

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

Aurélien Lorin, Benoit Charloreaux, Laurence Lins, Robert Brasseur

Gembloux Agricultural University – FUSAGx. Centre de Biophysique moléculaire numérique. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : brasseur.r@fsagx.ac.be

Reçu le 5 mars 2007, accepté le 5 juillet 2007

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.

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.

1. 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, Yanagimachi, 1993) et l'infection virale (Hughson, 1995 ; Chizmadzhev, 2004).

1.1. Étapes 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, Sudhof, 1999) (**Figure 1**).

Malgré le développement de techniques permettant de contrôler la fusion, les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de fusion ne sont toujours

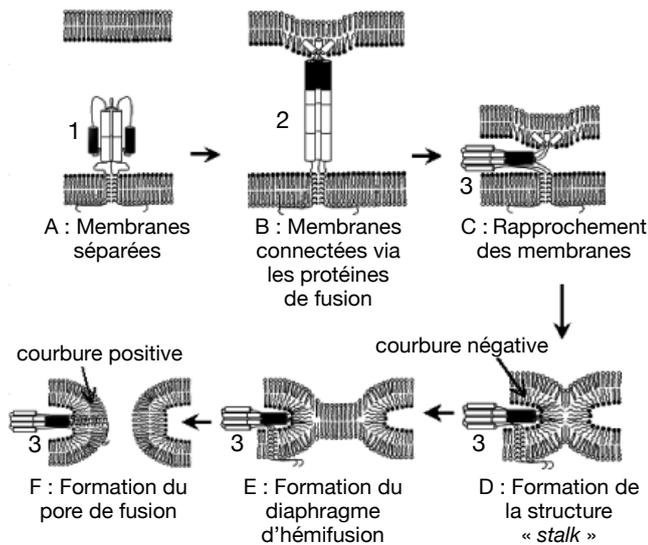


Figure 1. Description de la fusion membranaire selon l'hypothèse du pore lipidique — *Membrane fusion description according to the lipidic pore hypothesis.*

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 — *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 : glycoprotéines de fusion virales sous conformation pré-fusion — *pre-fusion conformation of fusion glycoproteins*;
 2 : glycoprotéines de fusion virales sous conformation étirée — *elongated conformation of fusion glycoproteins*;
 3 : glycoprotéines de fusion virales sous conformation post-fusion — *post-fusion conformation of fusion glycoproteins*.

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, 2000 ; Russell *et al.*, 2001 ; Xu *et al.*, 2005 ; Reese *et al.*, 2005 ; Giraud *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 *stalk* 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).

1.2. 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 ; Zhu *et al.*, 1998 ; Pritsker *et al.*, 1999 ; Rothenberg *et al.*, 2001 ; Russell *et al.*, 2004), la fusion virale est diminuée ou n'est plus observée.

L'analyse par rayons X ou par RMN 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 alpha-virus 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 ; Garry, 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, Weissenhorn, 2004). Les analyses cristallographiques et RMN indiquent 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).

1.3. 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 ; Ingallinella *et al.*, 2004 ; 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 (Carr *et al.*, 1997).

Les glycoprotéines de fusion de nombreux autres virus, dont le VIH-1, ont également été analysées par R-X ou RMN (Fass *et al.*, 1996 ; Chan *et al.*, 1997 ; Weissenhorn *et al.*, 1997 ; 1998 ; 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

