

UNIVERSITE MONTPELLIER 2
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Discipline : Biophysique cellulaire

Ecole Doctorale : CBS2

présentée et soutenue publiquement par :

Patrice RASSAM

le 25 Octobre 2012

Influence de l'assemblage du VIH-1 et de l'organisation du cytosquelette
sur la dynamique et la répartition membranaire des tétraspanines CD9 et CD81
analysée à l'échelle de la molécule unique

Directeur de thèse : Pierre-Emmanuel MILHIET

JURY

Marylène Mougel, Directrice de Recherches CNRS (Présidente)

Jean Dubuisson, Directeur de Recherches CNRS (Rapporteur)

Laurence Salomé, Directrice de Recherches CNRS (Rapporteuse)

Catherine Royer, Directrice de Recherche INSERM (Examinatrice)

Eric Rubinstein, Directeur de Recherches INSERM (Examinateur)

UNIVERSITE MONTPELLIER 2
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

T H E S E

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 2

Discipline : Biophysique cellulaire

Ecole Doctorale : CBS2

présentée et soutenue publiquement par :

Patrice RASSAM

le 25 Octobre 2012

Influence de l'assemblage du VIH-1 et de l'organisation du cytosquelette
sur la dynamique et la répartition membranaire des tétraspanines CD9 et CD81
analysée à l'échelle de la molécule unique

Directeur de thèse : Pierre-Emmanuel MILHIET

JURY

Marylène Mougel, Directrice de Recherches CNRS (Présidente)

Jean Dubuisson, Directeur de Recherches CNRS (Rapporteur)

Laurence Salomé, Directrice de Recherches CNRS (Rapporteuse)

Catherine Royer, Directrice de Recherche INSERM (Examinatrice)

Eric Rubinstein, Directeur de Recherches INSERM (Examineur)

Remerciements

Ce manuscrit de thèse est avant tout dédié à la mémoire de Flavio Della Seta, enseignant-chercheur passionné, qui restera à jamais dans mon esprit comme un modèle absolu de rigueur scientifique, de dévouement et de sagesse. Je lui dois mon engagement dans l'univers de la recherche et de l'enseignement.

Par la suite, je n'aurais sûrement pas autant développé mon goût pour l'expérimentation et la réflexion scientifique, sans la confiance et l'attention de Jihane Basbous et de Pascal Pomiès, qui m'ont gentiment accueilli dans leur équipe lors de mes années de Master.

Il convient maintenant que je remercie mon directeur de thèse. En outre, lors de ces 4 dernières années, Pierre-Emmanuel Milhiet a été pour moi bien plus que cela. En effet, je me dois de saluer sa capacité hors du commun à s'adapter aux besoins de chacun dans le laboratoire, en donnant de sa personne jours après jour pour résoudre les équations de la vie. Il a su me laisser le temps de l'apprentissage pour réfléchir et agir par moi-même et a toujours été présent pour m'épauler efficacement lorsque la situation le nécessitait.

Mes remerciements vont aussi à chacun des membres de mon jury de thèse, qui ont montré un intérêt extrêmement encourageant pour mon travail en acceptant de l'examiner et d'en débattre avec objectivité. J'adresse en particulier ma gratitude à Catherine Royer pour avoir accepté de présider ce jury et pour son implication dans la direction du Centre de Biochimie Structurale, une grande maison qu'elle a gardée à son image : performante et accueillante.

Je souhaite aussi souligner la participation de l'ensemble de mes collaborateurs dans la réussite des projets de ce manuscrit. Un grand merci en particulier à Eric Rubinstein pour les anticorps et l'esprit critique qu'il m'a apportés, à Markus Thali, Dimitry Kementsov et Nathan Roy pour leur expertise sur le VIH et enfin à Laurence Cocquerel et Julie Potel pour les longues heures d'acquisition et d'analyse que nous avons partagées.

Par ailleurs, pour le soutien financier qu'elle m'a offert cette année, L'Agence Nationale pour la Recherche sur le SIDA et les hépatites virales mérite d'être citée dans cette partie.

Je salue aussi l'ensemble des chercheurs du CBS dont l'aide fut précieuse, notamment Emmanuel Margeat en microscopie de fluorescence et Patrice Dosset sur le logiciel d'analyse. Les échanges constructifs et la bonne humeur au sein du groupe d'étudiants du CBS furent propices au déroulement de ma thèse dans les meilleures conditions, en particulier grâce à mes partenaires de bureau, Véronica Gocheva et Julien Roche.

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour leur encouragement permanent et mon épouse, Julie, qui m'a elle aussi supporté avec amour, à travers toutes les phases de cette aventure.

Table des matières

Remerciements.....	3
Abréviations.....	9
Liste des figures.....	11 à 13
Introduction.....	15 à 77
I) La membrane plasmique, site d'assemblage et de bourgeonnement du VIH.....	15 à 28
I) 1. Fonctions cellulaires.....	15 à 16
I) 1. 1. Protection.....	15
I) 1. 2. Adhésion et migration.....	15
I) 1. 3. Echanges et signalisation.....	16
I) 1. 4. Fusion et fission.....	16
I) 2. Composition moléculaire.....	16 à 18
I) 2. 1. Lipides membranaires.....	17
I) 2. 1. 1. Les glycérophospholipides (ou phosphatides).....	17
I) 2. 1. 2. Les sphingolipides.....	17
I) 2. 1. 3. Le cholestérol.....	18
I) 2. 2. Protéines membranaires.....	18 à 20
I) 2. 3. Glycocalix.....	20
I) 3. Organisation Structurale.....	20 à 22
I) 3. 1. Interactions entre lipides et protéines.....	20
I) 3. 2. Hétérogénéité et asymétrie membranaire.....	20 à 22
I) 3. 3. Radeaux lipidiques.....	22 à 26
I) 3. 4. Compartiments dépendants du cytosquelette.....	27 à 28
I) 3. 5. Domaines à base protéique.....	28
II) Les tétraspanines, organisateurs de la membrane plasmique.....	29 à 42
II) 1. Présentation générale.....	29 à 33
II) 1. 1. Phylogénie et diversité.....	29 à 31
II) 1. 2. Structure et modifications post traductionnelles.....	31 à 33
II) 1. 2. 1. Les régions cytoplasmiques.....	31 à 32
II) 1. 2. 2. Les portions transmembranaires.....	32

II) 1. 2. 3. Les boucles extracellulaires.....	32 à 33
II) 1. 3. Localisation cellulaire et expression tissulaire.....	33
II) 2. Fonctions biologiques.....	34 à 37
II) 2. 1. Implications dans l'adhésion, la migration et la signalisation cellulaire.....	34
II) 2. 2. Régulation de la protéolyse et de la répartition membranaire des protéines.....	35
II) 2. 3. Modulation de la fusion membranaire et des processus infectieux.....	35 à 37
II) 2. 3. 1. Relations intimes entre CD81 et le VHC.....	36
II) 2. 3. 2. Implication des tétraspanines dans l'infection par le VIH.....	36 à 37
II) 3. Organisation latérale membranaire.....	37 à 42
II) 3. 1. Caractérisation du réseau d'interactions formé par les tétraspanines.....	37 à 38
II) 3. 2. Identification des domaines enrichis en tétraspanines.....	39
II) 3. 3. Dynamique membranaire des tétraspanines.....	40 à 42
III) Le VIH, agent infectieux à l'origine du SIDA.....	43 à 60
III) 1. Généralités sur le virus.....	43 à 46
III) 1. 1. Génome viral.....	43 à 44
III) 1. 2. Protéines de structure.....	44 à 45
III) 1. 3. Protéines de l'enveloppe.....	45
III) 1. 4. Protéines à activité enzymatique.....	46
III) 1. 5. Protéines de régulation.....	46
III) 2. Le cycle viral.....	47 à 52
III) 2. 1. Reconnaissance de la cellule cible et fusion membranaire.....	47
III) 2. 2. Processus intracellulaires pour l'intégration du génome de l'hôte.....	48
III) 2. 3. Production de nouveaux ARN et protéines viraux.....	48
III) 2. 4. Adressage, assemblage, bourgeonnement et maturation membranaires.....	48 à 50
III) 2. 5. Dissémination dans l'organisme de l'hôte.....	50 à 52
III) 2. 5. 1. Dissémination libre.....	50 à 51
III) 2. 5. 2. Dissémination par contact cellulaire.....	51 à 52
III) 3. Epidémiologie du SIDA.....	52 à 60
III) 3. 1. Origine et diversité génétique du VIH.....	54 à 55
III) 3. 2. Transmission du virus.....	55
III) 3. 3. Apparition et évolution de la pathologie.....	56
III) 3. 4. Stratégies de lutte contre l'infection.....	57 à 60
III) 3. 4. 1. Mécanismes endogènes innés et adaptatifs.....	57 à 58

III) 3. 4. 1. 1. Actions de l'immunité innée.....	57
III) 3. 4. 1. 2. Actions de l'immunité adaptative.....	58
III) 3. 4. 1. 3. Effets de certains polymorphismes.....	58
III) 3. 4. 2. Méthodes prophylactiques et thérapeutiques.....	59 à 60
III) 3. 4. 2. 1. Moyens de protection, de prévention et prophylaxie.....	59
III) 3. 4. 2. 2. Moyens thérapeutiques en cours.....	59 à 60
III) 3. 4. 2. 3. Moyens thérapeutiques en développement.....	60
IV) La dynamique membranaire.....	61 à 77
IV) 1. Techniques d'imagerie et de mesure.....	61 à 65
IV) 1. 1. Marquages.....	61 à 63
IV) 1. 2. Microscopies et spectroscopies.....	63 à 65
IV) 2. Analyse de la dynamique membranaire.....	65 à 77
IV) 2. 1. Notions de diffusion.....	65
IV) 2. 2. Mesures de la dynamique de populations moléculaires.....	66 à 70
IV) 2. 2. 1. Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment.....	66 à 67
IV) 2. 2. 2. La spectroscopie de fluctuation de fluorescence.....	67 à 70
IV) 2. 3. Mesures à l'échelle de la molécule unique.....	71 à 75
IV) 2. 4. Etude de la dynamique membranaire.....	76 à 77
Problématiques de thèse.....	78
Résultats et discussion.....	79 à 181
I) Analyse en molécule unique de l'influence de l'assemblage du VIH-1 sur la dynamique et la répartition membranaire des tétraspanines CD9 et CD81.....	79 à 127
I) 1. Approches expérimentales et travaux préliminaires.....	79 à 91
I) 1. 1. Expression membranaire de pseudo virus sur cellules vivantes.....	79 à 81
I) 1. 2. Choix des protéines et lipides membranaires étudiées.....	81 à 83
I) 1. 3. Choix, synthèse et purification des Fab dirigés contre les protéines d'intérêt.....	83 à 85
I) 1. 4. Choix du fluorophore, montage expérimental et acquisition des données.....	86 à 90
I) 1. 5. Analyse des données.....	90 à 91
I) 2. Article n°1.....	92 à 121
I) 3. Résultats complémentaires.....	122 à 124
I) 4. Discussion.....	124 à 127

II) Analyse en molécule unique de l'influence du cytosquelette sur la dynamique et la répartition membranaire des tétraspanines CD9 et CD81.....	128 à 181
II) 1. Approches expérimentales et travaux préliminaires.....	128 à 131
II) 1. 1. Conditions expérimentales pour l'étude de chimères CD9/CD81.....	128
II) 1. 2. Désorganisation du cytosquelette et des liens supposés avec CD9 et CD81...	129 à 131
II) 2. Article n°2.....	132 à 162
II) 3. Résultats complémentaires.....	163 à 175
II) 4. Discussion.....	176 à 181

Conclusions et Perspectives.....182 à 189

I) Influence réciproque entre la membrane plasmique et CD9 ou CD81.....	182 à 184
I) 1. Influence de la température et du cholestérol.....	182 à 183
I) 2. Influence du type cellulaire.....	183 à 184

II) Relations entre le cytosquelette et CD9 ou CD81 à l'état natif.....	184 à 186
II) 1. Influence du cytosquelette.....	184 à 185
II) 2. Implication des ERM.....	185 à 186
II) 3. Implication d'EWI-2 et EWI-F.....	186

III) Relations entre l'assemblage du VIH-1 et les tétraspanines CD9 et CD81....	187 à 188
III) 1. Influence de Gag sur les tétraspanines CD9 et CD81.....	187
III) 2. Implication du cytosquelette dans le recrutement de CD9 et CD81.....	187 à 188

IV) Relations entre le VHC et la dynamique des tétraspanines CD9 et CD81.....	188
--	------------

V) Conclusions générales.....	189
--------------------------------------	------------

Bibliographie.....190 à 201

Annexes.....202 à 221

I) Article n°3.....	202 à 221
----------------------------	------------------

Abréviations

Ab : Antibody (pour anticorps complet)
AFM : Atomic Force Microscopy (pour Microscopie à Force Atomique)
AOTF : Acousto-Optical Tunable Filter (pour filtre acousto-optique contrôlable)
CCR5 C-C chemokine receptor type 5
CD4 Cluster of Differentiation 4
Chl : Cholestérol
CXCR4 C-X-C chemokine receptor type 4
DOPC : dioleoyl-phosphatidylcholine
DPPC : dipalmitoyl-phosphatidylcholine
DRM : Detergent Resistant Membrane (pour membrane résistante au détergent)
DSC : Differential scanning calorimetry (pour calorimétrie différentielle à balayage)
Fab : Fragment antibody (pour fragment d'anticorps)
FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy (Spectroscopie de Corrélation de Fluorescence)
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching (pour recouvrement de fluorescence après photoblanchiment)
CCD : Charge coupled device (pour dispositif à transfert de charge)
GFP : Green Fluorescence Protein (pour protéine fluorescente verte)
gp120 glycoprotéine 120
gp41 glycoprotéine 41
GPI : glycosylphosphatidylinositol
HLA : Human Leukocyte Antigen (pour antigène leucocytaire humain)
HTLV-1 : Human T Leukemia Virus -1 (pour virus de la leucémie T humaine de type 1)
MSD : Mean Square Displacement (pour déplacement quadratique moyen)
MVB : Multivesicular Body (pour corps multivésiculaires)
M β CD : méthyl- β -cyclodextrine
ON : ouverture numérique
PALM : Photo-Activated Localization Microscopy (microscopie de localisation par photoactivation)
PC : phosphatidylcholine
PE : phosphatidyléthanolamine
PI : phosphatidylinositol
PI4K : phosphatidylinositol 4-kinase
PIP2 : phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PS : phosphatidylsérine
PSF : Point Spread Function (pour fonction d'étalement du point)
QD : Quantum Dot
SM : sphingomyéline
SMT : Single Molecule Tracking (pour suivi de molécule unique)
SPT : Single Particle Tracking (pour suivi de particule unique)
STORM : STochastic Optical Reconstruction Microscopy (pour microscopie à reconstruction stochastique optique)
TEM : Tetraspanin Enriched Microdomains (pour microdomaines enrichis en tétraspanines)
TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence (pour microscopie à réflexion totale interne)
TM : Transmembrane
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH-1 : Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1

Liste des figures

- Figure 1 : Représentation des lipides membranaires à acides gras.
- Figure 2 : Structure chimique du cholestérol.
- Figure 3 : Schéma représentant les différents types de protéine membranaire.
- Figure 4 : Structure des différentes ancres lipidiques des protéines transmembranaires.
- Figure 5 : Coupe de cellule épithéliale de l'intestin vue en MET.
- Figure 6 : Schéma du modèle de la mosaïque fluide.
- Figure 7 : Représentation schématique des transitions de phase lipidique.
- Figure 8 : Schéma de la structure d'un radeau lipidique.
- Figure 9 : Images AFM de membranes modèles constituées de DOPC, SM et cholestérol.
- Figure 10 : Représentation des différents modèles de rafts, proposés par : A, Maxfield ; B, Anderson et Jacobson ; C, Mayor.
- Figure 11 : Représentation du modèle de Kusumi.
- Figure 12 : Arbre phylogénétique des groupes orthologues de tétraspanines.
- Figure 13 : Arbre phylogénétique des tétraspanines de mammifères.
- Figure 14 : Schéma de la structure des tétraspanins et leurs résidus conservés.
- Figure 15 : Différents partenaires des tétraspanines CD9, CD81, CD151, CD63 et CD53.
- Figure 16 : Organisation du réseau à tétraspanines proposée par Hemler.
- Figure 17 : Marquage des zones enrichies en CD9 dans une cellule PC3.
- Figure 18 : Diffusion de CD9 dans les cellules PC3.
- Figure 19 : Codiffusion de la tétraspanine CD9 dans les cellules PC3.
- Figure 20 : Confinement transitoire de CD9 dans une zone enrichie en CD9.
- Figure 21 : Organisation dynamique des tétraspanines à la membrane plasmique.
- Figure 22 : Schéma général d'une coupe de virion.
- Figure 23 : Organisation du génome viral.
- Figure 24 : Représentation de l'organisation spatiale et structurale des protéines d'enveloppe.
- Figure 25 : Schéma du cycle viral.
- Figure 26 : Représentation des domaines fonctionnels de Gag.
- Figure 27 : Représentation d'une synapse virologique.
- Figure 28 : Image en immunofluorescence de 3 lymphocytes liés par un NT.
- Figure 29 : Représentation globale du nombre de patients en 2011.
- Figure 30 : Représentation globale du nombre de nouvelles infections en 2011.
- Figure 31 : Représentation globale du nombre de décès dus au SIDA en 2011.

Figure 32 : Arbre phylogénétique reliant le VIH à ses homologues Simiens et Félines.

Figure 33 : Evolution de la charge virale et du nombre de LT4 chez les patients.

Figure 34 : Représentation des différentes sondes.

Figure 35 : Comparaison entre un microscope à épifluorescence et un microscope confocal.

Figure 36 : Illustration du TIRF à travers l'objectif.

Figure 37 : Schéma des deux différents montages de TIRF.

Figure 38 : Avantages et inconvénients des différents types de TIRF.

Figure 39 : Illustration du FRAP.

Figure 40 : Fraction mobile d'une membrane compartimentée (B) ou non (A).

Figure 41 : Montage classique de FCS.

Figure 42 : Simulation de différents types de mouvements analysables en FCS.

Figure 43 : Simulation de différentes proportions de liaison à un complexe.

Figure 44 : Simulation de différents taux de liaison entre deux molécules marquées.

Figure 45 : Illustration d'un profil de diffraction, le disque de Airy.

Figure 46 : Calcul du déplacement quadratique moyen.

Figure 47 : Profil de la MSD en fonction du type de trajectoire membranaire observé.

Figure 48 : Influence du milieu et du substrat sur les dommages induits par le laser.

Figure 49 : Construction intégrée au plasmide exprimant la protéine Gag-GFP.

Figure 50 : Pourcentage de cellules transfectées ou mortes après transfection.

Figure 51 : Schéma de la structure de CD9, CD81, CD55 et CD46.

Figure 52 : Optimisation du traitement à la cholestérol oxydase.

