Les hélices N-terminales sont noircies, les hélices C-terminales sont grisées. A gauche : conformation pré-fusion des ectodomains des glycoprotéines de fusion des virus Influenza A (code PDB : 2HMG), SV5 (code PDB : 2B9B) et du SRAS (code PDB : 2FXP). A droite : conformation post-fusion des ectodomains de ces mêmes glycoprotéines (code d'accès PDB : 1HTM, 1SVF et 1WNC respectivement pour les structures des virus Influenza A, SV5 et du SRAS) ainsi que des glycoprotéines de fusion des virus VIH-1 (code PDB : 1ENV), HRSV (code PDB : 1G2C) et Ebola (code PDB : 1EBO). C : Conformation pré-fusion, étirée et post-fusion de l'ectodomain d'un monomère de HA2 du virus Influenza A. Les conformations pré- et post-fusion ont été déterminées par analyses cristallographiques (cf. figure 2B). La conformation étirée est un modèle. Chaque région sujette à un changement de conformation est différenciée et annotée d'un chiffre. Les positions probables de l'extrémité N-terminale (« région peptide de fusion » : PF) et du domaine transmembranaire (TM), non présents au niveau des ectodomains analysés, sont indiquées. Dans la conformation pré-fusion, la flèche indique le repositionnement de l'extrémité N-terminale. Dans la conformation post-fusion, la ligne en pointillée suggère la localisation de la région C-terminale manquante reliant la région 6 au domaine transmembranaire.

A. structures of the ectodomain of class II fusion glycoproteins of Semliki Forest virus (alphavirus member) and Tick-Borne Encephalitis virus (flavivirus member). These structures

are in the Protein Data Bank (PDB : <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) under the access code 2ALA (Semliki Forest Virus) and 1URZ (Tick-Borne Encephalitis Virus); B : structures of the ectodomain of class I fusion glycoproteins. N-terminal helices are black, C-terminal helices are gray. On the left : pre-fusion conformation of the glycoprotein ectodomain of Influenza A (PDB code : 2HMG), SV5 (PDB code : 2B9B) and SRAS (PDB code : 2FXP) viruses. On the right : post-fusion conformation of the same glycoprotein ectodomain (PDB codes : 1HTM, 1SVF and 1WNC respectively for Influenza A, SV5 and SRAS viruses) and of the glycoprotein ectodomain of HIV-1 (PDB code : 1ENV), HRSV (PDB code: 1G2C) and Ebola (PDB code: 1EBO) viruses. C : Pre-fusion, elongated and post-fusion conformations of the ectodomain of one monomer of the Influenza A HA2. Pre-fusion and post-fusion conformations were determined by crystallographic analyses (cf. figure 2B). The elongated conformation is a model. Each region undergoing a conformation change are differentiated and noted by a number. Probable positions of the N-terminal extremity (PF) and of the transmembrane domain (TM), not present in the analyzed ectodomain, are indicated. In the pre-fusion conformation, the arrow shows the repositioning of the N-terminal extremity. In the post-fusion conformation, the dotted line suggests the location of the C-terminal region missing between region 6 and the transmembrane domain.

Figure 3 : Séquences et propriétés membranaires et structurales de trois peptides obliques. 1 : Données provenant de Gordon et al., 2002 ; 2 : Données provenant de Pillot et al., 1997 ; 3 : Données provenant de Lorin et al., 2006 ; 4 : Données provenant de Gordon et al., 1992 ; 5 : Données provenant de Yang et al., 2001.