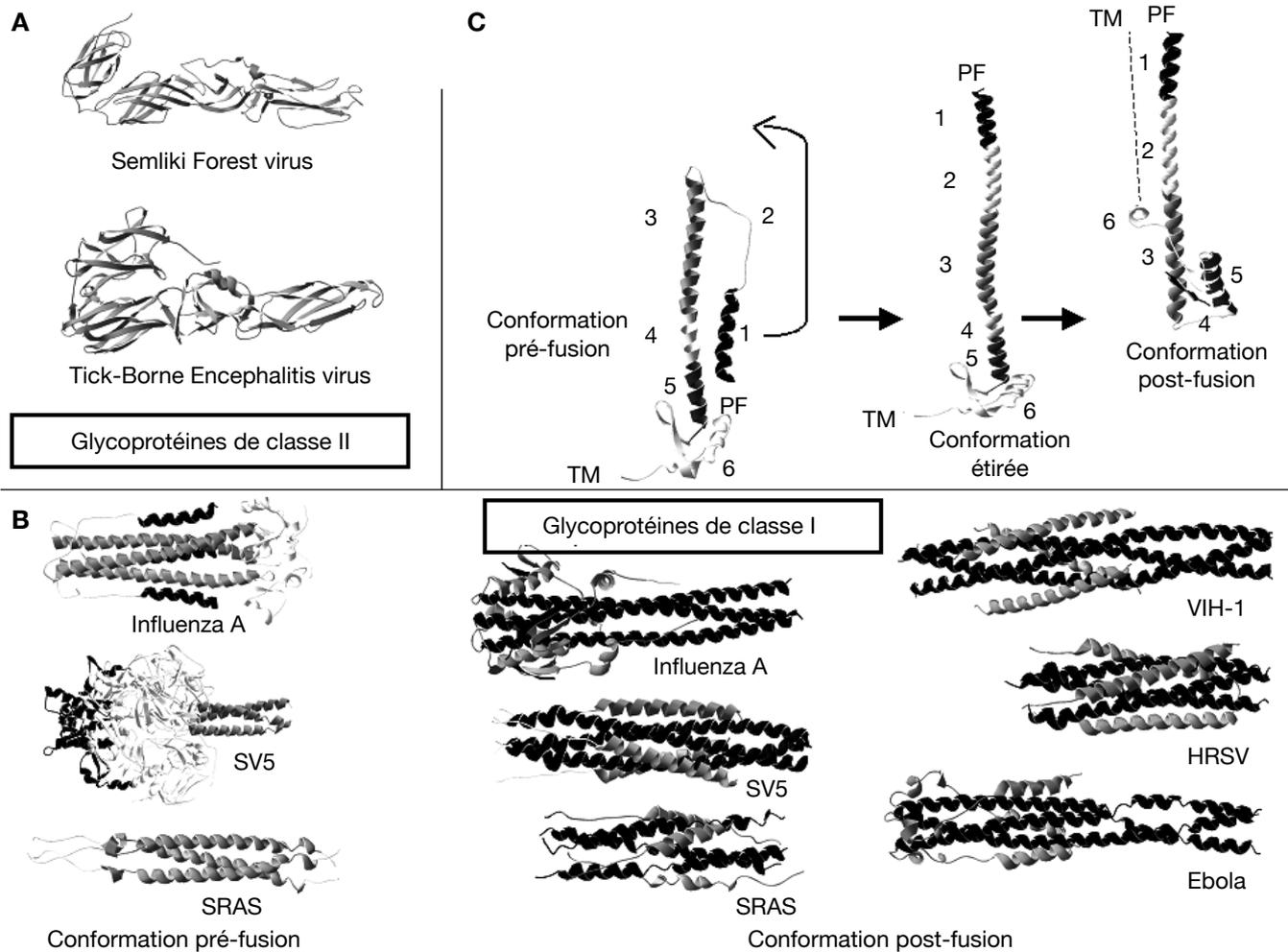


Figure 2. Structures pré- et post-fusion déterminées expérimentalement des ectodomaines de glycoprotéines de fusion de classe I et de classe II (A et B), et changement de conformation suggéré de l'ectodomaine d'une glycoprotéine de fusion de classe I : HA2 (C) — *Pre- and post-fusion structures experimentally measured of the ectodomains of class I and class II fusion glycoproteins (A and B), and conformation change suggested of the ectodomain of a class I fusion glycoproteins: HA2 (C).*

A : structures de l'ectodomaine 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 IURZ (Virus Tick-Borne Encephalitis) ; **B :** structures de l'ectodomaine des glycoprotéines de fusion de classe I des virus. Les hélices N-terminales sont noircies, les hélices C-terminales sont grisées. À gauche : conformation pré-fusion des ectodomaines des glycoprotéines de fusion des virus Influenza A (code PDB : 2HMG), SV5 (code PDB : 2B9B) et du SRAS (code PDB : 2FXP). À droite : conformation post-fusion des ectodomaines 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'ectodomaine 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 ectodomaines 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 pointillé 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 IURZ (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 is differentiated and noted by a number. Probable positions of the N-terminal extremity (PF) and of the transmembranaire 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 transmembranaire domain.*