Figure 53 : Profil d'élution en gel filtration après digestion d'anticorps à la papaïne.

Figure 54 : Résumé des différentes étapes pour générer nos Fab marqués.

Figure 55 : Marquage de CD9 avec un anticorps complet.

Figure 56 : Marquage de CD9 avec un Fab.

Figure 57 : Distribution différente des coefficients de diffusion de CD9 (Fab/Ab).

Figure 58 : Diagramme simplifié de Jablonski.

Figure 59 : Spectres d'absorption (bleu) et d'émission (rouge) d'Atto647N.

Figure 60 : Tableau récapitulatif des propriétés de différents fluorophores.

Figure 61 : Trajectoires de Fab-Atto647N dirigés contre CD9 dans les cellules HeLa.

Figure 62 : Montage TIRF développé au laboratoire.

Figure 63 : Comparaison du TIRF et de l'épifluorescence.

Figure 64 : Distribution des coefficients de diffusion en fonction du temps d'acquisition.

Figure 65 : Interface du logiciel Patrack.

Figure 66 : Influence du cholestérol dans l'agrégation des protéines Gag.

Figure 67 : Influence de l'expression de Gag sur la dynamique membranaire.

Figure 68 : Influence du cholestérol dans le ralentissement de la mobilité induite par Gag.

Figure 69 : Pourcentage des différents types de mouvement en fonction de Gag.

Figure 70 : Superposition des trajectoires avec les zones enrichies en Gag.

Figure 71 : Modèle expliquant les premières étapes d'assemblage de Gag à la membrane.

Figure 72 : Schéma des différentes chimères utilisées.

Figure 73 : Optimisation du traitement à la cytochalasine D.

Figure 74 : Optimisation du traitement à la latrunculine B.

Figure 75 : Optimisation du traitement au nocodazole.

Figure 76 : Dynamique et répartition membranaire des tétraspanines dans les cellules CHO.

Figure 77 : Effets similaires de la cytochalasine D et de la latrunculine B.

Figure 78 : Effets similaires du dominant négatif de l'eitrine et de la moésine.

Figure 79 : Effet non spécifique du nocodazole sur la dynamique membranaire.

Figure 80 : Influence du réseau de microtubule sur les mouvements confinés.

Figure 81 : Influence du cytosquelette sur la taille des confinements persistants.

Figure 82 : Diamètre des confinements persistants ou transitoires.

Figure 83 : Temps de confinement dans les trajectoires mixtes.

Figure 84 : Dynamique et répartition membranaire des tétraspanines CD9, CD81 et CD82.

Figure 85 : Comparaison des coefficients de diffusion de CD9, CD81 et CD82.

Figure 86 : Influence de la température sur la dynamique et la répartition membranaire.

Figure 87 : Influence de la température sur la distribution des coefficients de diffusion.

Figure 88 : Influence du cholestérol dans la dynamique et la répartition membranaire.

Introduction

D) La membrane plasmique, site d'assemblage et de bourgeonnement du VIH

*« Ce n'est pas toujours par manque de briques
qu'on rencontre plus souvent des petits murs » Proverbe africain*

D) 1. Fonctions cellulaires

Outre la délimitation physique de l'unité structurale de la vie, frontière entre le milieu intra et extracellulaire, la membrane plasmique est un environnement à part entière dont la diversité et la complexité traduisent ses fonctions cellulaires fondamentales.

D) 1. 1. Protection

Quel que soit le type tissulaire auquel une cellule appartient, le maintien de son intégrité physique vis-à-vis des contraintes mécaniques et chimiques dépend en grande partie des propriétés mécaniques et structurales de sa membrane¹. Sa forme, sa composition et le recyclage de ses constituants permettent de répondre de façon adaptée aux agressions qui pourraient nuire à l'intégrité des éléments intracellulaires, comme le noyau, les différents organites, ou encore même les protéines du cytoplasme². Enfin, sans l'implication de la membrane plasmique dans les processus d'adhésion, de migration, d'échange, de signalisation, la cellule serait bien plus vulnérable aux variations de salinité, de pH ou de température³.

D) 1. 2. Adhésion et migration

En tant que paroi, la membrane plasmique est en contact direct avec la matrice extracellulaire et les autres cellules de l'organisme, au sein desquels les propriétés d'adhésion et de migration sont dépendantes de la composition et du caractère viscoélastique de la membrane. En effet, elle participe activement à ces processus cellulaires grâce à ses prolongements (pseudopodes, lamellipodes, filopodes), aux jonctions intercellulaires (serrées, adhérentes, communicantes), à sa polarisation (apicale, basale, baso-latérale) et à la régulation (endocytose et exocytose) orientée de son contenu^{4,5}.

I) 1. 3. Echanges et signalisation

A l'interface entre les besoins intracellulaires et les variations du milieu extracellulaire la membrane plasmique est une zone d'échange de molécules et de signaux, entre la cellule et la matrice extracellulaire, ou directement entre deux cellules.

Afin de s'adapter à son environnement, la cellule a développé un panel de récepteurs, de systèmes de transduction et de canaux d'échanges disposés pour la plupart à la membrane plasmique. Ces outils participent aux processus d'adhésion et de migration préalablement évoqués, mais régulent aussi indirectement la prolifération cellulaire et de nombreuses autres fonctions de la cellule⁶.

Par ailleurs, les jonctions communicantes et les nanotubes membranaires sont aussi des moyens pour les cellules d'échanger directement des signaux, voire des organites entiers⁷.

I) 1. 4. Fusion et fission

A travers les processus cellulaires généraux comme l'endocytose, l'exocytose, la cytokinèse, ou plus spécifiques comme la phagocytose, la fusion des gamètes, la fusion ou la fission de la membrane plasmique participent à diverses fonctions cellulaires^{8,9,10}. En effet, la membrane plasmique est constamment remodelée, à travers la synthèse, le recyclage ou le transport des constituants membranaires et la fusion ou la fission des différents types de vésicules est finement régulée. Cependant, certains organismes pathogènes comme les virus sont capables de détourner ces mécanismes d'internalisation et d'export afin de pénétrer plus facilement au sein des cellules cibles, mais aussi d'en ressortir de façon efficace^{11,12}.

Dans le cas du VIH, la fusion et le bourgeonnement du virion se réaliseraient directement à la membrane plasmique. L'entrée et la sortie du virion nécessitent la présence de certaines protéines transmembranaires pour l'adhésion ou l'assemblage à la membrane, puis le déclenchement du processus de fusion ou de bourgeonnement^{13,14}. A l'heure actuelle, même si la plupart de ces protéines sont connues, le mécanisme de recrutement et d'action de ces différentes molécules reste à éclaircir (voir le chapitre III).

I) 2. Composition moléculaire

Depuis les premières observations sur les cellules végétales de Robert Hooke au 17^{ème} siècle au développement des techniques d'ultracentrifugation et de spectrométrie de masse notamment, des progrès considérables ont été réalisés dans la caractérisation des éléments fondamentaux de la membrane plasmique.

I) 2. 1. Lipides membranaires

Dès 1899, grâce aux expériences d'Overton sur la pénétration membranaire de composés chimiques, il est établi que la membrane plasmique est constituée essentiellement de lipides¹⁵.

I) 2. 1. 1. Les glycérophospholipides (ou phosphatides)

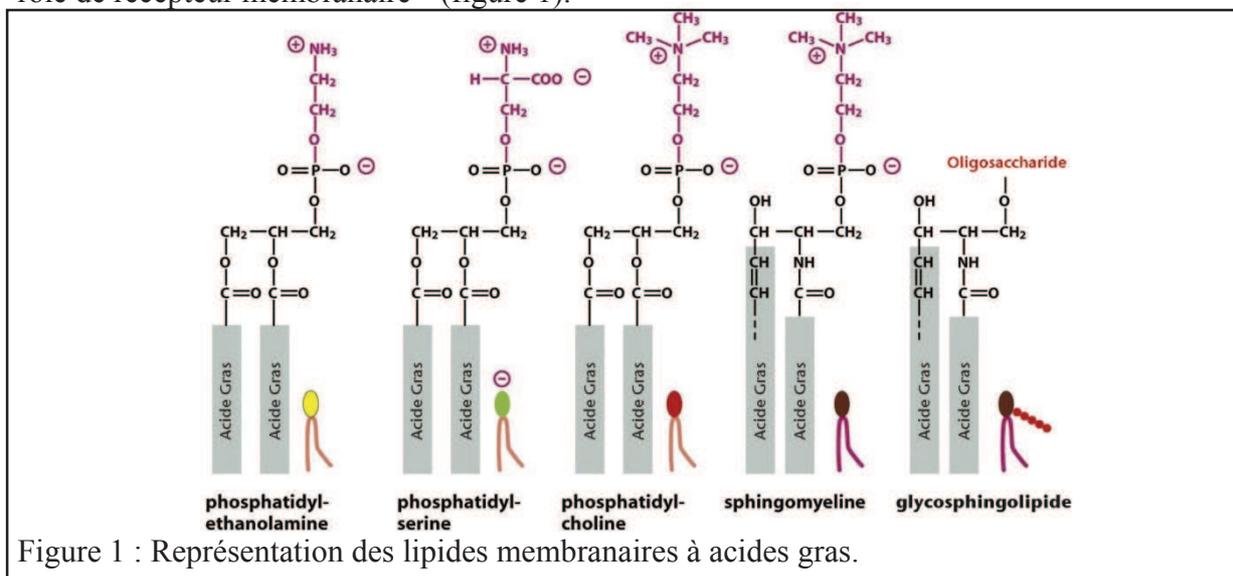
Ces lipides se composent d'une tête polaire et d'une partie hydrophobe qui s'organisent en bicouche. La région hydrophile est un glycérol estérifié en position 3 par un groupement phosphorylcholine, phosphorylsérine, phosphoryléthanolamine, ou phosphorylinositol, pour donner respectivement la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidyléthanolamine (PE), ou le phosphatidylinositol (PI). En position 1 et 2, sont présents des acides gras dont la taille et le nombre d'insaturations sont variables¹⁶.

La présence de PI à l'état biphosphate (PIP2), est importante dans la signalisation¹⁷. Contrairement aux autres glycérophospholipides qui sont neutres à pH physiologique, la PS est chargé négativement, sa répartition asymétrique étant liée à la différence de potentiel électrique de la membrane¹⁸.

I) 2. 1. 2. Les sphingolipides

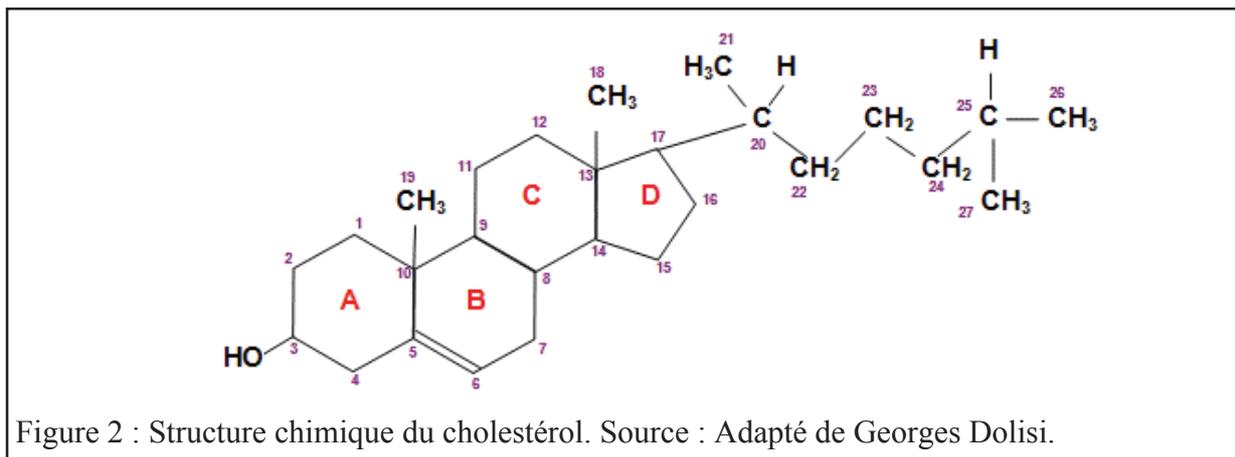
Par rapport aux glycérophospholipides, le glycérol est substitué par un aminoalcool avec une chaîne de 18 carbones, monoinsaturée en position 4-5. Le céramide ainsi formé peut se lier à une phosphorylcholine pour donner la sphingomyéline (SM).

Lorsque la SM (lipide retrouvée exclusivement sur le feuillet externe) est liée à un oligosaccharide comme l'acide sialique, il forme un glycosphingolipide et en particulier un ganglioside (GM ou GD, s'il y a une ou deux chaînes de sucres), molécule capable de jouer le rôle de récepteur membranaire¹⁹ (figure 1).

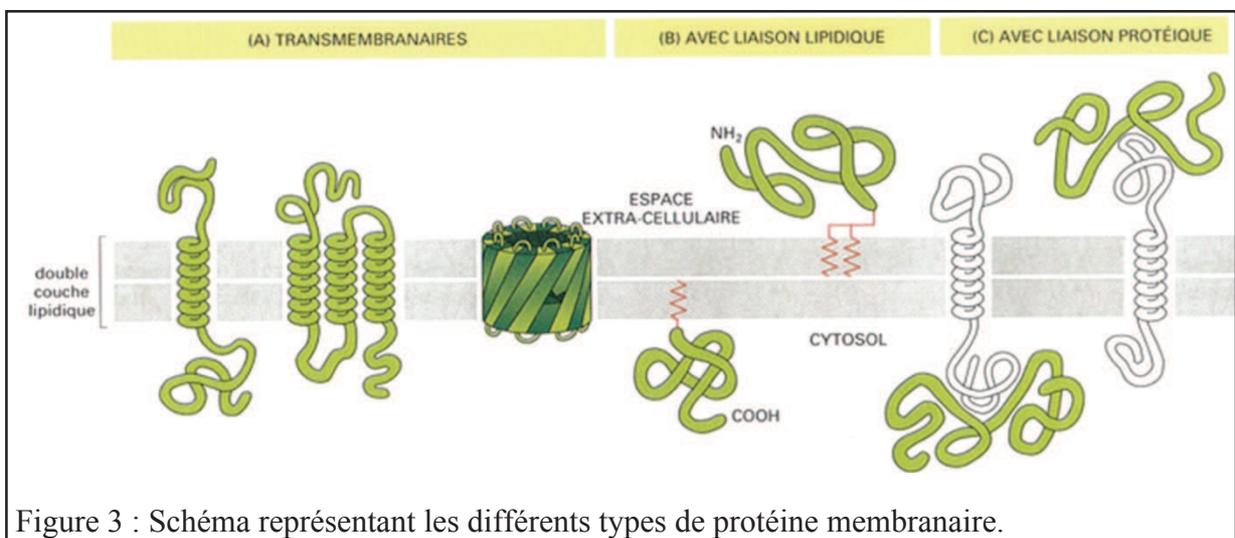


I) 2. 1. 3. Le cholestérol

Ce membre de la famille des stérols représente plus de 30% (en moles) des lipides membranaires et malgré le caractère hydrophobe de ses quatre cycles carbonés, il possède un caractère amphiphile, grâce à son groupement hydroxyl en position 3 (figure 2). Outre son importance dans la régulation de la fluidité membranaire, le cholestérol est un précurseur de molécules comme les hormones stéroïdiennes, les acides biliaires ou la vitamine D³²⁰.

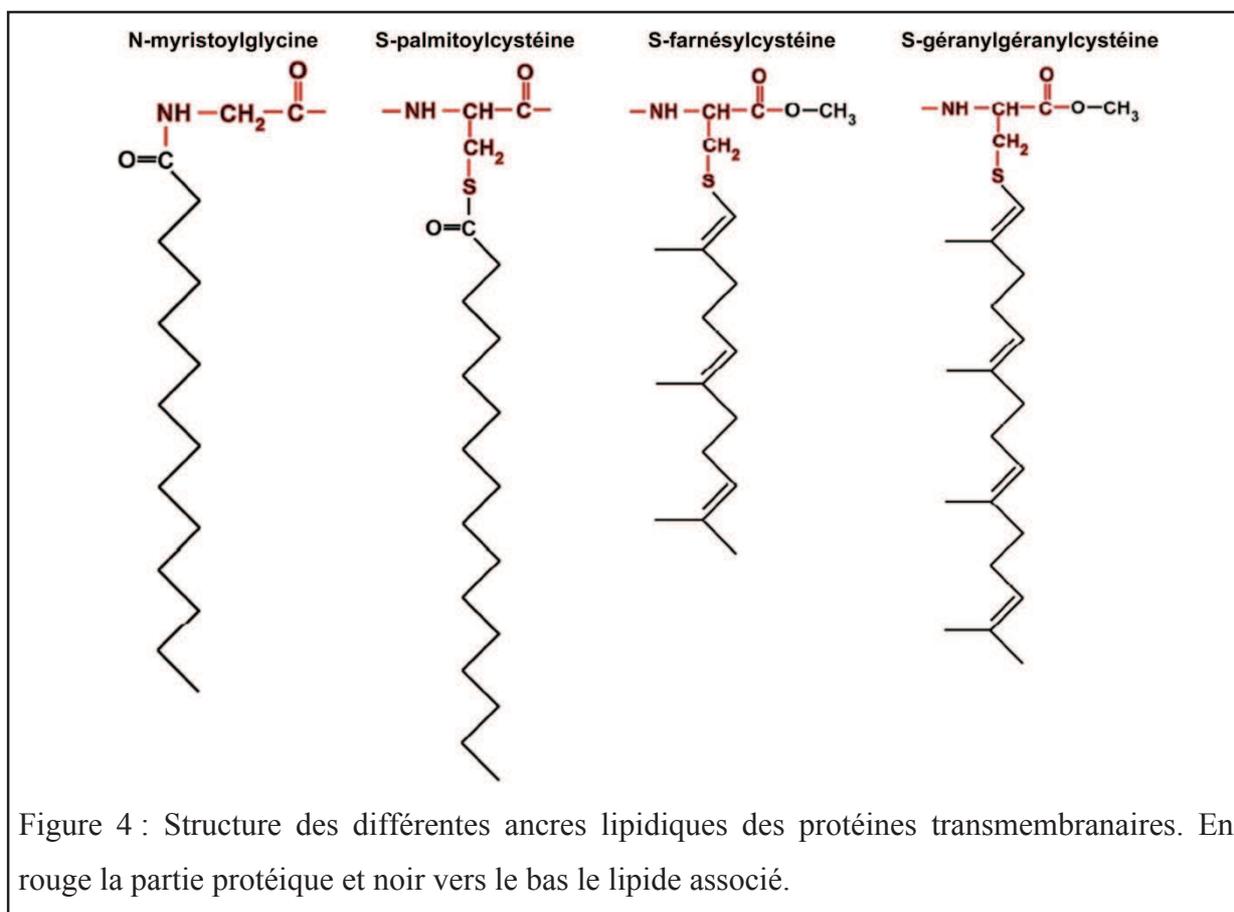


I) 2. 2. Protéines membranaires



La masse totale des protéines à la membrane plasmique représente environ la moitié de l'ensemble des composants membranaires. En effet, qu'elles participent à l'organisation structurale de la membrane elle-même ou aux processus d'adhésion, de migration, de signalisation, ou de remodelage, en tant que récepteur, canal, ou encore point d'ancrage et d'interaction, ces protéines sont essentielles à toutes les fonctions décrites précédemment (chapitre I. 2. 1.).