* Les résidus glycines (G), alanines (A), sérines (S) et thréonines (T) sont soulignés au niveau de la séquence. Hydrophobicité moyenne calculée selon Brasseur, 2000 ; ** En haut de chaque cellule : peptide replié sous forme hélicoïdale. Les extrémités N- et C-terminales sont indiquées au niveau de l'hélice. En bas de chaque cellule : les surfaces MHP associées à l'hélice avec les enveloppes hydrophiles en blanc et les enveloppes hydrophobes en noir. Le gradient asymétrique hydrophobe observé est indiqué par un trait blanc sur les surfaces MHP ; *** En haut à gauche de chaque cellule : organisation lipidique sans peptide. En bas à droite de chaque cellule : organisation lipidique avec peptide. Les courbures de la monocouche sont indiquées par des traits noirs. **** : En haut de chaque cellule : figure provenant de l'analyse par modélisation moléculaire par IMPALA. Une seule monocouche est représentée. Le plan du haut correspond à l'interface membrane/eau, le plan du milieu correspond à l'interface tête polaires des lipides/chaînes acylées des lipides, le plan du bas correspond au centre de la membrane. Les extrémités N- et C-terminales des hélices sont indiquées. En bas de chaque cellule : angle (par rapport à la surface membranaire) prédit par modélisation moléculaire via l'algorithme IMPALA (mod mol) ou mesuré expérimentalement par spectroscopie infrarouge (ATR-FTIR). n.d. : non déterminé ***** : l-m : pourcentage de mélange lipidique de liposomes mesuré après ajout du peptide ; perm. : pourcentage de perméabilité membranaire de liposomes mesuré après ajout du peptide.

Sequences and membrane/structural properties of three tilted peptides. 1 : comes from Gordon et al., 2002 ; 2 : comes from Pillot et al., 1997 ; 3 : comes from Lorin et al., 2006 ; 4 : comes from Gordon et al., 1992 ; 5 : comes from Yang et al., 2001.

* *Glycine (G), alanine (A), serine (S) and threonine (T) residues are underlined. Mean hydrophobicity calculated according to Brasseur, 2000 ; ** At the top of each cell : peptide under helical conformation. N- and C-terminal extremities are indicated. At the bottom of each cell : MHP surface of the helix with hydrophilic envelopes in white and hydrophobic envelopes in black. The hydrophobic asymmetric gradient is indicated by a white line on MHP surfaces ; *** At the top of each cell : lipid organization without peptide. At the bottom*

*of each cell : lipid organization with peptide. The monolayer curvature is indicated with black lines. **** : At the top of each cell : figure coming from the molecular modeling analysis by IMPALA. Only one monolayer is shown. Top plane : lipid/water interface; middle plane : lipid acyl chain/polar headgroups interface ; bottom plane : bilayer center. The helix structure and the N and C ends of the peptides are indicated. At the bottom of each cell : angle (with respect to the membrane surface) predicted by molecular modeling via IMPALA (mod mol) or experimentally measured by infrared spectroscopy (ATR-FTIR). n.d. : not determined ***** : l-m : percentage of lipid-mixing of liposomes measured after addition of the peptide ; perm. : percentage of leakage of liposomes measured after addition of the peptide.*