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, VIH-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 ; Eckert, Kim, 2001 ; Russell *et al.*, 2001 ; Bosch *et al.*, 2003 ; 2004). 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 ; Chernomordik *et al.*, 1999 ; Skehel, Wiley, 2000 ; Eckert, Kim, 2001 ; Russel *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 mono-couches 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 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 ; Zhu *et al.*, 1998 ; Rothenberg *et al.*, 2001 ; Russel *et al.*, 2004) 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, Kielian, 2001), suggérant que le mode d'insertion de l'extrémité N-terminale dans les membranes est également important.

2. 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 (Epand, 2003).

L'analyse de mutations a permis de montrer 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 : Schaal *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 1996 ; 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).

2.1. Peptides 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) (**Tableau 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.*, 2002) (**Tableau 1**). Cette haute proportion en petits résidus n'est pas retrouvée dans les autres segments interagissant avec les membranes (Phoenix, Harris, 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).

2.2. 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 des virus de la rougeole (Wharton *et al.*, 1988 ; Rafalski *et al.*, 1991 ; Haque *et al.*, 2001), VIH-1 (Rafalski *et al.*, 1990 ; Martin *et al.*, 1996 ; Charlotiaux *et al.*, 2006), BLV (Lorin *et al.*, 2007), Ebola (Adam *et al.*, 2004) et SIV (Martin *et al.*, 1994) induisent la fusion

Tableau 1. Séquences de peptides de fusion de différentes glycoprotéines de classe I. Adapté de Del Angel *et al.* (2002).

Virus répertoriés selon leur famille virale	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 S A
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
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 (A/K-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 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 G V A
Nipah Virus	Protéine F1	Q91H63	110	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) *	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	Q6Q1S2	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 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 L 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 V 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 L 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 L 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 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 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 E 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 E 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 E 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 I A H V M L A L A T V L S I 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	A0A856	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

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 noté entre parenthèses. 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 humain 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.

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 ; 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, etc.) 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 suggéraient 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, 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, 1997 ; 1998 ; Chizmadzhev, 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 générer 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, Eband, 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 ; Pereira *et al.*, 1997 ; Schwarz, Taylor, 1999 ; Pritsker *et al.*, 1999 ; Nir, Nieva, 2000 ; 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, 1999 ; Siegel, Epand, 2000). 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 ; Kligler *et al.*, 1997).

2.3. Peptides 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 ; Charloreaux *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 de 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 (Duzgunes, Gambale, 1988 ; Rafalski *et al.*, 1991 ; Zhu *et al.*, 1998 ; Han *et al.*, 1999).

Une des principales interrogations est de connaître la structure qu'adoptent 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 ; Gordon *et al.*, 1992 ; 2002 ; 2004 ; Martin *et al.*, 1996), 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 ; Saez-Cirion, Nieva, 2002 ; Buzon *et al.*, 2005 ; Castano, Desbats, 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 (Gordon *et al.*, 1992 ; 2002 ; 2004 ; Martin *et al.*, 1996). 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 dans la fusion.

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 ; Charlotiaux *et al.*, 2006 ; Lorin *et al.*, 2007).

3. 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.*, 1988a). Ce fut la première fois qu'une telle orientation fut prédite.

3.1. 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, VIH-1, SIV, Influenza A, BLV, Ebola et Sendai lorsqu'ils sont hélicoïdaux (Brasseur *et al.*, 1988b ; 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, 2002).

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 (Lüneberg *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 \AA 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 (Lüneberg *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.*, 2001), 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.*, 2002 ; Ravault *et al.*, 2005 ; Nguyen *et al.*, 2006). Ces peptides correspondent à des fragments de protéines impliqués dans des processus variés, comme les apolipoprotéines (Apo), les enzymes lyolitiques, 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* (Hsu *et al.*, 2002 ; Lorin *et al.*, 2006) 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 ».