L'adoption de structures en tonneaux β est une possibilité d'ancrage à la membrane. L'attachement à la membrane plasmique peut aussi se faire via une ancre lipidique. La liaison de la protéine à un groupement GlycosylPhosphatidylinositol (GPI) permet son adressage au feuillet externe la bicouche lipidique²¹ (figure 3). D'autres modifications post-traductionnelles telles que la myristoylation (amidification d'une glycine par un groupe miristyl), la farnésylation et la géranylgeranylation (liaison thio-éther d'un isoprényl) ou la palmitoylation (thio-esthérification d'une cystéine libre), permettent l'ancrage de protéines sur le feuillet interne de la membrane plasmique. Ceci est valable pour un certain nombre de protéines de signalisation. Dans la majorité des cas, la localisation membranaire est due à la présence d'un ou plusieurs domaines transmembranaires, la plupart constitués d'une hélice α exposant des résidus hydrophobes au niveau de la traversée de la membrane. Parmi ce type de protéines on retrouve les récepteurs couplés aux protéines G ou GPCRs (G-Protein Coupled Receptors)²². Certaines protéines transmembranaires ont en plus une modification post-traductionnelle telle que la N-myristoylation ou la palmitoylation²³ (figure 4). Les tétraspanines sont un exemple de ce dernier type de modification. Enfin, des protéines comme gp120 sont localisées à la membrane grâce à leur liaison avec d'autres protéines transmembranaires²⁴.



I) 2. 3. Glycocalix

La glycosylation des lipides et des protéines membranaires induit la formation d'un réseau osidique dense du côté extracellulaire : le glycocalix. Ainsi, à la membrane plasmique, les protéines N-, O- ou C-glycosylées et les glycolipides tels que les glycosphingolipides participent à la protection de la cellule, ainsi qu'à certains phénomènes de reconnaissance et d'adhésion spécifiques²⁵ (figure 5).

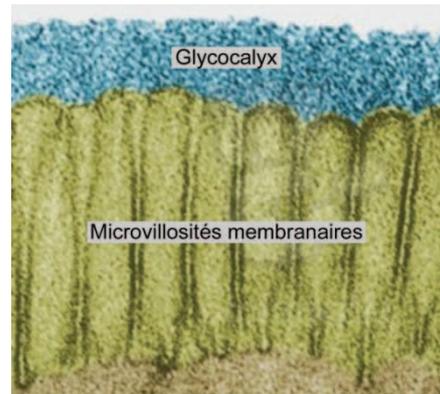


Figure 5: Coupe de cellule épithéliale de l'intestin vue en MET

I) 3. Organisation Structurale

Les différents constituants membranaires s'organisent dans le temps et l'espace selon leur adressage initial et leurs interactions spécifiques avec les autres molécules de la membrane ou à proximité de celle-ci.

I) 3. 1. Interactions entre lipides et protéines

Bien que minoritaires en nombre de moles, les protéines membranaires constituent près de 50% de la masse de la membrane plasmique. Leur taille particulièrement importante, par rapport aux lipides, induirait autour des protéines transmembranaires des mésappariements hydrophobes qui pourraient être compensés par des courbures membranaires, ou le recrutement de lipides avec une longueur de chaînes d'acide gras adaptée, ou d'enrichissement en cholestérol²⁶.

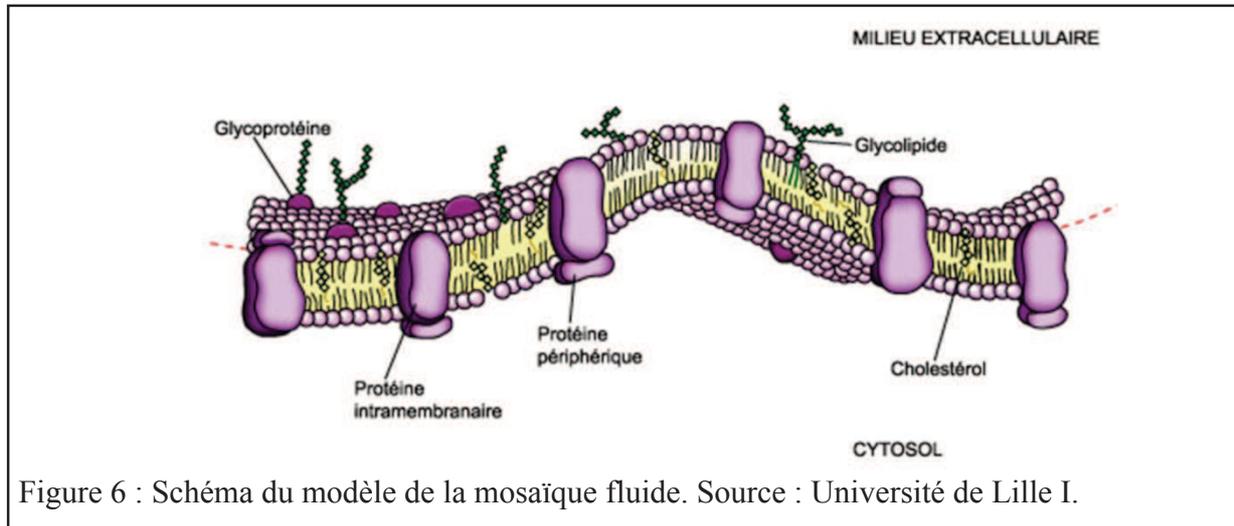
Lorsque certaines protéines sont particulièrement concentrées, elles peuvent aussi modifier la perméabilité membranaire, voire induire la formation de vésicules ou de tubules. Ces structures participent en général au transport de molécules entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule et réciproquement^{27,28}.

Enfin, les lipides entourant certains canaux protéiques sont susceptibles d'altérer leur fonctionnement en fonction de leur nature, de la température et du pH^{29,30}.

I) 3. 2. Hétérogénéité et asymétrie membranaire

Dans les années 1970, les avancées en biochimie et en microscopie (comme la cryofracture membranaire associée à la microscopie électronique à transmission) révèlent une répartition différente des lipides entre chaque feuillet et un agencement hétérogène des protéines³¹.

Ces observations, couplées aux mesures de diffusion et de viscosité différentielle entre la membrane interne et externe permettent à Singer et Nicholson de proposer le modèle de la mosaïque fluide pour expliquer l'organisation membranaire^{32,33,34}. Selon ce paradigme, la bicouche lipidique serait un espace visqueux relativement plane, au sein duquel des complexes protéiques diffuseraient librement³⁵ (figure 6).



Cependant, dès 1975, les expériences sur les membranes modèles montrent qu'en fonction de la température, les lipides sont capables de former des transitions de phase. En d'autres termes, au dessus de la température critique T_m (Temperature of melting), la bicouche adopte une structure dite « Liquide désordonnée » (L_d) ou état « cristal liquide » (L_α). En dessous du T_m , la membrane se comporte comme une « phase gel » (L_β') : les chaînes d'acides gras sont moins mobiles et étendues, leurs liaisons C-C deviennent toutes parallèles, réduisant la surface occupée par chaque lipide, au profit d'un certain gain de hauteur. Ce T_m dépend de la longueur et de l'insaturation des chaînes d'acides gras, si bien qu'il est spécifique de chaque lipide. Ainsi, en fonction de la composition lipidique, il est déjà envisageable de remettre en question la fluidité absolue de toute la membrane plasmique^{36,37}. De plus, d'autres études ont montré plus tard que dans le cas de bicouches à T_m élevé (sensées se stabiliser en L_β') et contenant du cholestérol, les lipides s'organisent comme dans une phase gel (chaînes d'acide gras orientées), tout en gardant une capacité de diffusion proche de celle d'une phase fluide. En parallèle, des expériences d'addition de cholestérol à une phase cette fois de type L_α ont aussi conduit à la formation d'une phase intermédiaire, nommée « liquide ordonnée » (L_o). Le cholestérol est donc capable de s'intercaler entre les glycérolipides et d'interagir avec les zones flexibles des acides gras pour former une phase intermédiaire thermodynamiquement plus stable^{38,39,40} (figure 7).

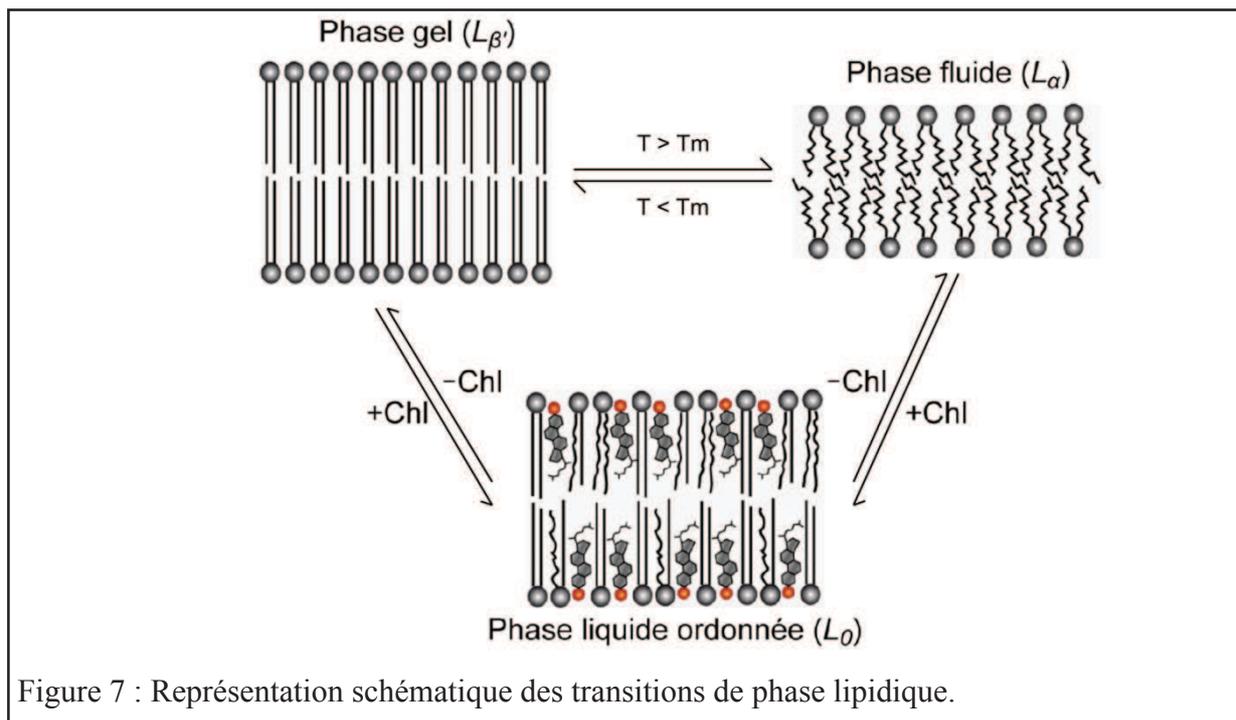


Figure 7 : Représentation schématique des transitions de phase lipidique.

Bien que l'existence *in vivo* de la phase fluide soit généralement acceptée, l'existence proprement dite de phase liquide ordonnée et encore moins de phase gel au sein de la membrane plasmique n'est pas admise par toute la communauté scientifique. Cependant, les progrès en microscopie de fluorescence, en particulier à l'échelle de la molécule unique, permettent maintenant d'affirmer que la bicouche lipidique n'est pas une surface fluide continue où diffusent librement les protéines.

La membrane plasmique serait plutôt constituée d'une matrice lipidique hétérogène et asymétrique, contenant un ensemble dense de nano ou de microdomaines riches en protéines. Chacun de ces domaines contiendrait spécifiquement ou non certains types de lipides, qui leur confèreraient des propriétés viscoélastiques et structurales déterminantes pour leur stabilité et leurs fonctions^{41,42}. Ces différents types de domaines décrits dans la littérature sont présentés successivement dans les parties suivantes.

I) 3. 3. Radeaux lipidiques

Bien que l'asymétrie membranaire entre les deux feuilletts soit connue depuis longtemps, avec notamment la répartition en externe des sphingolipides et en interne des PE et PS, il faut attendre les expériences sur la distribution membranaire différentielle des protéines à ancre GPI, des sphingolipides et PC dans les cellules épithéliales pour voir émerger un premier modèle de microdomaines protéiques.

En effet, ces cellules adhérentes polarisées se composent d'une membrane apicale riche en sphingolipides et en protéines à ancre GPI, ce qui n'est pas le cas de leur membrane basale, qui est plutôt enrichie en PC. S'appuyant sur ces dernières données et les résultats obtenus sur les membranes modèles, l'hypothèse alors émise est que, lors de l'adressage spécifique des protéines à ancre GPI vers le pôle apical de la cellule, celles-ci emportent avec elles les dits sphingolipides, dans une phase liquide ordonnée où le cholestérol privilégie et stabilise les interactions entre lipides et protéines : les radeaux lipidiques (lipid rafts)^{43,44,45,46}.

Pour confirmer cette hypothèse, des expériences d'extraction en milieu dénaturant montrent dans un premier temps qu'il existe en effet des fractions membranaires résistantes aux détergents non ioniques. Ces DRM (Detergent Resistant Membranes), initialement identifiées pour des cellules épithéliales traitées au Triton X-100 à 4°C, sont des fractions légères qui peuvent être séparées des autres constituants membranaires après centrifugation sur gradient de sucrose. Cette propriété s'explique par un enrichissement en lipide de ces fragments membranaires. Ainsi, ces fractions se composent de certaines protéines GPI, et d'un ratio équimolaire de cholestérol, glycérophospholipide et sphingolipide. Pour d'autres types cellulaires et en utilisant des détergents différents, les DRM contiennent aussi des protéines palmitoylées, ou des protéines solubles comme les protéines G^{47,48,49}.

Afin de confirmer *in vitro* l'existence de ces domaines, de nombreux travaux sont alors entrepris sur membranes modèles, en utilisant des techniques comme la microscopie à force atomique (ou AFM : Atomic Force Microscopy), le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (ou FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching), la spectroscopie de corrélation de fluorescence (ou FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy), ou la calorimétrie différentielle à balayage. Ces expériences montrent qu'au sein de membranes modèles reconstituées à partir des mélanges identifiés dans les DRMs (riches en cholestérol, sphingolipides et protéines à ancre GPI), il se forme des microdomaines d'un nanomètre à un micron de diamètre, en phase liquide ordonnée, enrichis en protéines^{50,51,52}.

Cependant, l'utilisation de détergents comme le Triton X-100 et la température de 4°C pouvaient induire de façon artéfactuelle la formation de ces domaines, en remodelant complètement les interactions au sein de la membrane. De plus, les extractions réalisées avec d'autres détergents comme le Tween 20, les Brij 58/96/98 ou le CHAPS, montrent des profils lipidiques différents. Ces résultats contradictoires traduisent donc une influence non négligeable du détergent dans cette méthode de caractérisation des microdomaines^{53,54,55,56,57,58}.

C'est pourquoi le développement de techniques d'extraction sans détergent telles que la sonication ou l'utilisation de carbonate de sodium apporte des données complémentaires. En effet, avec ces méthodes, il est aussi possible d'extraire des fractions enrichies en sphingolipides et en cholestérol, qui ressemblent dans leur composition à celles obtenues avec le Brij 96 ou le Brij 98. Mais de façon remarquable, ces fractions légères sont aussi particulièrement enrichies en certains lipides et protéines indépendantes des rafts initialement décrits. Par conséquent, ces résultats suggèrent que ces méthodes génèrent aussi des artefacts de formation d'autres types de domaines, ou qu'il existe une hétérogénéité et/ou une dynamique entre ces structures membranaires, rendant difficile leur regroupement systématique sous la même dénomination de *raft* lipidique^{59,60} (figure 8).

Afin de clarifier cette définition des radeaux lipidiques, voire de confirmer leur existence *in vivo*, il est apparu alors nécessaire de trouver des outils pour visualiser directement la répartition membranaire des protéines et en particulier de celles qui possèdent une ancre GPI, par rapport à la composition lipidique locale. Les premières études concluantes portent sur les structures très particulières que sont les cavéoles, invaginations de quelques dizaines de nanomètres enrichies en protéines à ancre GPI, SM et cholestérol, qui participent à des processus de transport de molécules à partir de la membrane comme l'endocytose, la signalisation ou l'entrée de pathogènes^{61,62}. Les expériences biochimiques montrent l'existence de ces complexes, en particulier après pontage entre plusieurs protéines GPI⁶³. Pourtant, les premières observations *in vivo* de ces protéines en microscopie de fluorescence n'ont laissé apparaître qu'un marquage diffus, suggérant que ces *rafts* seraient trop petits ou trop dynamiques pour être révélés ainsi⁶⁴.

L'amélioration des techniques de microscopie et de spectroscopie de fluorescence, en particulier au niveau de la résolution spatiale, permet au final la caractérisation de clusters enrichis en protéines à ancre GPI et dépendants du cholestérol. Cependant, d'un type cellulaire à l'autre, ou entre les différentes protéines marquées, voire au sein de la même cellule, il semble exister une diversité très large dans la taille de ces zones enrichies, lorsqu'elles sont effectivement présentes^{65,66,67,68,69} (figure 9).

A partir de l'ensemble de ces résultats, différents modèles ont émergé pour expliquer la présence, la formation, la répartition, la dynamique, voire la fonction de ces radeaux lipidiques. Maxfield propose que la membrane plasmique soit un patchwork de différents domaines lipidiques, tandis que Anderson et Jacobson imaginent qu'il existe des complexes préformés, enrichis en cholestérol, en sphingolipides et en certaines protéines spécifiques, qui peuvent s'associer les uns avec les autres (par coalescence) dans certaines conditions^{70,71}.

Mayor quant à lui suggère que ces nanodomains préassemblés puissent former des domaines plus grands lorsqu'ils sont activés afin d'accomplir leur rôle physiologique⁷². Face à ces résultats et ces visions souvent contradictoires, une définition consensuelle des radeaux lipidiques est finalement proposée lors du Keystone symposium en 2006 : « *les rafts membranaires sont des domaines de petite taille (entre 10 et 200 nanomètres), hétérogènes, très dynamiques, enrichis en stérols et sphingolipides et qui peuvent compartimenter les processus cellulaires. Les rafts de petite taille peuvent parfois se concentrer pour former de plus grandes plateformes au travers d'interactions protéine-protéine et lipide-lipide* »⁷³. Cette définition illustre bien la difficulté pour la communauté scientifique de regrouper dans une même appellation des structures dont la composition, la taille, ou même l'existence, dépend de la technique ou du type cellulaire utilisés, des protéines ou les lipides d'intérêt, voire de la phase du cycle cellulaire ou de l'état d'activation des différentes voies de signalisation. Ainsi, le terme de *raft* est progressivement substitué par la dénomination de microdomaine lipidique, ou lorsqu'elles sont identifiées par un domaine enrichi en protéines⁷⁴ (figure 10).