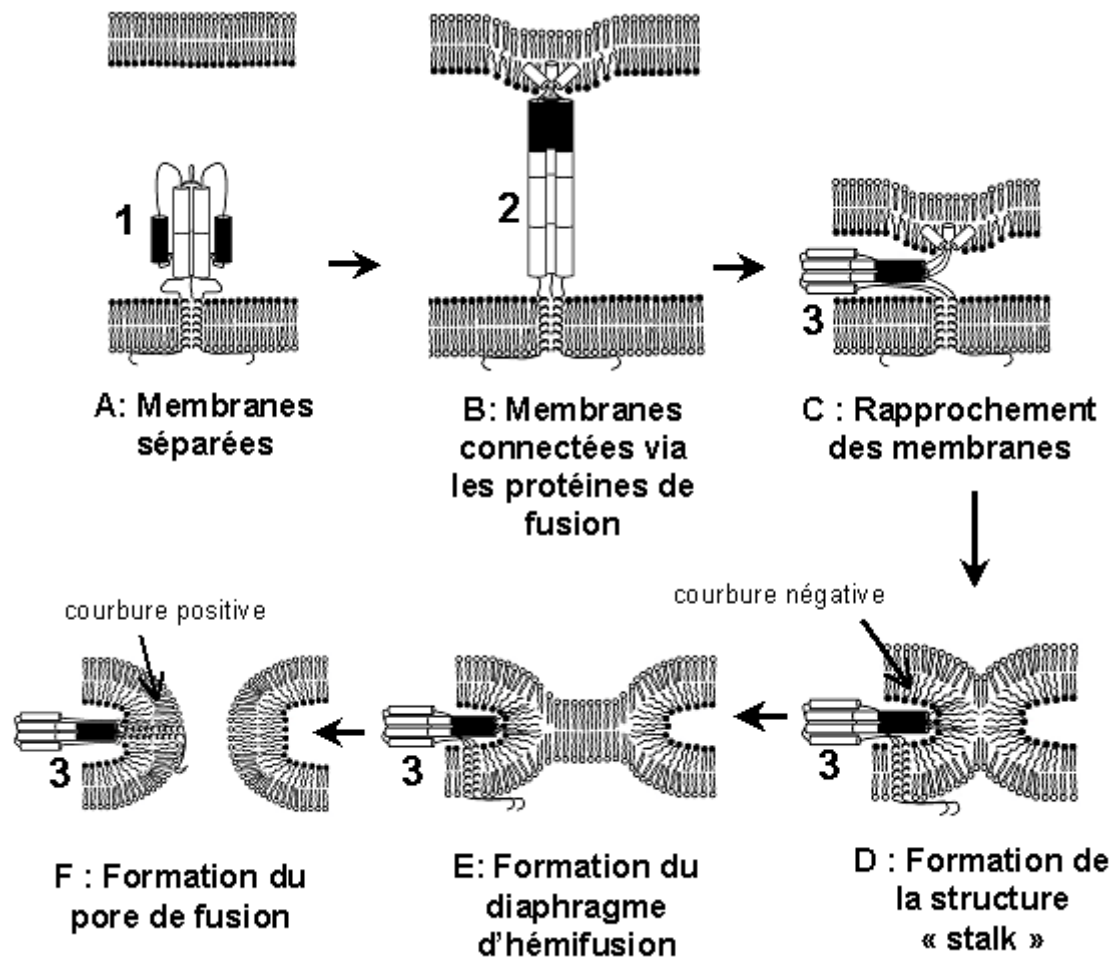


Figure 1

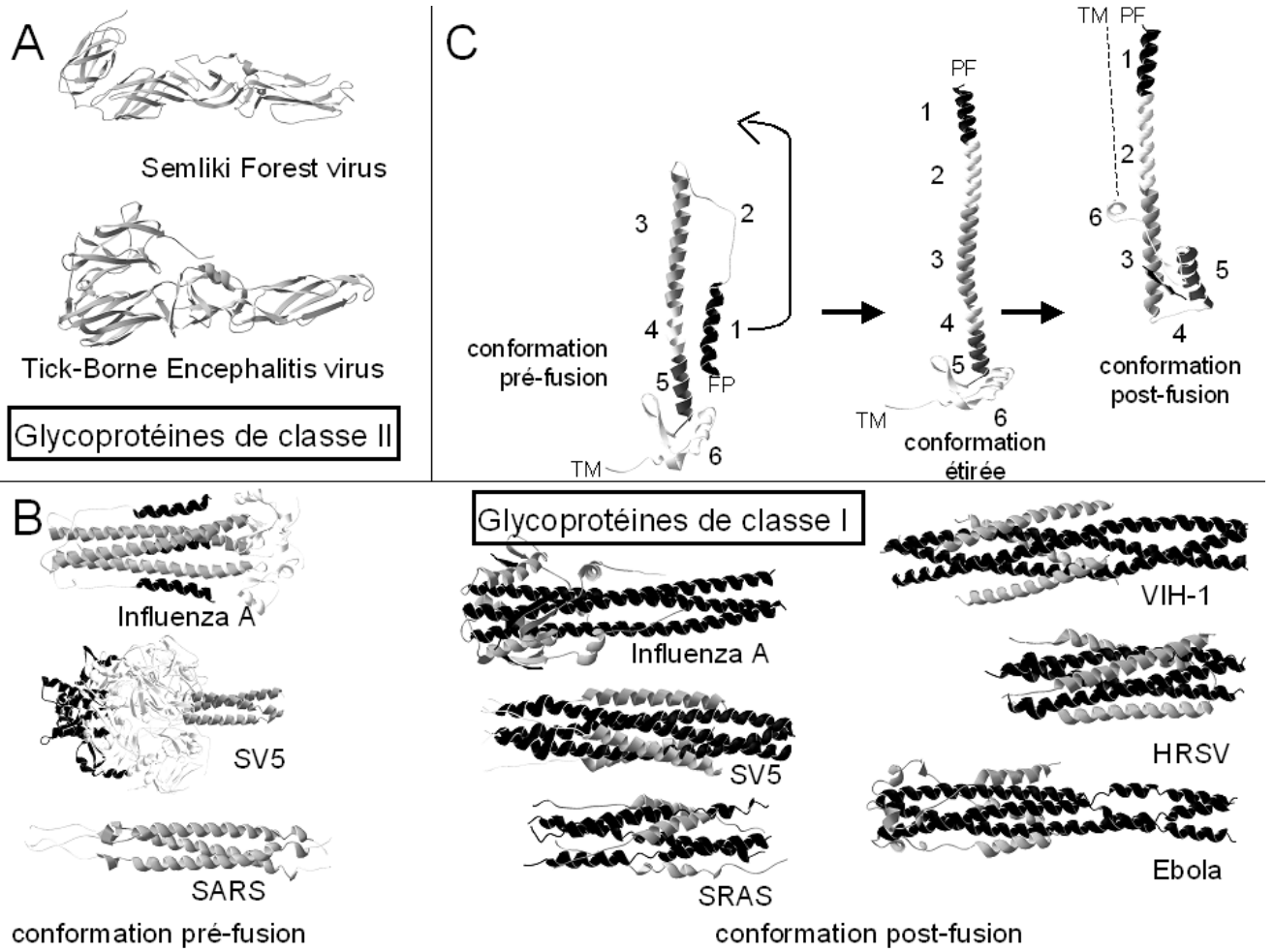


Figure 2

	Séquence *	Structure	MHP**	Hypermatrice***	Orientation membranaire****	Fusion de liposomes *****										
Peptide de fusion du VIH	Séquence : <u>AVGIGALFLGFL</u> <u>GAAGSTMGARS</u> Hydrophobicité moyenne : 0.7	1 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Milieu</th> <th>Alpha</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PBS</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>TFE</td> <td>37</td> </tr> <tr> <td>HFIP</td> <td>52</td> </tr> <tr> <td>Membranes</td> <td>53</td> </tr> </tbody> </table>	Milieu	Alpha	PBS	20	TFE	37	HFIP	52	Membranes	53			 mod mol : 32° ATR-FTIR : 40° ⁴	70% l-m ⁵ 55% perm.
Milieu	Alpha															
PBS	20															
TFE	37															
HFIP	52															
Membranes	53															
Peptide 118-135 du Prion	Séquence : <u>AGAVVGGGLGGY</u> <u>MLGSAMS</u> Hydrophobicité moyenne : 0.57	2 