3.2. Peptides obliques et structure

La structure des peptides de fusion dépend fortement de leur environnement (cf. section 2.3. 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

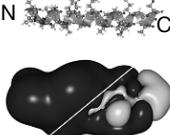
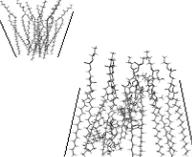
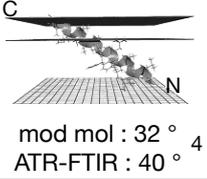
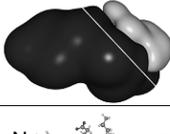
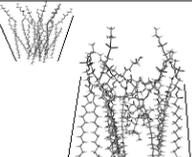
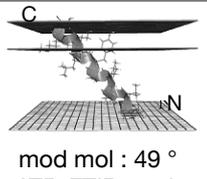
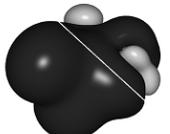
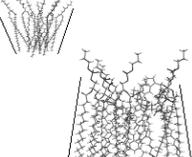
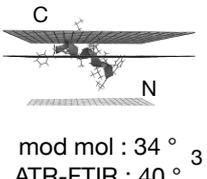
	Séquence*	Structure	MHP**	Hypermatrice***	Orientation membranaire****	Fusion de liposomes*****
Peptide de fusion du VIH-1	Séquence : <u>AVGIGALFL</u> <u>GFL</u> <u>GAAGSTM</u> <u>GARS</u> Hydrophobicité moyenne : 0,7	1 Milieu Alpha PBS 20 TFE 37 HFIP 52 Membranes 53			 mod mol : 32 ° ATR-FTIR : 40 ° ⁴	70 % l-m ⁵ 55 % perm.
Peptide 118-135 du Prion	Séquence : <u>AGAVVGG</u> <u>GGY</u> <u>MILGS</u> <u>SAMS</u> Hydrophobicité moyenne : 0,57	2 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.
Peptide de novo Caméléon	Séquence : <u>AWI</u> <u>VEK</u> <u>AFK</u> <u>TF</u> Hydrophobicité moyenne : 0,57	3 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.

Figure 3. Séquences et propriétés membranaires et structurales de trois peptides obliques — *Sequences and membrane structural properties of three tilted peptides.*

1 : Gordon *et al.*, 2002 ; 2 : Pillot *et al.*, 1997 ; 3 : Lorin *et al.*, 2006 ; 4 : Gordon *et al.*, 1992 ; 5 : 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 — *Glycine (G), alanine (A), serine (S) and threonine (T) residues are underlined. Mean hydrophobicity calculated according to 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 — *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.*

*** 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 — *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.*

**** 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 polaire 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 — *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 : pourcentage de mélange lipidique de liposomes mesuré après ajout du peptide ; perm. : pourcentage de perméabilité membranaire de liposomes mesuré après ajout du peptide — *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.*

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).

3.3. 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. 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 ; 2000 ; Brasseur *et al.*, 1997 ; Rahman *et al.*, 1997 ; Decout *et al.*, 1999 ; Brasseur, 2000 ; Phoenix *et al.*, 2002 ; Thomas, Brasseur, 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).

3.4. 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 (Pillot *et al.*, 1996 ; 1997 ; Perez-Mendez *et al.*, 1998 ; Lambert *et al.*, 1998 ; Decout *et al.*, 1999 ; Lins *et al.*, 2002 ; Lorin *et al.*, 2004 ; Nguyen *et al.*, 2006 ; Crowet *et al.*, 2007) (**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.*, 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), lécitine 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 (Pillot *et al.*, 1996 ; 1997 ; Perez-Mendez *et al.*, 1998 ; Lambert *et al.*, 1998 ; Lins *et al.*, 2002). 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 précédente), 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 ; Epanand, 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 peptides 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-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 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 (Epanand *et al.*, 1994 ; Epanand *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.