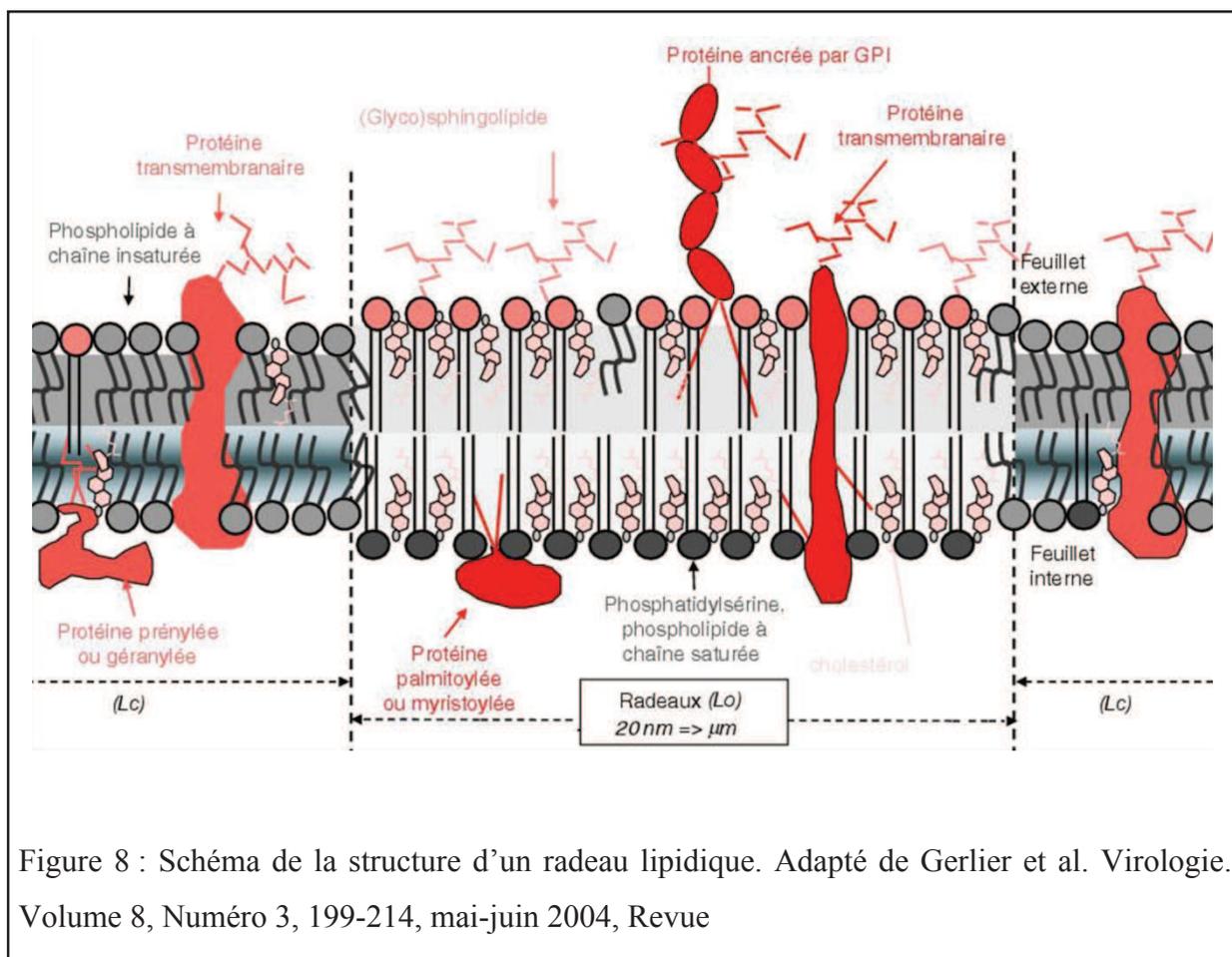


Figure 8 : Schéma de la structure d'un radeau lipidique. Adapté de Gerlier et al. *Virologie*. Volume 8, Numéro 3, 199-214, mai-juin 2004, Revue

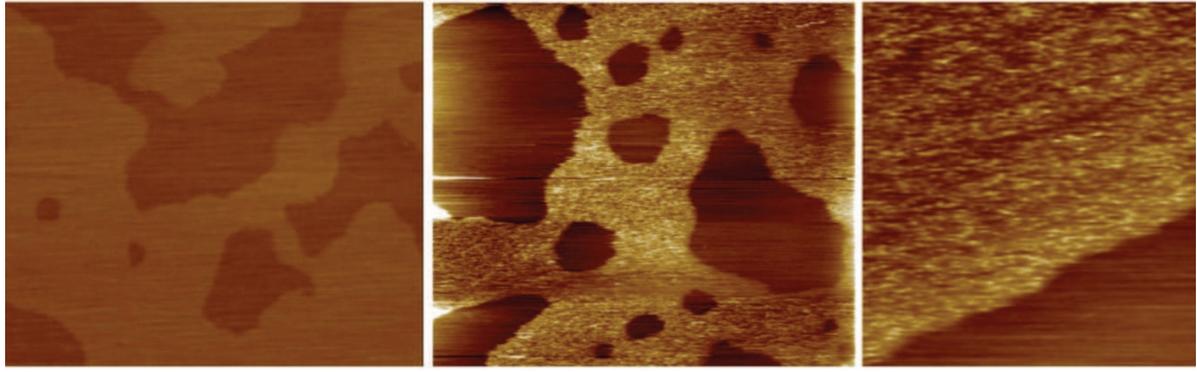
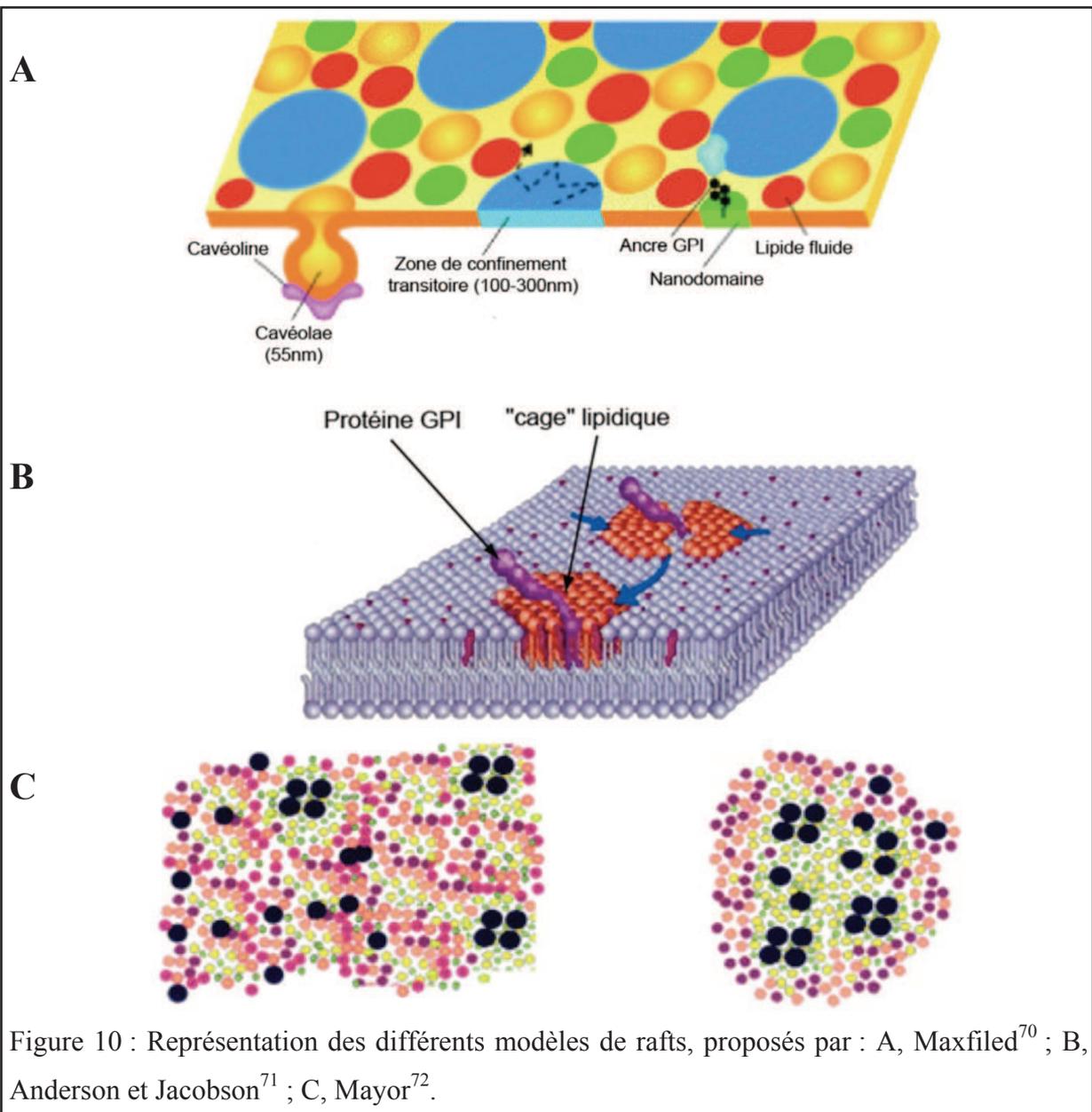


Figure 9 : Images AFM de membranes modèles constituées de DOPC, SM et cholestérol (image de gauche), avec l'insertion dans des domaines en phase *Lo* de protéines GPI (image du centre et de droite)⁵⁰.

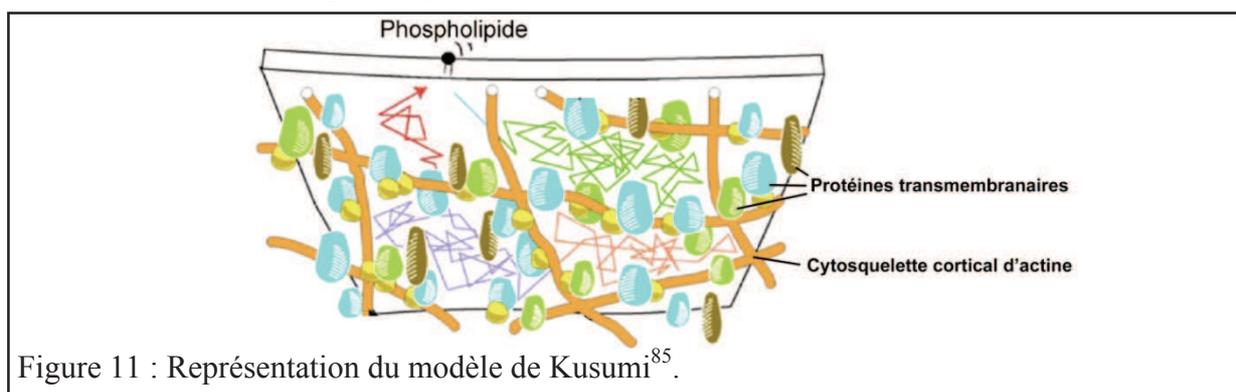


I) 3. 4. Compartiments dépendants du cytosquelette

Le cytosquelette, en particulier le réseau d'actine sous membranaire, est un maillage protéique dense mais dynamique, lié directement ou indirectement à certaines protéines de la membrane plasmique. En effet, en raison de sa proximité avec la membrane (quelques nanomètres), le réseau cortical d'actine est capable d'interagir spécifiquement ou non avec les éléments de la membrane plasmique, soit parce qu'une protéine membranaire possède un prolongement cytoplasmique assez long pour interagir directement avec ce réseau, soit parce qu'une protéine intermédiaire s'associe d'une part à l'actine et d'autre part à la membrane plasmique. Il n'est donc pas surprenant que des études sur l'influence de la déstabilisation du réseau d'actine sur la dynamique membranaire montrent d'une part une augmentation de la diffusion latérale de nombreuses protéines membranaires et d'autre part la réduction du nombre et/ou de la taille de certains domaines de type raft ou enrichis en protéines^{75,76,77,78,79,80,81,82,83,84}.

Cependant, il faut attendre les travaux de Kusumi en suivi de particule unique pour que des arguments concrets émergent en faveur d'un modèle de compartimentation dépendant du cytosquelette⁸⁵ (figure 11). En effet, ses expériences montrent que la diffusion latérale des protéines peut être restreinte à des domaines dont la taille (300nm) correspond à celle des mailles formées par le réseau d'actine cortical (microscopie électronique)⁸⁶. De plus, certaines de ces trajectoires présentent une succession de sauts d'un compartiment à un autre (hop diffusion)⁸⁷. Ce comportement est expliqué par le modèle *fence picket*, dans lequel le cytosquelette, associé à des protéines transmembranaires d'ancrage, formerait des barrières et des piquets que les protéines membranaires ne pourraient franchir que transitoirement pour passer d'un compartiment à l'autre, en fonction du remodelage de ce réseau⁸⁸. Toutefois, ce comportement n'est observé que pour des temps d'acquisition très courts (25 μ s).

Le cytosquelette est ainsi directement impliqué dans la ségrégation de certains récepteurs à l'acétylcholine aux jonction neuromusculaire, ou dans l'exclusion de la podocalyxine au niveau des cils des cellules épithéliales, notamment grâce à des protéines intermédiaires entre l'actine et la membrane plasmique comme les ERM (Ezrine, Radixin, Moésine)^{89,90,91}.



Cependant, d'autres études en FCS ou utilisant le suivi de molécules uniques à haute vitesse montrent que pour certaines protéines liées au feuillet externe de la membrane plasmique, ce type de compartimentation n'est pas observée, remettant en cause ce modèle^{42,92}. Quoiqu'il en soit, il semble clair qu'il existe des protéines et des lipides membranaires dont la diffusion est indépendante de ce réseau d'actine.

I) 3. 4. Domaines à base protéique

Indépendamment des points d'ancrage au cytosquelette, ou des compartiments enrichis en certains lipides ou délimités par le réseau cortical d'actine, certaines protéines sont capables de s'associer les unes avec les autres à la membrane plasmique. Ces processus reposent pour la plupart sur l'homomère ou l'hétéro-oligomérisation de protéines dont les interactions conduisent à la formation d'oligomères, puis de structures plus complexes à la membrane. C'est le cas notamment de la syntaxine et la synaptogamine qui forment spontanément des clusters, impliqués dans la fusion et le transport vésiculaires^{93,94,95}.

De façon intéressante, des simulations Monte Carlo reposant sur les travaux sur les colloïdes et la bactériorhodopsine permettent de généraliser l'hypothèse selon laquelle les protéines membranaires pourraient former spontanément des complexes stables dans le temps et l'espace, uniquement grâce à un réseau dynamique d'interactions. Ainsi, les forces locales d'attraction et de répulsion entre les différentes protéines conduiraient à la constitution de plateformes de quelques nanomètres, susceptibles de s'agréger en clusters de taille plus importante, sans pour autant dépasser une certaine surface^{96,97,98}.

Cependant, il ne faut pas négliger le fait qu'en parallèle de ces assemblages spontanés, les lipides membranaires et les protéines du cytosquelette peuvent être intégrés à ces complexes à base protéique. Ainsi, la synapse immunologique est un domaine membranaire morphologiquement stable, constitué des protéines CD2, LAT et Lck, en échange permanent entre le cluster et le reste de la membrane plasmique. Bien qu'il ne soit pas associé aux *rafts*, ce type de structures serait inclus dans une phase liquide ordonnée. De plus, leur stabilité est dépendante de la concentration en cholestérol membranaire. Par ailleurs, le cytosquelette d'actine est impliqué dans la formation de la synapse, mais pas dans sa stabilisation^{99,100,101}.

Le cloisonnement entre les différents types de domaines membranaires tend donc à tomber, laissant place à l'idée selon laquelle certains lipides et protéines interagissent pour former des zones en échange avec le reste de la membrane, dont la constitution et la stabilité peuvent dépendre du cytosquelette. Ce type de domaine mixte caractérise en particulier les zones enrichies en tétraspanines (chapitre II. 3).

II) Les tétraspanines, organisateurs de la membrane plasmique

« Une rencontre n'est que le commencement d'une séparation »

Proverbe japonais

II) 1. Présentation générale

II) 1. 1. Phylogénie et diversité

Les tétraspanines forment une famille de protéines exprimées dans tous les types cellulaires des animaux, mais aussi chez les plantes, les organismes fongiques et même les amibes. 33 tétraspanines différentes sont identifiées chez l'homme et près de 260 séquences homologues sont au total répertoriées, des angiospermes aux échinodermes^{102,103,104,105,106,107,108,109}.