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Milieu</th> <th>Alpha</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10% TFE</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>15% TFE</td> <td>29</td> </tr> <tr> <td>20% TFE</td> <td>42</td> </tr> <tr> <td>50% TFE</td> <td>49</td> </tr> </tbody> </table>	Milieu	Alpha	10% TFE	11	15% TFE	29	20% TFE	42	50% TFE	49			 mod mol : 49° ATR-FTIR : n.d.	45% l-m ² 55% perm.
Milieu	Alpha															
10% TFE	11															
15% TFE	29															
20% TFE	42															
50% TFE	49															
Peptide <i>de novo</i> Caméléon	Séquence : <u>AWTVEKAFKTF</u> Hydrophobicité moyenne : 0.16	3 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Milieu</th> <th>Alpha</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>100% DMSO</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>50% TFE</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>100% TFE</td> <td>21</td> </tr> <tr> <td>Membranes</td> <td>49</td> </tr> </tbody> </table>	Milieu	Alpha	100% DMSO	18	50% TFE	13	100% TFE	21	Membranes	49			 mod mol : 34° ATR-FTIR : 40° ³	40% l-m ³ 50% perm.
Milieu	Alpha															
100% DMSO	18															
50% TFE	13															
100% TFE	21															
Membranes	49															

Figure 3