4. UTILISATION DE LA THÉORIE DES PEPTIDES OBLIQUES POUR DÉTERMINER LA RÉGION DES PEPTIDES DE FUSION INDISPENSABLE POUR LA FUSION

Comme indiqué par Epanand (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, 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.

L'équipe du professeur Brasseur s'est donc récemment intéressée à mieux définir les peptides de fusion. Une nouvelle définition fut 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 (« cf. section 3.4. Relation obliquité-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 (Charloteaux *et al.*, 2006 ; Lorin *et al.*, 2007). 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.

5. 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 (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 ; Epan, 2000 ; Kozerski *et al.*, 2000 ; Shai, 2000 ; Schroth-Diez *et al.*, 2000 ; Sackett, Shai, 2002 ; Peisajovich, Shai, 2002 ; 2003).

Liste des abréviations

- Å : Angström
- A β : peptide β -Amyloïde (*Amyloid Beta*)
- Apo : Apolipoprotéine (*Apolipoprotein*)
- ATR-FTIR : Spectroscopie Infrarouge par Transformée de Fourier – Réflexion Totale Atténuée (*Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform InfraRed*)
- BLV : Virus de la Leucémie Bovine (*Bovine Leukemia Virus*)
- CD : Dichroïsme Circulaire (*Circular Dichroism*)
- DMSO : Diméthylsulfoxyde (*Dimethylsulfoxyde*)
- EPR : Résonance Paramagnétique Electronique (*Electron Paramagnetic Resonance*)
- ESR : Résonance de Spin Electronique (*Electron Spin Resonance*)
- FLV : Virus de la Leucémie Féline (*Feline Leukemia Virus*)
- FTIR : Spectroscopie Infrarouge par Transformée de Fourier (*Fourier Transform InfraRed*)
- HA2 : Sous-unité membranaire de l'hémagglutinine (*membrane subunit of hemagglutinin*)
- HCA : Analyse d'Amas Hydrophobes (*Hydrophobic Cluster Analysis*)
- HFIP : Hexafluoroisopropanol
- HRSV : Virus Respiratoire Syncytial Humain (*Human Respiratory Syncytial Virus*)
- IMPALA : Integral Membrane Protein and Lipid Association
- Influenza A : virus de l'Influenza (grippe) de type A
- Influenza B : virus de l'Influenza (grippe) de type B
- MHP : Potentiel Hydrophobicité Moléculaire (*Molecular Hydrophobicity Potential*)
- PBS : tampon phosphate (*phosphate-buffered saline*)
- PDB : Banque de Données de Protéines (*Protein Data Bank*)
- PrP : Protéine Prion (*Prion Protein*)
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire (*NMR : Nuclear Magnetic Resonance*)
- SDS : Sodium DodécylSulfate (*Sodium DodecylSulfate*)
- SIV : Virus de l'Immunodéficiência Simienne (*Simian Immunodeficiency Virus*)
- SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (*SARS : Severe Acute Respiratory Syndrome*)
- SV5 : Virus para-influenza Simien 5 (*paramyxovirus Simian Virus 5*)
- TFE : Trifluoroéthanol (*Trifluoroethanol*)

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

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

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 : Benoit 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. Aurélien Lorin est supporté financièrement par une bourse Télévie (projet Télévie 7.4.511.03.F). Benoit Charlotteaux est supporté financièrement par le programme d'attraction des pôles interuniversitaires (contrat PAI phase 6). Robert Brasseur et Laurence Lins sont respectivement Directeur de Recherche et Chercheur Qualifié au FNRS.