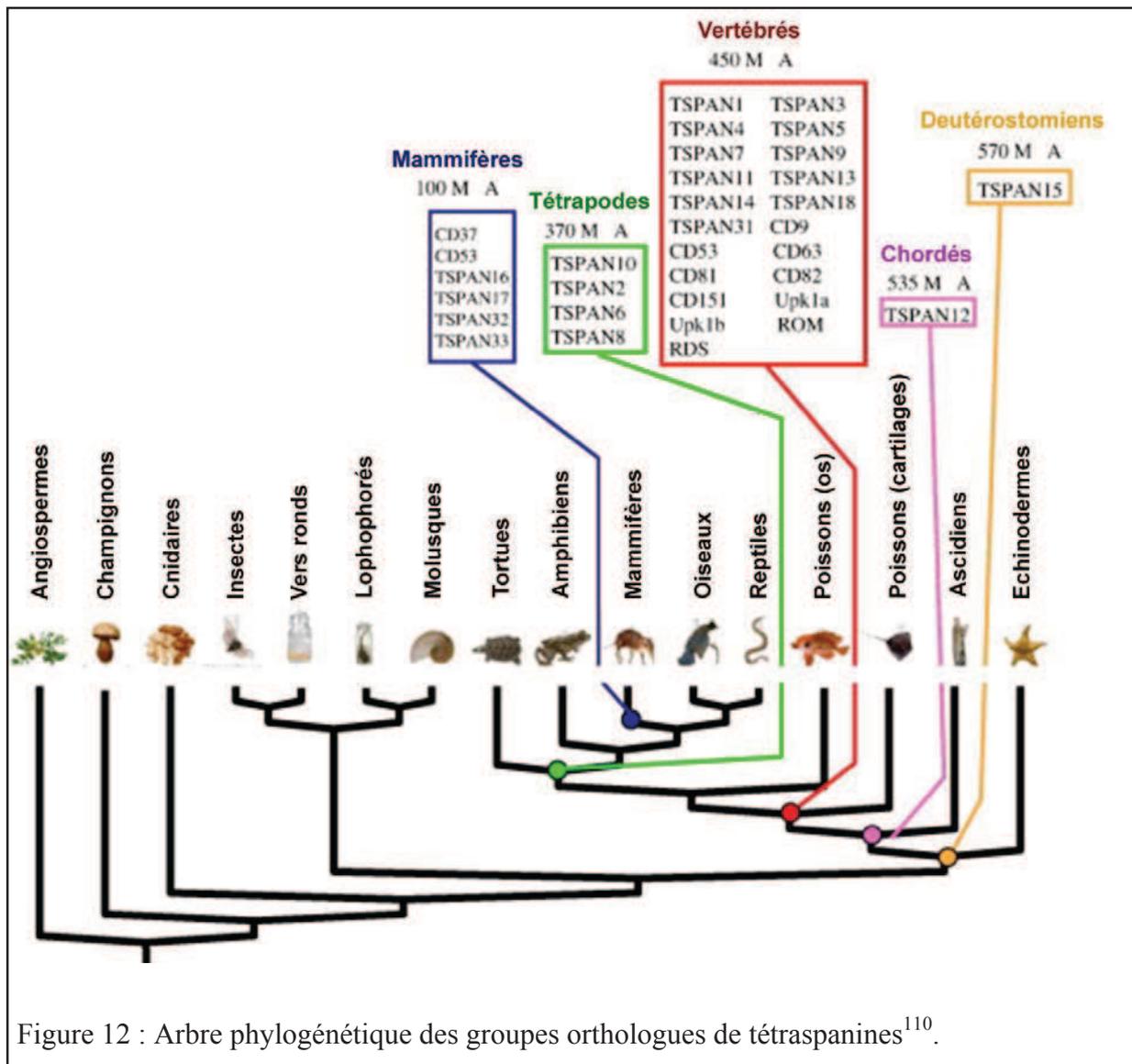


Figure 12 : Arbre phylogénétique des groupes orthologues de tétraspanines¹¹⁰.

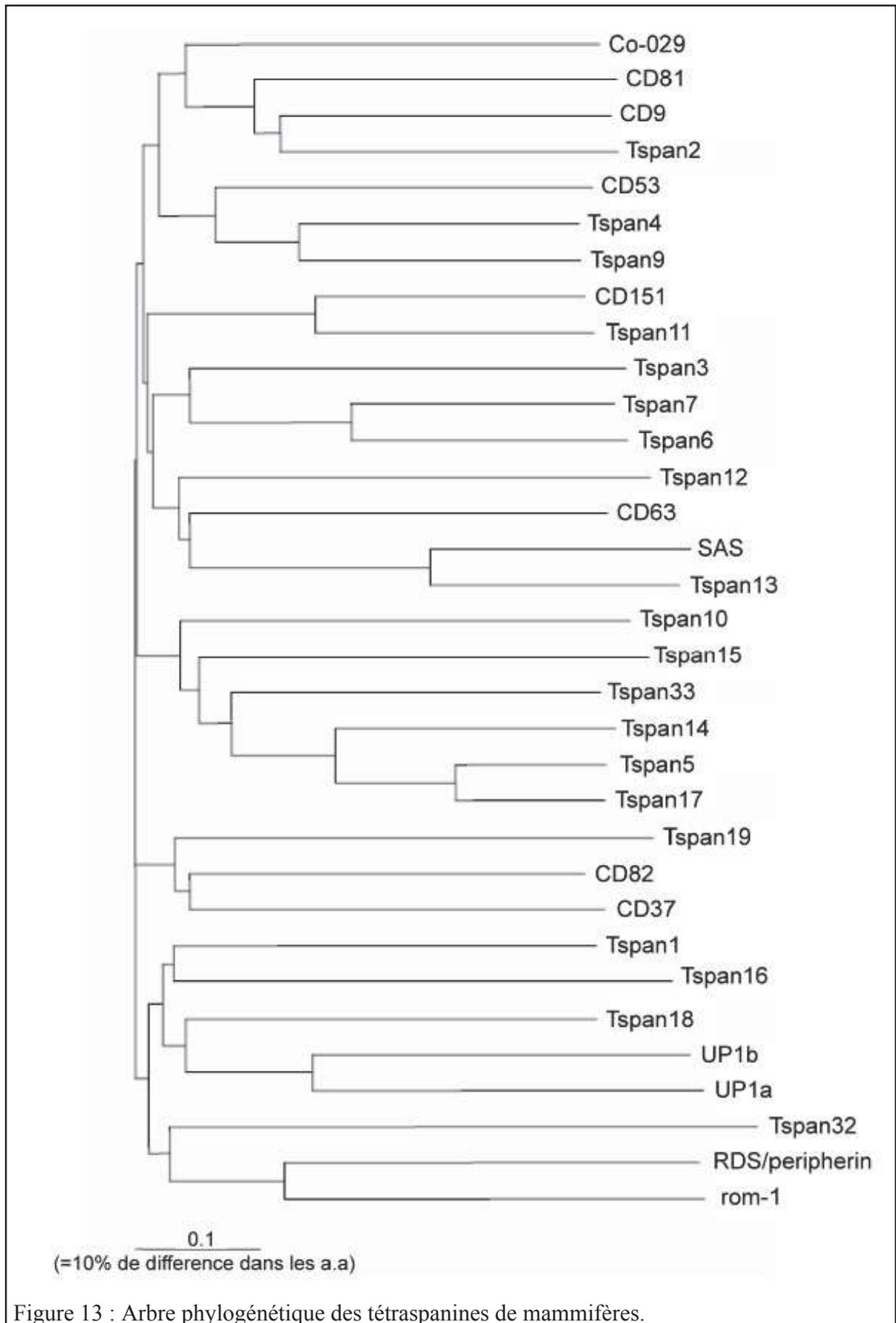
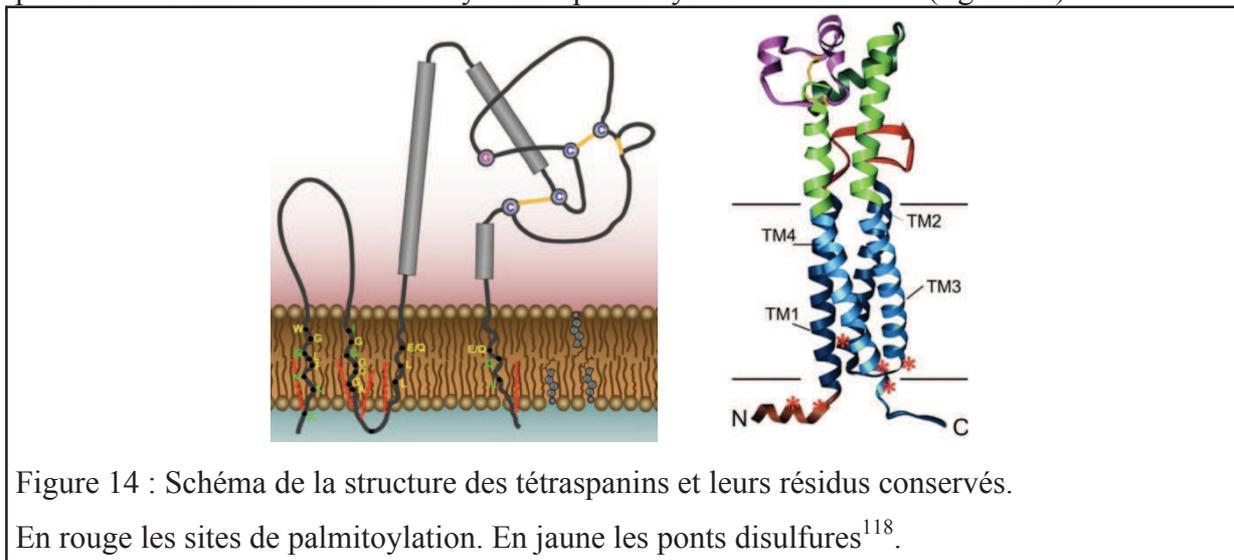


Figure 13 : Arbre phylogénétique des tétraspanines de mammifères.

L'ensemble des études phylogénétiques sur les tétraspanines montre une homologie importante entre les nombreux membres de cette famille. Ces résultats suggèrent qu'à partir d'un ancêtre commun particulièrement lointain, une série de duplications et divergences conduisent à un large panel de tétraspanines (figures 12 et 13). La pression de sélection n'ayant pas affecté la redondance de ces protéines, il est envisageable que la coexistence de nombreuses tétraspanines dans les cellules humaines traduise de l'importance de ces protéines dans des processus biologiques majeurs de part une spécialisation de la plupart d'entre elles, ainsi qu'une complémentarité de certaines, les unes par rapport aux autres^{110,111,112}.

II) 1. 2. Structure et modifications post traductionnelles

Parmi les protéines à quatre domaines transmembranaires, les tétraspanines sont caractérisées par leur taille relativement petite (entre 204 et 355 acides aminés), leurs extrémités (N-terminale et C-terminale) cytoplasmiques, la différence de longueur entre leur grande et leur petite boucle extracellulaire, ainsi que leurs nombreux résidus conservés dont le motif CCG impliqué dans la structure de la boucle extracellulaire 2 (EC2), ou les sites de modifications post-traductionnelles comme des cystéines palmitoylées^{113,114,115,116,117} (figure 14).



II) 1. 2. 1. Les régions cytoplasmiques

Les extrémités N-terminale et C-terminale, de 8 à 21 acides aminés, sont disposées du côté cytoplasmique. La première ne contient pas de séquence d'homologie importante, mais pourrait former une hélice alpha contenant des résidus chargés positivement ainsi qu'un site de palmitoylation favorisant l'ancrage dans la membrane interne. La seconde a aussi une séquence assez dégénérée, mais possède tout de même, en général, un site de palmitoylation, parfois un site d'interaction avec les protéines PDZ liées notamment au cytosquelette.

L'extrémité C-terminale de CD63, contient aussi un motif GYEVVM d'adressage lysosomal et une séquence en lien avec l'internalisation dépendante de la clathrine. Il est établi depuis peu que certaines tétraspanines comme CD82 et CD151 contiennent au niveau de leur extrémité N-terminale, des lysines qui sont ubiquitinyllées en vue de leur dégradation. Enfin, la petite boucle intracellulaire, avec moins de cinq acides aminés, ne serait pas structurée, mais possède jusqu'à trois sites supplémentaires de palmitoylation^{118,119,120,121,122,123,124}.

II) 1. 2. 2. Les portions transmembranaires

Les alignements de séquences montrent une homologie particulièrement importante dans ces régions, notamment pour un certain nombre de résidus hydrophiles qui participeraient à la stabilisation des quatre régions transmembranaires. En effet, des expériences de modélisation moléculaire révèlent que ces zones se structurent en hélices alpha, qui se lieraient les unes aux autres, notamment par des liaisons entre leurs résidus polaires, orientées vers le centre de la protéine. Il faut remarquer que certains de ces acides aminés très conservés pourraient aussi participer à la stabilisation de liaisons intermoléculaires entre des tétraspanines^{125,126,127,128}. L'importance de chacune de ces régions dans la structure tertiaire n'est pas équivalente d'une tétraspanine à l'autre. En effet, la délétion du TM1 de CD82 suffit pour induire son agrégation et sa rétention dans le réticulum endoplasmique, alors que pour CD9, c'est la délétion des TM2 et TM3 ou du TM4-C-ter qui suffit à déstabiliser sa structure^{129,130,131}.

II) 1. 2. 3. Les boucles extracellulaires

La boucle extracellulaire 1 (EC1), constituée de 15 à 31 résidus, est la plus courte et la moins étudiée des deux. Sa séquence est assez peu conservée, mis à part un site de glycosylation pour certaines tétraspanines telles que CD9 ou CD82. La boucle EC2 de 69 à 132 acides aminés est tout aussi dégénérée dans sa séquence, mais possède aussi un site de glycosylation pour la plupart des tétraspanines, à l'exception notable de CD81. Grâce à la cristallisation et à la détermination aux rayons X de la structure tridimensionnelle de cette boucle pour CD81, nous savons maintenant qu'elle se compose de deux hélices alpha antiparallèles (A et E) dans le prolongement des TM3 et TM4, l'hélice A étant liée via un petit coude à une troisième hélice (B). Ces trois hélices forment le domaine conservé de l'EC2, présent chez toutes les tétraspanines, par opposition au domaine variable, qui n'existe que chez certaines d'entre elles comme CD9 et CD81^{132,133}. Cette portion supplémentaire est due à la présence additionnelle des hélices C et D, qui forment avec l'hélice B une région hydrophobe qui pourrait participer à la stabilisation de la structure secondaire de la boucle EC1 en feuillet beta.

Ces hélices complémentaires peuvent aussi contenir une paire de cystéines qui, comme les deux doublons présents dans la partie conservée, forment des ponts disulfures intramoléculaires stabilisant l'ensemble de l'EC2. Ce sous-domaine variable est une région spécifique d'interaction protéine-protéine, que ce soit pour CD81 lors de l'accrochage du virus de l'hépatite C ou pour CD9 lors de la fusion des gamètes¹³⁴. La séquence et la structure fine de cette région sont d'ailleurs déterminantes pour la reconnaissance spécifique de la plupart des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre CD9 ou CD81 entre autres^{135,136}.

II) 1. 3. Localisation cellulaire et expression tissulaire

Bien que la plupart soient localisées à la membrane plasmique (en fonction des tétraspanines observées, de leur repliement, de partenaires auxquelles elles sont associées, du type cellulaire choisi et de son état d'activation), certaines tétraspanines sont retenues spécifiquement dans des compartiments intracellulaires. Comme déjà évoqué, le motif GYEVN de CD63 conduit à son adressage lysosomal, tandis que le repliement incorrect des tétraspanines mène à leur séquestration dans le réticulum endoplasmique suivant un mécanisme dépendant de la calnexine. Dans les lymphocytes B, les tétraspanines CD63, CD82, CD37, CD53 et CD81 sont concentrées dans les compartiments multivésiculaires, CD63 et CD82 formant des complexes d'internalisation avec les récepteurs aux antigènes leucocytaires humains (HLA : Human Leukocyte Antigen)¹³⁷. On retrouve aussi CD63 au niveau des granules des polynucléaires neutrophiles et des plaquettes, ou encore dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales^{138,139}. CD151 peut aussi subir une internalisation dans des vésicules d'endocytose après stimulation du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR)¹⁴⁰. De façon intéressante, de nombreuses tétraspanines sont retrouvées dans les vésicules d'exocytose, mais aussi dans certains virions, comme le VIH-1 qui intègre les tétraspanines CD9 et CD81 dans son enveloppe lors de son bourgeonnement^{141,142,143}. Par ailleurs, dans les spermatozoïdes, seule la tétraspanine CD9 est identifiée à ce jour et elle se localise uniquement au niveau de la membrane de l'acrosome¹⁴⁴.

Dans tous les autres types cellulaires, l'expression constitutive de plusieurs tétraspanines est observée, des plus communes (CD9, CD81, CD63, CD82, CD151) qui sont présentes de façon quasi ubiquitaire, aux plus spécifiques qui s'expriment uniquement dans certains tissus. C'est le cas notamment de CD53 au niveau des leucocytes, de CD37 dans les lymphocytes B, de la péripérine et de Rom-1 dans la rétine, ou encore des uroplakines des urothéliocytes^{145,146,147,148,113}.

II) 2. Fonctions biologiques

Après plus de 20 ans de recherches sur les tétraspanines, de nombreuses zones d'ombre persistent quant à la fonction précise de chacune d'entre elles, ou leur mécanisme d'action dans les différents processus biologiques dans lesquelles ces protéines sont impliquées. Cependant, grâce au développement d'anticorps spécifiques, de techniques biochimiques et biophysiques, il est établi que les tétraspanines influencent l'adhésion, la migration, la signalisation et la fusion cellulaire, notamment dans certains processus infectieux.

II) 2. 1. Implications dans l'adhésion, la migration et la signalisation cellulaire

Les premières études utilisant des anticorps dirigés contre CD9 montrent un effet inhibiteur important sur la migration cellulaire. Alors que la surexpression de CD9 et CD82 inhibe significativement la migration cellulaire, celle de CD151 ou de Co-029 l'augmente, ce qui suggère un rôle antagoniste de ces différentes tétraspanines. D'ailleurs, dans les tissus métastatiques de colon et de prostate, CD151 et Co-029 sont souvent fortement exprimés alors que CD9 et CD82 le sont moins^{149,150,151,152}. Les travaux *in vitro* et *in vivo* confirment que l'expression ectopique de CD9 dans des cellules du colon ralentit la progression tumorale, alors que l'inhibition de l'expression de CD151 a un effet similaire pour le cancer du sein^{153,154,155,156}. Bien que les mécanismes ne soient pas élucidés à l'heure actuelle, il est envisageable que l'implication dans ces processus de CD9, CD82 et CD151 soit due à leur association à des partenaires privilégiés comme la podoplanine, DARC (Duffy Antigen Receptor of Chemiokin), ou des intégrines^{157,158}.

Ces relations étroites entre les molécules formant certaines structures d'adhésion et les tétraspanines s'illustrent notamment avec l'interaction entre CD9 et CD54, ou par la colocalisation entre CD151 et la laminine 5 à la membrane basale des cellules épithéliales et cela grâce à sa liaison aux intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$ ¹⁵⁹. La signalisation dépendante des intégrines est ainsi modulée par le taux d'expression de CD151, que ce soit au niveau de la phosphorylation de la PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase), ou de la FAK (Focal Adhesion Kinase)^{160,161,162}. De plus, l'activation de la PKC induit son association aux tétraspanines CD151, CD9, CD81 et CD82. Par ailleurs, l'expression de CD82 régule négativement la signalisation via l'EGF, qui réorganise le cytosquelette et produit des lamellipodes. En effet, l'association de CD82 et de l'EGFR inhibe la synthèse de certains gangliosides importants dans l'activation de cette voie de signalisation^{163,164}. Enfin, dans le cas particulier du complexe CD19-CD21-CD81 qui induit une cascade de phosphorylations en réponse à la détection d'un antigène, CD81 participe à l'activation des lymphocytes B^{165,166}.

II) 2. 2. Régulation de la protéolyse et de la répartition membranaire des protéines

Certaines tétraspanines sont capables de s'associer avec des protéases comme CD26, TADG-15 ou ADAM10^{167, 168, 169}. Il est maintenant établi que le clivage du précurseur membranaire de TNF α (Tumor Necrosis Factor α) par la métalloprotéase ADAM10 est régulé négativement par la compartimentation de cette protéase, de façon dépendante des tétraspanines. L'expression et l'activité d'autres métalloprotéases comme MMP-2, MMP-9 et MMP-7 est aussi modulée par certaines tétraspanines comme CD9, CD63 ou CD151^{170,171,172,173,174,175}.

L'internalisation de certaines protéines membranaires est aussi dépendante des tétraspanines. En effet, CD9 s'associe à certains ligands des EGFRs comme le TGF α (Transforming Growth Factor α) ou l'HB-EGF (Heparin Binding EGF) au niveau de la membrane plasmique, ce qui les stabilise et potentialise leur interaction avec le récepteur^{176,177}. D'autre part, l'inhibition de l'expression de CD151 réduit l'internalisation des intégrines comme $\alpha_3\beta_1$ ¹⁵⁹. Enfin, CD63 régule la localisation des pompes à protons ATP dépendantes dans les cellules gastriques, ainsi que la séquestration du récepteur de chimiokine CXCR4, un cofacteur d'entrée du VIH, dans les compartiments lysosomiaux plutôt qu'à la membrane plasmique^{178,179,180,181}.

II) 2. 3. Modulation de la fusion membranaire et des processus infectieux

La formation de microvilli, de nanotubes membranaires ou de syncytia entre deux cellules serait sous le contrôle de tétraspanines comme CD9 et CD81, que l'on retrouve impliquées aussi bien dans des processus de courbure membranaire que de fusion cellulaire¹⁸². En effet, CD9 et CD81 sont des facteurs positifs de la différenciation musculaire lors de la fusion des myoblastes en myotubes¹⁸³. De même, ces deux protéines et l'autre tétraspanine Tspan-5 participent à la différenciation des ostéoblastes lors de leur fusion en ostéoclastes^{184,185,186}. Par contre, l'expression de CD9 et CD81 dans les macrophages inhibe leur fusion ce qui suggère un mécanisme dépendant du type cellulaire¹⁸⁸. Par ailleurs, l'association de CD9 avec EWI-2, EWI-F (ou CD9P-1) et l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ à la membrane de l'ovocyte, régule l'efficacité d'adhésion de la fertiline β et donc la fusion avec le spermatoocyte. L'expression de CD9 et de CD81 dans les ovocytes (mais pas dans les spermatoocytes) est essentielle à la fusion des gamètes, ce qui suggère une régulation de mécanisme, indépendamment des tétraspanines apportées en trans^{188,189,190,191,192,193,136,194,195}.

L'infection de cellules cibles par différents agents pathogènes est également dépendante de tétraspanines comme CD9 et CD81. En effet, l'entrée dans les hépatocytes du parasite *Plasmodium falciparum* responsable de la Malaria, nécessite l'expression de CD81, en particulier la présence de la 2^{ème} boucle extracellulaire et la conservation de l'hélice B et de certains résidus entre l'hélice A et B. Bien que le mécanisme ne soit pas toujours élucidé, certains virus sont capables de détourner les tétraspanines de leur fonction initiale afin de favoriser certaines étapes de l'infection^{196,197,198,199}. C'est ainsi que la formation de syncytia entre une cellule infectée et une cellule cible ou l'entrée d'un virion est modulé par certaines tétraspanines, comme CD9 pour le FIV (Feline Immunodeficiency Virus) ou le CDV (Canine Distemper Virus), CD9 et CD82 pour le HTLV-1 (Human T cell Leukemia Virus), CD81 pour le VHC (Virus de l'Hépatite C) et différentes tétraspanines pour le VIH (Virus de l'immunodéficience Humaine)^{200,201}.

II) 2. 3. 1. Relations intimes entre CD81 et le VHC

Au commencement de ma thèse, il était déjà établi que la glycoprotéine E2 du VHC était capable de se lier au domaine variable de la seconde boucle extracellulaire de CD81. Cette interaction spécifique nécessite la phénylalanine en position 181 de CD81, si bien que le virus ne se lie pas à d'autres tétraspanines comme CD9, CD63 ou CD151^{202,203}. Par ailleurs, lorsque le taux de céramide membranaire est augmenté aux dépens des sphingolipides, une internalisation plus importante de CD81 est observée, ainsi qu'une inhibition de l'entrée du VHC²⁰⁴. Mais l'expression ectopique de CD81 dans les cellules différentes des hépatocytes ne suffit pas pour déclencher l'entrée du virus, alors que l'expression de la claudine-1 (protéine à 4 domaines transmembranaires qui n'est pas une tétraspanine, partenaire de CD81) rend ces cellules permissives au VHC²⁰⁵. Le tropisme du virus est aussi lié à des protéines membranaires comme SR-BI et EWI-2, mais leurs relations avec CD81 restent à éclaircir^{206,207,208,209,210}.

II) 2. 3. 2. Implication des tétraspanines dans l'infection par le VIH

Au début de mon travail de thèse, de nombreux éléments existaient déjà en faveur d'une implication de certaines tétraspanines dans le cycle viral du VIH. En effet, l'utilisation de fraction soluble d'EC2 de CD9, CD81, CD63, CD151 ou d'anticorps dirigés contre CD9, CD81 ou CD82 limitent l'infection des macrophages par le virus de façon significative^{211,212}.

De plus, les anti-CD81 augmentent la formation de syncytia entre lymphocytes T et les cellules dépourvues de CD9 et de CD81 subissent davantage de fusion avec les virions²¹³. Par ailleurs, le virus incorpore de nombreuses tétraspanines comme CD9, CD81, CD82, CD63, CD54 ou Tspan-14 au niveau de son enveloppe²¹⁴. Ceci est à mettre en relation avec le fait que le virus bourgeonne dans des zones riches en ces différentes tétraspanines, que cette accumulation dépende de l'expression des protéines de l'enveloppe viral et que CD9 et CD81 soient présentes à la synapse virologique^{215,216}. L'internalisation virale se ferait aussi dans des compartiments riches en tétraspanines²¹⁷. Ces données suggèrent que les tétraspanines sont utilisées par le VIH dans certaines étapes de la progression virale, sans que le mécanisme associant le virus et les zones enrichies en tétraspanine soit élucidé (voir le chapitre III).

II) 3. Organisation latérale membranaire

II) 3. 1. Caractérisation du réseau d'interactions formé par les tétraspanines

L'extraction des tétraspanines par l'utilisation de détergents moins stringents que le Triton X-100 permet la co-immunoprécipitation d'un nombre considérable de partenaires, qu'il s'agisse d'autres tétraspanines, ou de partenaires membranaires tel que des molécules d'adhésion (intégrines, VCAM-1, ICAM-1), des protéines contenant des domaines immunoglobuline (EWI-2, EWI-F), des ectoenzymes (ectopeptidases ou métalloprotéases) ou encore des molécules de signalisation intracellulaire (protéines G, PI4K, PKC)^{218,219,220,221}.

L'utilisation de conditions d'extraction plus ou moins stringentes a permis de caractériser un réseau d'interactions appelé réseau à tétraspanines (tetraspanin web) et de définir les partenaires primaires des tétraspanines comme des molécules dont l'association aux tétraspanines est plus stable que les tétraspanines entre elles dans certaines conditions de solubilisation^{126,222,223,224,123,225}. Des expériences de colocalisation en microscopie de fluorescence, de pontage chimique voire de FRET entre protéines membranaires, ont également permis de dresser une carte plus précise du réseau d'interaction entre tétraspanines et partenaires primaires^{226,227} (figure 15).

Tétraspanines	CD9	CD81	CD151	CD63	CD53
Partenaires	Pro-HB-EGF EWI-2 EWI-F EpCAM ICAM-1 Claudine-1	CD19 Intégrine $\alpha_4\beta_1$ EWI-2 EWI-F Claudine-1	Intégrine $\alpha_3\beta_1$ Intégrine $\alpha_6\beta_1$ Intégrine $\alpha_6\beta_4$ VCAM-1	H ⁺ K ⁺ ATPase	ADAM10

Figure 15 : Différents partenaires des tétraspanines CD9, CD81, CD151, CD63 et CD53.

Par exemple, EWI-2 et EWI-F s'associent directement avec CD9 et CD81, tandis que les intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_6\beta_1$ sont des partenaires primaires de CD151. Bien que de nombreuses zones d'ombres persistent pour élucider les processus de nucléation, de croissance et de remodelage de ce maillage protéique, il est admis que les interactions homologues voire hétérologues entre les tétraspanines sont à la base de ce réseau (figure 16). En effet, grâce à l'utilisation de pontage chimique, il est possible d'isoler des homodimères de CD9 ou des oligomères de CD9 et CD81. De plus, des expériences de FRET et de codiffusion par suivi de molécules uniques confirment des interactions directes entre tétraspanines. Enfin, l'étude structurale des uroplakines, suggère que celles-ci pourraient s'associer entre elles et avec leur partenaire primaire grâce aux interactions entre leurs domaines transmembranaires.

Il faut remarquer qu'excepté pour certains récepteurs couplés aux protéines G (GPCR : G-Protein Coupled Receptor), l'analyse protéomique de ces partenaires ne permet pas d'identifier de protéine commune avec les radeaux lipidiques et de façon réciproque aucune des 33 tétraspanines identifiées n'est retrouvée dans les rafts. Contrairement aux radeaux lipidiques qui sont extraits avec du Triton X-100 à 4°C et ne supportent pas le Brij97 à 37°C, la plupart des complexes enrichis en tétraspanines sont stables avec le Brij97 à 37°C, mais pas avec le Triton X-100 à 4°C²²⁸. L'ensemble de ces résultats suggère que ces complexes enrichis en tétraspanines sont distincts des radeaux lipidiques. De façon intéressante, il semble toutefois que le cholestérol et certains glycosphingolipides soient présents dans ces complexes. En effet, une étude par radiomarquage montre une forte proximité entre CD9 et le GM3, ainsi que CD9, CD81 et CD82 avec un analogue du cholestérol^{229,230}. De plus, le GD1 régulerait positivement l'interaction de CD82 avec les autres tétraspanines^{231,163}. Enfin, les expériences d'extraction en présence de β -méthyl-cyclodextrine suggèrent que le cholestérol stabilise ce réseau d'interactions.

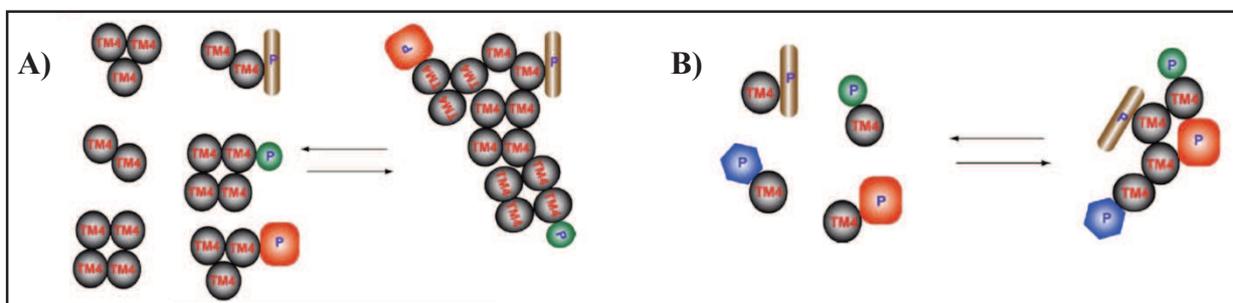


Figure 16 : Organisation du réseau à tétraspanines proposée par Hemler.

A) L'association de différents oligomères de tétraspanines, liés ou non à des partenaires primaires, conduirait à la formation de plus larges plateformes.

B) Ces clusters pourraient aussi résulter de la liaison de petits complexes primaires.

II) 3. 2. Identification des domaines enrichis en tétraspanines

Grâce aux travaux de thèse du précédent étudiant de notre laboratoire, la caractérisation sur cellule vivante de la dynamique et de la répartition membranaire des tétraspanines a été possible. La visualisation par microscopie TIRF de marquage global et le suivi à l'échelle de la molécule unique des tétraspanines, apportent un regard nouveau sur l'organisation en temps réel de ce réseau d'interaction²³². En effet, ces expériences montrent tout d'abord la présence au niveau de la membrane plasmique, de zones ponctiformes de quelques microns de diamètre (en fluorescence), enrichies en tétraspanines CD9 (figure 17). Ces plateformes ont une localisation et une morphologie relativement stables dans le temps (sur plusieurs dizaines de minutes) mais ne sont pas superposées avec les points focaux d'adhésion. De plus, la désorganisation du réseau d'actine sous cortical ou des microtubules à l'aide de drogues spécifiques n'empêche pas la formation de ces plateformes. Enfin, la déplétion en cholestérol et la dépalmitoylation des tétraspanines n'affectent pas l'existence de ces zones, mais influe sur leur taille, leur nombre et les propriétés diffusives des tétraspanines qui y sont séquestrées. L'ensemble de ces résultats suggère d'une part que l'organisation membranaire des tétraspanines en microdomaines est indépendante du cytosquelette et d'autre part qu'elle repose sur des interactions protéine-protéine mais aussi protéine-lipide.

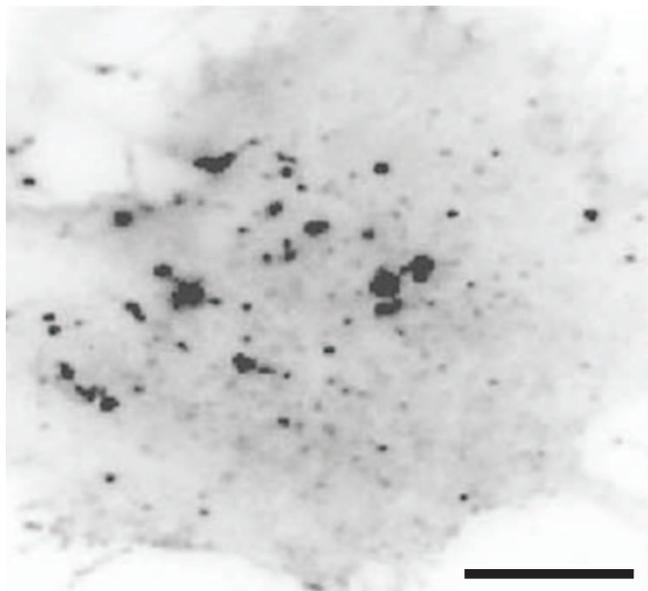
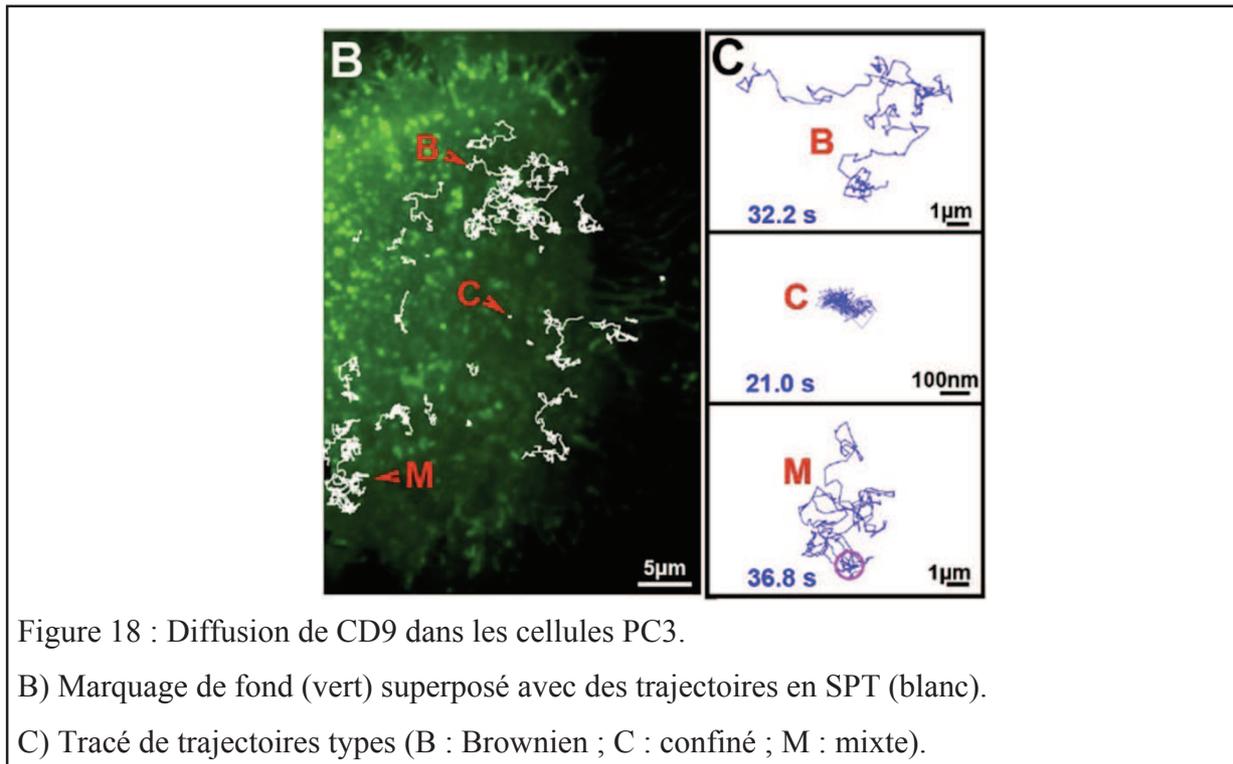


Figure 17 : Marquage des zones enrichies en CD9 dans une cellule PC3.

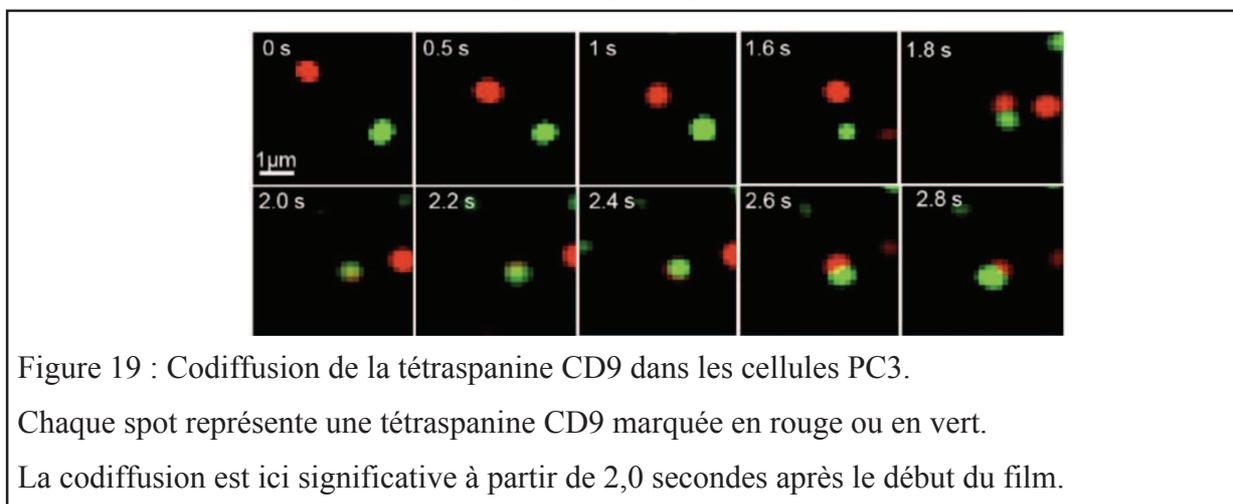
La barre d'échelle correspond à 10µm.