Bibliographie

- 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., Ellens H., Alford D. (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 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.
- Bosch ML., Earl PL., Fagnoli K., Picciafuoco S., Giombini F., Wongstaaal F., Franchini G. (1989). Identification of the Fusion Peptide of Primate Immunodeficiency Viruses. *Science* **244**, p. 694–697.
- Bradshaw JP., Darkes MJM., Harroun TA., Katsaras J., Epand RM. (2000). Oblique membrane insertion of viral fusion peptide probed by neutron diffractions. *Biochemistry* **39**, p. 6581–6585.
- 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. (2000). Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis). *Mol. Membrane Biol.* **17**, p. 31–40.
- Brasseur R., Lorge P., Goormaghtigh E., Ruyschaert JM., 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** (4), p. 325–332.
- Brasseur R., Cornet B., Burny A., Vandenbranden M., Ruyschaert JM. (1988b). 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., 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., 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.
- 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 GM. (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 multibi-layers) 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 ML. (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. (1996). Non-bilayer lipids and biological fusion intermediates. *Chem. Phys. Lipids* **81**, p. 203–213.
- 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., 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 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 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. Membrane Biol.* **16**, p. 33–42.
- Chizmadzhev YA. (2004). The mechanisms of lipid-protein rearrangements during viral infection. *Bioelectrochemistry* **63**, p. 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 MC. (2003). The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nature Reviews Mol. Cell Biology* **4**, p. 309–319.
- 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.
- 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.
- Crowet JM., Lins L., Dupiereux I., Elmoualija B., Lorin A., Charloteaux 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. *Proteins* **68**, p. 936–947.
- 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. Biochem.* **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. Membrane 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., Ruysschaert JM., Shai Y., Blumenthal R. (1997). What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Mol. Membrane 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.
- Epanand RM. (1997). Studies of membrane physical properties and their role in biological function. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, p. 1073–1079.
- Epanand RM. (1998). Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, p. 353–368.
- Epanand RM. (2000). Membrane fusion. *Biosci. Rep.* **20**, p. 435–441.
- Epanand RM. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, p. 116–121.
- Epanand RM., Epanand 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.
- Epanand RF., Martin I., Ruysschaert JM., Epanand 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.
- Epanand RM., Epanand RF., Martin I., Ruysschaert JM. (2001). Membrane interactions of mutated forms of the influenza fusion peptide. *Biochemistry* **40**, p. 8800–8807.
- 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.
- Gallagher 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 CF., 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. Membrane 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 FM. (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., Grubmüller 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.
- Jähnig 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., 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. *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., Kozlov MM. (2002). Stalk model of membrane fusion: Solution of energy crisis. *Biophys. J.* **82**, p. 882–895.
- 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., 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., 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**, 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., Charlotheaux 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 Enzymol.* **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., Charlotheaux B. (2007). Determination of the minimal fusion peptide of bovine leukemia virus gp30. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355** (3), p. 649–653.
- 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.
- Lüneberg 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 CH., 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., 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., Epand 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., Agirre A. (2003). Are fusion peptides a good model to study viral cell fusion? *Biochim. Biophys. Acta* **1614**, p. 104–115.
- 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.
- 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.
- Pécheur EI., Martin I., Bienvenue A., Ruyschaert 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., Talusot 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? *J. Mol. 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 SC. (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.
- Rodriguez-Crespo 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., 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. (2000). Functional domains within fusion proteins: prospectives for development of peptide inhibitors of viral cell fusion. *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., Epanand 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 DC. (2001). Influenza fusion peptides. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, p. 623–626.
- Slepishkin 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.
- Söllner TH. (2004). Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, p. 429–435.
- Stegmann T. (2000). Membrane fusion mechanisms: The influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* **1**, p. 598–604.
- Stegmann T., Doms RW., Helenius A. (1989). Protein-Mediated Membrane-Fusion. *Annu. Rev. 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.
- 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.
- Supekar VM., 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. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **101**, p. 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**, p. 6257–6264.
- Tamm LK., Han X., Li Y., 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 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.
- 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. (2004a). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of the fusion core from two new zoonotic paramyxoviruses, Nipah virus and Hendra virus. *Acta Crystallogr. Section D: Biol. Crystallogr.* **60**, p. 1161–1164.
- Xu YH., Lou ZY., Liu YW., Pang H., Tien P., Gao GF., Rao ZH. (2004b). 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 HW. (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 Dioleoylphosphatidyl ethanolamine Membranes and Their Fusion with Sendai Virus. *Biochim. Biophys. Acta* **1065**, p. 49–53.
- Yin HS., Paterson RG., Wen XL., 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 HS., Wen XL., Paterson RG., 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 DE., Chernomordik LV. (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.