II) 3. 3. Dynamique membranaire des tétraspanines



De façon assez surprenante, les mesures en molécule unique de la diffusion de CD9 montrent que cette tétraspanine se déplace relativement rapidement à travers la membrane plasmique des cellules PC3 : un coefficient de diffusion moyen de $0,23\mu\text{m}^2/\text{s}$, du même ordre que celui mesuré pour une protéine GPI dans les mêmes conditions, avec près de 40% de trajectoires Browniennes, 40% de mixtes (alternance de portions Browniennes et confinées) et seulement 20% de confinées.

Ces résultats suggèrent que malgré la capacité des tétraspanines à s'associer entre elles ou avec de nombreux partenaires et à former des microdomaines stables, la plupart d'entre elles diffusent librement dans la membrane plasmique (figure 18).



L'étude en molécule unique de la codiffusion de CD9 confirme que ces tétraspanines sont capables de s'associer ou de se dissocier de façon dynamique (figure 19). Mais de façon intéressante, le coefficient de diffusion de CD9 ne varie pas entre le moment où les marqueurs diffusent ensemble ou séparément. Or, dans le cas d'une interaction directe entre deux complexes protéiques, un ralentissement aurait dû être observé.

Ces résultats suggèrent que les tétraspanines observées diffusent librement au sein de petites plateformes, elles-mêmes capables de se déplacer, fusionner ou se scinder.

Une autre possibilité est que pour chaque processus d'association observé avec une nouvelle tétraspanine correspond la dissociation avec une tétraspanine et/ou d'un partenaire qui lui était lié (et réciproquement).

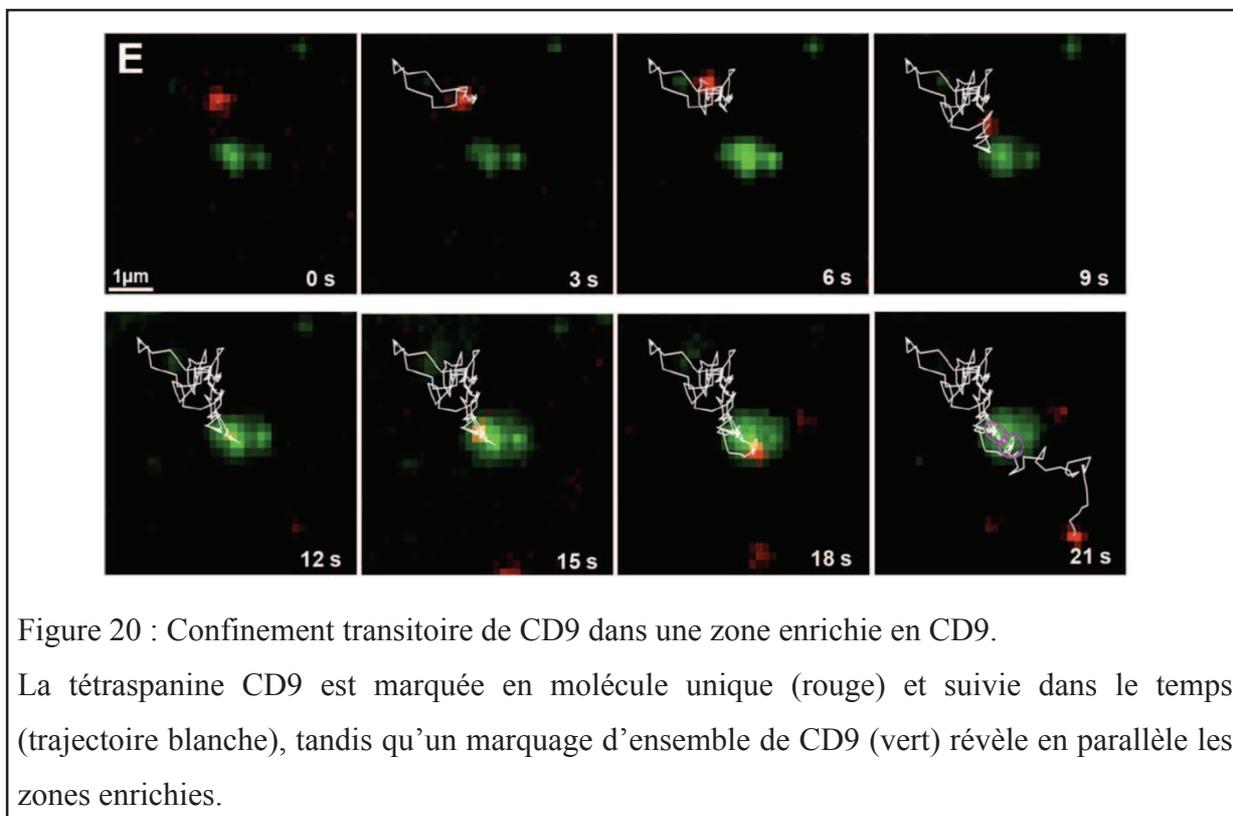


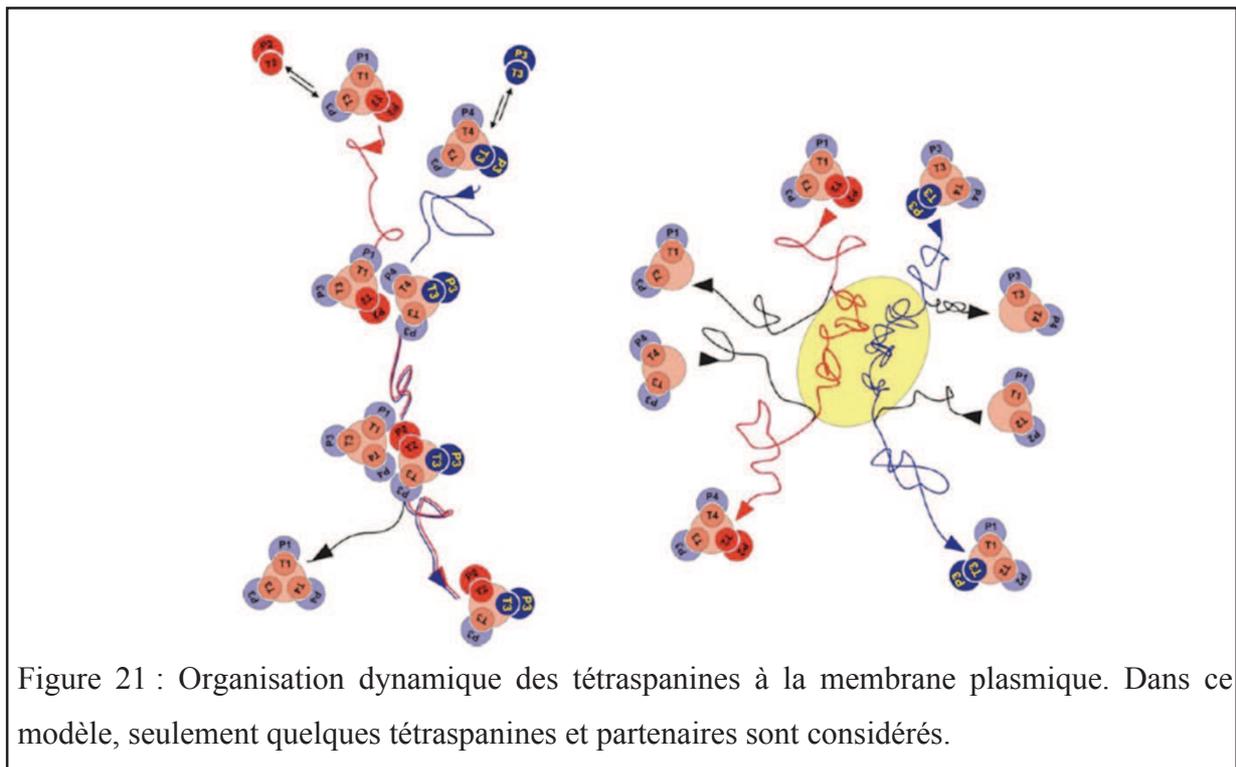
Figure 20 : Confinement transitoire de CD9 dans une zone enrichie en CD9.

La tétraspanine CD9 est marquée en molécule unique (rouge) et suivie dans le temps (trajectoire blanche), tandis qu'un marquage d'ensemble de CD9 (vert) révèle en parallèle les zones enrichies.

Suivant l'hypothèse selon laquelle les domaines enrichis en tétraspanines seraient le résultat de la multimérisation de ces protéines membranaires et de leur association en complexes moléculaires plus larges avec leurs partenaires primaires et secondaires, il n'est pas étonnant qu'une majorité des trajectoires confinées ou mixtes soient superposées avec ces zones (figure 20). Cependant, il est intéressant de constater que d'une part cette séquestration peut être transitoire et d'autre part qu'elle est dépendante de la palmitoylation de CD9 et de l'enrichissement ou la déplétion en cholestérol de la membrane plasmique.

Ces résultats indiquent que ces domaines enrichis en CD9 sont en échange permanent avec le reste de la membrane plasmique et que les interactions protéine-lipide interviennent dans la régulation de ce processus.

Par leur réseau d'interactions, les tétraspanines sont donc capables de former des microdomaines dont la composition pourrait être remodelée en fonction du recrutement des partenaires spécifiques d'une fonction cellulaire donnée.



L'ensemble des travaux de biochimie, d'immunofluorescence et de suivi en molécule unique ont permis à l'équipe de Rubinstein de proposer un modèle pour illustrer le caractère dynamique du réseau à tétraspanines²³³.

Des petits clusters de tétraspanines associés à leurs partenaires primaires diffuseraient librement jusqu'à se rencontrer ponctuellement, ce qui pourrait mener à l'échange de certains constituants, participant ainsi à la diversité dans le temps et l'espace des interactions au sein du réseau (figure 21 ; gauche). Spontanément ou en réponse à une stimulation (à définir), des interactions plus stables, dépendantes notamment du cholestérol et de la palmitoylation, pourraient se produire entre plusieurs de ces clusters pour former des plateformes plus larges (figure 21 ; droite).

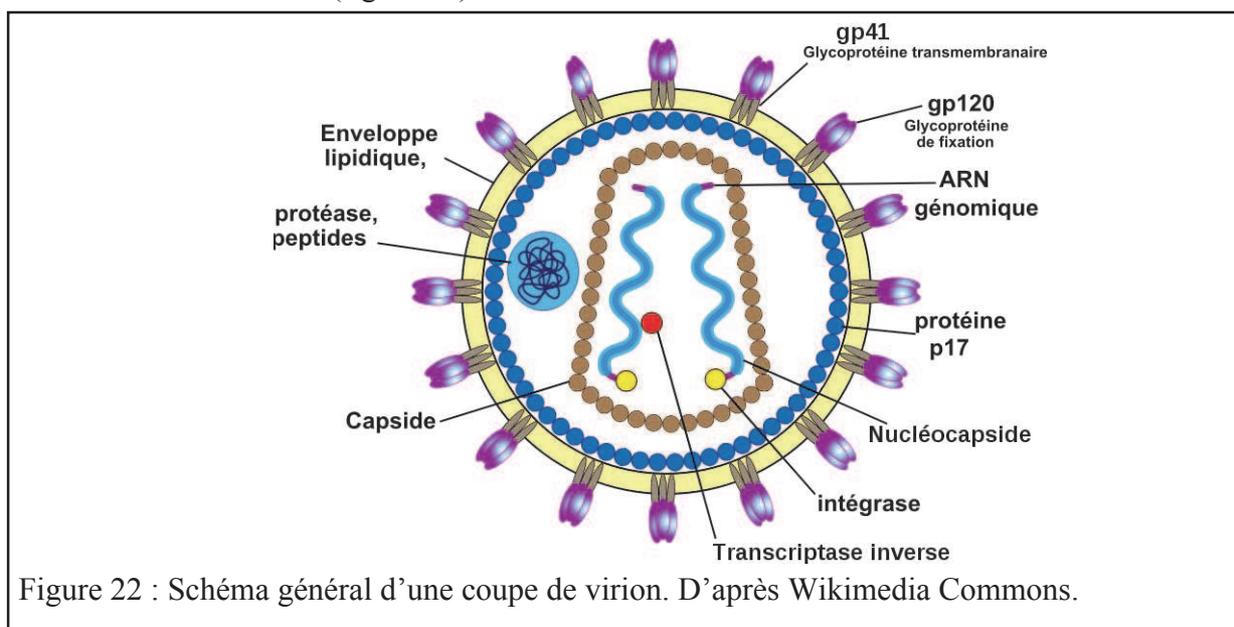
Il reste maintenant à déterminer avec précision pour les différentes tétraspanines comment leur dynamique membranaire et leur répartition à l'intérieur ou à l'extérieur des zones enrichies est régulée, dans divers processus cellulaires, infectieux ou non.

III) Le VIH, agent infectieux à l'origine du SIDA

« Soyons optimistes : la médecine a découvert beaucoup plus de remèdes qu'il n'y a de maux. » Alfred Capus.

III) 1. Généralités sur le virus

Le Virus de l'Immunodéficience acquise Humaine (VIH), responsable du Syndrome d'Immuno Déficience Acquise (SIDA), appartient à la famille des *Retroviridae*. Cette famille d'agents infectieux regroupe des virus dont le système de réplication, la structure et la taille sont similaires. En effet, leur génome est constitué de deux exemplaires d'ARN simple brin, qui peuvent être utilisés comme matrice pour leur traduction en protéine ou leur transcription inverse en ADN double brin, avant d'être intégré au génome de la cellule hôte. Ces dernières étapes sont catalysées dans la cellule hôte par des enzymes virales. Au sein de la particule virale, ces enzymes ainsi que l'ARN viral sont protégés par une capsidite et une matrice protéique, elles-mêmes entourées par une enveloppe protéolipidique, formant un virion d'environ 0.1 micron²³⁴ (figure 22).



III) 1. 1. Génome viral

Le génome du VIH code pour des polyprotéines : GAG (Gène de l'Antigène de Groupe), POL (Polymérase) et ENV (Enveloppe). A partir de ces polyprotéines, le virus produit par maturation protéolytique des protéines fonctionnelles nécessaires à son cycle. Ainsi, la nucléocapside (NC), la matrice (MA), et la capsidite (CA) sont issues de la maturation de GAG, tandis que la transcriptase réverse (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (PR) de celle de POL et enfin les glycoprotéines membranaires virales (gp120 et gp41) du clivage de ENV.

Le VIH étant un lentivirus, son génome code aussi pour des protéines accessoires et régulatrices : VIF (Virion Infectivity Factor), VPR (Viral Protein R), TAT (Trans-Activator for viral Transcription), REV (Regulator of Expression of Viral Proteins), VPU (Viral Protein Unknown) et NEF (NEgative Factor).

Les gènes qui codent pour ces dernières protéines sont localisés dans différents cadres ouverts de lecture chevauchants, si bien que la totalité du génome du VIH ne représente que 9181 nucléotides par brin d'ARN²³⁵ (figure 23).

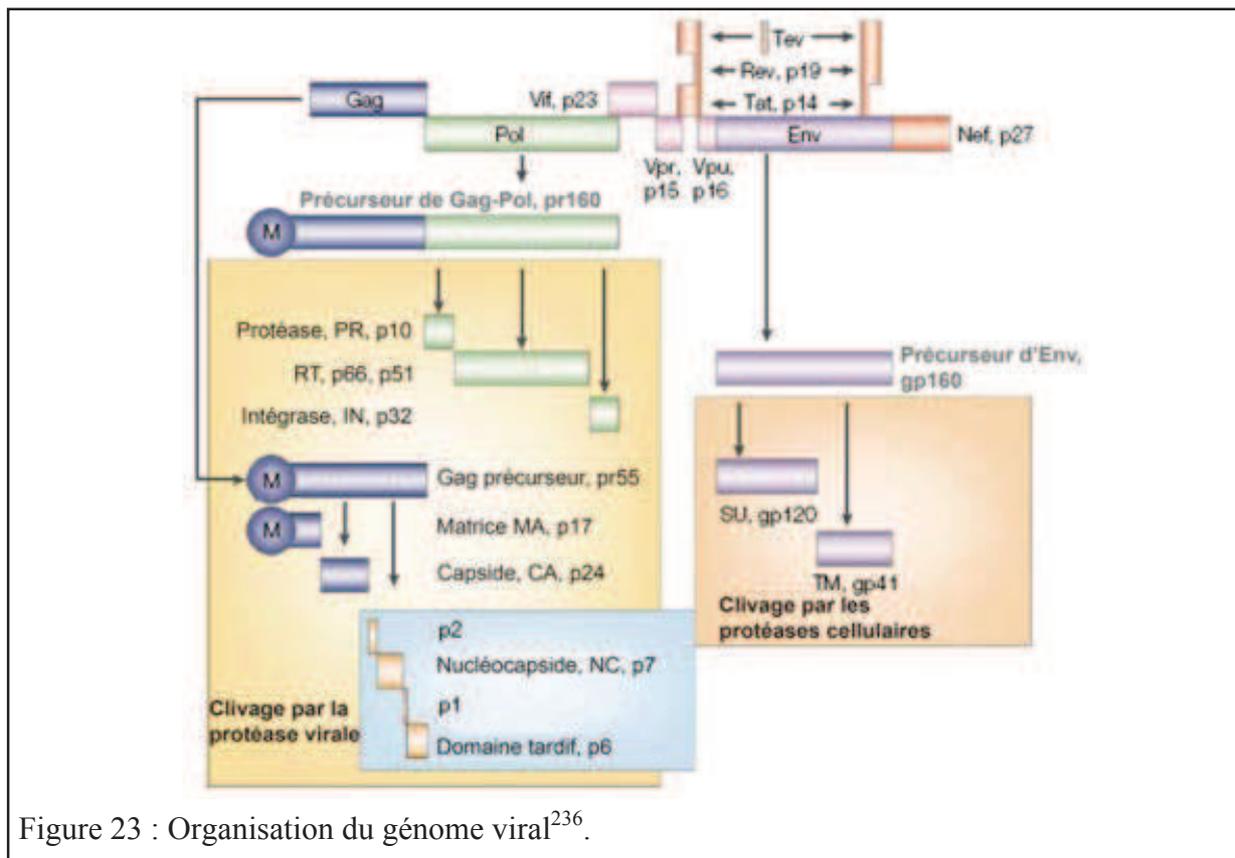


Figure 23 : Organisation du génome viral²³⁶.

III) 1. 2. Protéines de structure

L'ARN viral est susceptible de se dégrader précocement sans la protection de la nucléocapside, de la capside et de la matrice.

La protéine de la nucléocapside (NC), 7 kDa, possède des motifs en doigts de zinc permettant notamment son interaction avec l'ARN du virus. La localisation spatiale et la structure de chacun de ces motifs sont importantes pour son activité chaperonne sur l'ARN viral, qui pourrait aussi être impliquée dans la régulation de la transcription inverse, modulant de ce fait les dernières étapes du cycle viral²³⁷.

La capside est formée par l'association d'environ 1500 exemplaires de la protéine du même nom (CA), 24 kDa, en un nucléoïde conique renfermant le génome viral, sa nucléocapside, l'intégrase et la transcriptase inverse²³⁸.

La protéine p6, 6 kDa, fait le lien entre le nucléoïde et la matrice. Elle interviendrait aussi dans les processus de bourgeonnement et de libération viraux²³⁹.

Juste sous l'enveloppe, les protéines de matrice (MA), 17 kDa, constituent une sphère supplémentaire de protection. Leurs interactions entre elles et avec les autres protéines virales sont donc primordiales dans la formation des virions²⁴⁰.

III) 1. 3. Protéines de l'enveloppe

La protéine gp41 est ancrée sous forme trimérique au sein de la bicouche lipidique qui enveloppe la matrice et le reste du virion. Les changements de conformation au niveau de sa partie transmembranaire seraient déterminants dans les processus de fusion avec la membrane de la cellule hôte. Elle est issue de la protéolyse de la gp160 par la furine au niveau de l'appareil de Golgi²⁴¹.

Cette protéolyse produit en parallèle la protéine gp120, qui conserve cependant des interactions directes mais non covalentes avec la gp41. Ces hétérotrimères forment vers l'extérieur des spicules dont la structure et la composition en acides aminés est responsable en partie du tropisme cellulaire (figure 24). De plus, la gp120 se lie spécifiquement au récepteur CD4, ainsi qu'au corécepteurs CCR5 ou CXCR4, initiant les étapes de fusion avec la cellule hôte²⁴².

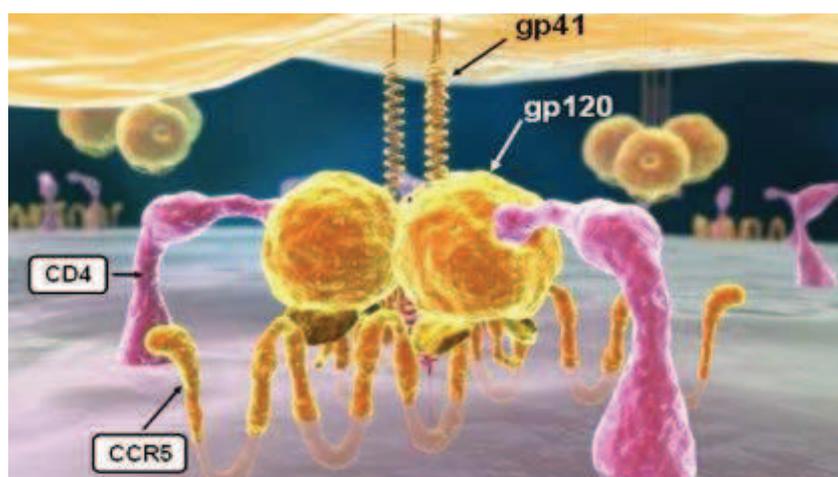


Figure 24 : Représentation de l'organisation spatiale et structurale des protéines d'enveloppe du virion (en haut) et de leur interaction avec le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5 de la cellule hôte (en bas). D'après Briggs (site internet).

III) 1. 4. Protéines à activité enzymatique

La protéase (PR) du VIH est une protéine de 99 acides aminés générée par clivage autocatalytique du précurseur GAG-POL. Sous forme d'homodimère, elle catalyse aussi la maturation des précurseurs GAG et POL individuellement, libérant les protéines de structure précédemment décrites, ainsi que la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN)²⁴³.

La transcriptase inverse (RT) est quant à elle responsable de la transcription inverse du génome viral, grâce à son activité ADN polymérase ARN/ADN-dépendante et RNase H en parallèle²⁴⁴.

L'intégrase (IN), 32 kDa, assure la combinaison du génome viral avec celui de la cellule hôte, grâce à un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal, un site enzymatique actif au centre et un motif en doigt de zinc en N-terminal. Par ailleurs, l'intégrase pourrait aussi avoir une fonction importante dans la stabilité du nucléoïde lors des processus de fusion²⁴⁵.

III) 1. 5. Protéines de régulation

La protéine Tat, grâce à son domaine trans-activateur, permet d'augmenter de façon exponentielle la transcription des gènes viraux^{246, 247}.

La protéine Rev est tout aussi essentielle à l'expression des gènes du VIH, puisque grâce à sa liaison à la séquence RRE (Rev Responsive Element), elle permet notamment de faciliter l'export des ARN viraux vers le cytoplasme en vue de leur traduction complète, sans épissage nucléaire²⁴⁸.

Nef, protéine myristylée d'environ 30 kDa, a la capacité de perturber la transduction cellulaire, et de ce fait, régule négativement la concentration de CD4 et des protéines du CMH de classe I, à la surface des cellules infectées²⁴⁹.

La protéine Vpu, environ 81 acides aminés, participe à l'amplification du nombre de virions expulsés de la cellule hôte. En effet, elle induit la dégradation de la tetherin/BST2/HM1.24/CD317, une protéine qui limite la sortie du virus de façon dépendante des interférons²⁵⁰.

La protéine Vif se lie à APOBEC3G, une protéine qui inhibe la réplication virale, afin d'accélérer sa dégradation et ainsi de favoriser la prolifération du virus²⁵¹.

Vpr, protéines de 96 acides aminés, active la kinase ATM des cellules infectées, bloquant celles-ci en phase G2. Ceci favoriserait donc la réplication du virus²⁵².

III) 2. Le cycle viral

De la reconnaissance de la cellule cible à la dissémination de nouvelles particules virales, en passant par les processus de fusion, de réplication, d'assemblage et de bourgeonnement, le cycle viral aurait lieu en moins de 50 heures, multipliant par plus de mille le nombre de virions. En effet, bien que le temps entre le bourgeonnement d'un virion et son adhésion à une nouvelle cellule hôte soit variable, il est estimé en moyenne à 8h. Les étapes de liaison et de fusion seraient quant à elles plutôt rapides par rapport à la transcription inverse (33h) et l'intégration (5h)²⁵³ (figure 25).

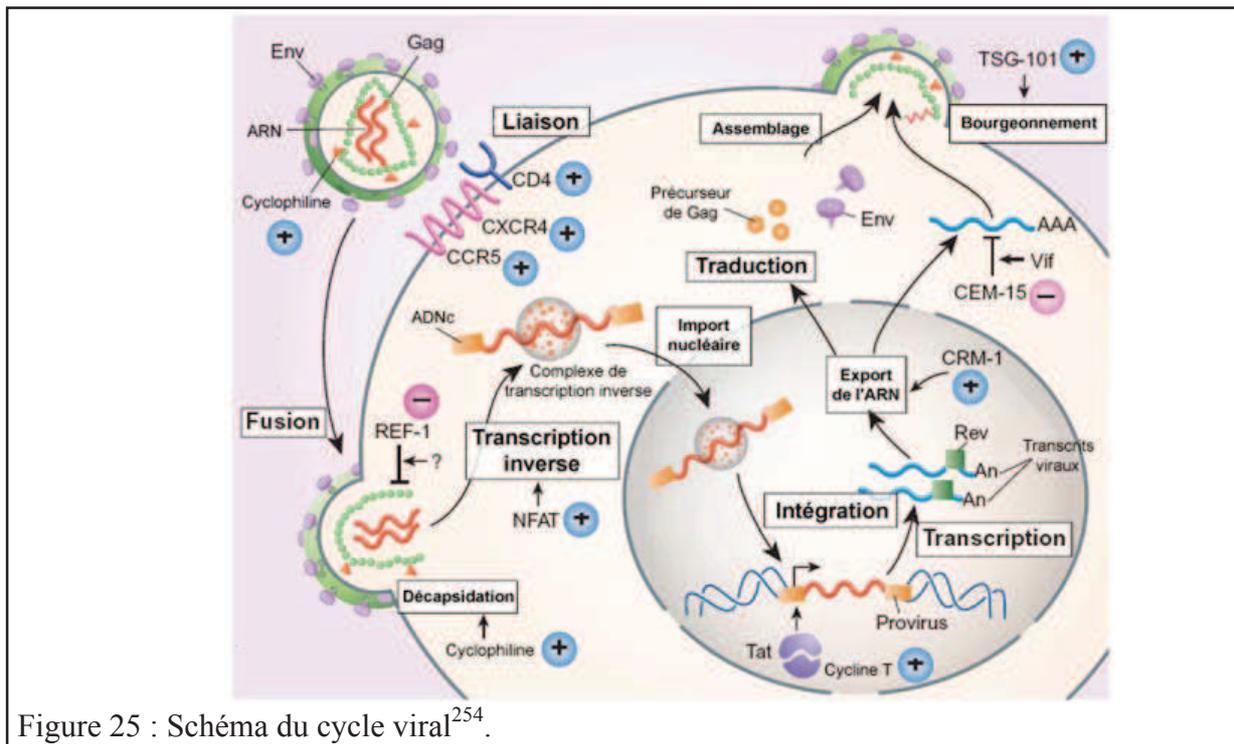


Figure 25 : Schéma du cycle viral²⁵⁴.

III) 2. 1. Reconnaissance de la cellule cible et fusion membranaire

La liaison spécifique du virion avec la cellule cible est assurée par l'interaction directe entre la gp120 du virus et le récepteur CD4 de la cellule hôte²⁵⁵. Cette interaction induit un changement de conformation de la gp120, qui devient alors susceptible de se lier aux corécepteurs CCR5 ou CXCR4^{256,257}. Ce nouveau complexe engendre une série de réarrangements conformationnels de la gp41, qui conduisent à la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane de l'hôte, via la formation d'un pore intermédiaire^{258,259}.

Bien que l'entrée par endocytose n'ait été démontrée que pour le transport des virions par delà des cellules épithéliales, une controverse existe encore sur le fait que les virions seraient préalablement dirigés vers des compartiments endosomaux, avant de fusionner avec la membrane de l'hôte^{260,261}.

III) 2. 2. Processus intracellulaires pour l'intégration du génome de l'hôte

Débarassé de son enveloppe, le virus migre dans le cytoplasme à travers le réseau d'actine, vraisemblablement grâce à l'action de la protéine Nef²⁶². En parallèle, bien que le mécanisme précis soit encore assez flou, la nucléocapside, la capsidie et la matrice se détacheraient pour libérer l'ARN viral. Cependant, celui-ci resterait lié à quelques protéines de la nucléocapside et de la matrice, ainsi qu'à la transcriptase inverse et l'intégrase²⁶³.

Ensuite, la transcriptase inverse utilise un brin d'ARN génomique comme matrice pour en faire un transcrit d'ADN, puis cet exemplaire d'ADN sert de matrice pour générer son complémentaire. Un complexe de pré-intégration se forme alors avec un duplex d'ADN, qui est ainsi adressé au noyau, grâce aux protéines Vpr, MA et IN et leurs interactions avec les importines nucléaires²⁶⁴.

Tandis que le cycle cellulaire est bloqué en phase G2 par l'action de la protéine Vpr, l'intégration du génome viral dans celui de l'hôte se produit grâce à l'intégrase virale. Enfin, la production massive d'ARN et de protéines virales peut commencer, via l'expression de facteurs comme Tat, Rev, Vif et Nef²⁶⁵.

III) 2. 3. Production de nouveaux ARN et protéines viraux

Les protéines Tat et Vpr jouent un rôle fondamental dans la trans-activation du promoteur viral et donc la production exponentielle d'ARN, dont l'épissage est contrôlé par la protéine Rev. En effet, la liaison de cette protéine aux séquences RRE permet d'inhiber l'épissage des ARNm, qui ne conserverait alors que Tat, Rev et Nef. Ainsi, les autres protéines de régulation, de structure et enzymatiques sont générées aussi en grand nombre²⁶⁶.

Parallèlement, la protéine Nef agit sur la signalisation cellulaire en induisant l'internalisation de CD4, qui est dégradé spécifiquement dans le réticulum endoplasmique par le protéasome, via l'action de la protéine Vpu²⁶⁷. Cette réduction du nombre de CD4 à la membrane plasmique permettrait d'une part d'éviter une sur-infection trop rapide de la cellule et d'autre par de limiter la reconnaissance de la cellule infectée par le système immunitaire.

III) 2. 4. Adressage, assemblage, bourgeonnement et maturation membranaires.

Bien que les mécanismes d'assemblage des particules virales et de leur libération dans le milieu cellulaire par bourgeonnement soient encore sujets à controverse dans la littérature, il semble toutefois établi qu'une grande partie de la constitution des virions du VIH-1 se déroule sur le feuillet interne de la membrane plasmique via l'assemblage de la protéine Gag, dont l'expression dans les cellules eucaryotes suffit pour mimer ces processus^{268,269} (figure 26).

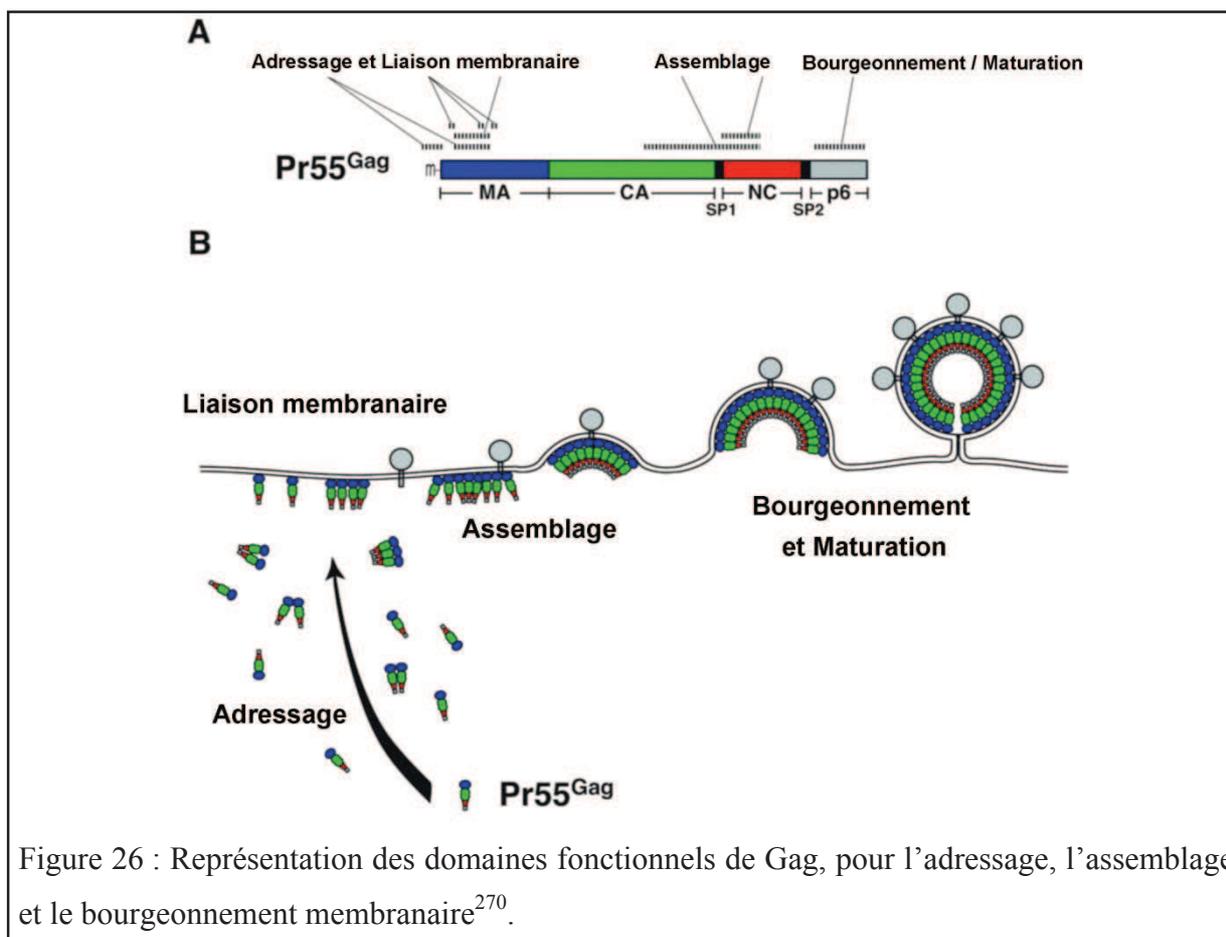


Figure 26 : Représentation des domaines fonctionnels de Gag, pour l’adressage, l’assemblage et le bourgeoisement membranaire²⁷⁰.

En effet, cette protéine virale possède une ancre lipidique de type myristoyl qui est indispensable à sa localisation membranaire et un regroupement de résidus basiques facilitant son association avec les lipides chargés négativement sur le feuillet interne de la membrane plasmique^{271,272,273}.

Il a ainsi été montré que la protéine Gag était associée à des microdomaines membranaires de type rafts via son ancre lipidique²⁷⁴. Mais, la pertinence fonctionnelle de cette association avec les rafts a été étudiée en diminuant le taux de cholestérol des cellules, un constituant des rafts, condition qui inhibe la production de particules virales infectieuses²²⁹. Cette interprétation est cependant très discutable car d’autres plateformes ou microdomaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides ont été identifiés, notamment les microdomaines enrichis en tétraspanines ou TEMs (Tetraspanin-Enriched Microdomains)^{122,230}.

Au commencement de ma thèse, l’hypothèse la plus couramment admise était que les différents éléments constitutifs du virion étaient adressés vers des plateformes pré-existantes²⁷⁵. Ce point sera discuté dans le chapitre I des résultats.

Quoi qu'il en soit, l'assemblage de Gag se fait en parallèle du recrutement du génome viral, de la transcriptase inverse et de l'intégrase, sans que le mécanisme précis de ces associations soit défini. Dans le même temps, la multimérisation de Gag induit une courbure membranaire, le recrutement des protéines d'enveloppe et surtout le détournement du système ESCRT-III via son domaine p6²⁷⁶. En effet, la partie C-terminale de Gag (« late domains ») serait capable de se lier à un complexe protéique similaire à celui utilisé pour la fission endosomale, afin de favoriser les ultimes étapes du bourgeonnement viral. En parallèle, l'action inhibitrice de la protéine Vpu sur les complexes à tetherin faciliterait significativement la libération des virions.

Enfin, la maturation du virus serait induite par la dimérisation de la protéase (PR) virale²⁷⁷. Bien que le mécanisme d'initiation ne soit pas connu, les sites de clivage sont identifiés et conduisent à la formation du virion mature (figure 22).

III) 2. 5. Dissémination dans l'organisme de l'hôte

Avant tout, il est important de distinguer la dissémination libre des virions de la propagation de l'infection par contact entre une cellule contaminée et une cellule saine, que ce processus se fasse à courte ou à longue distance.

III) 2. 5. 1. Dissémination libre

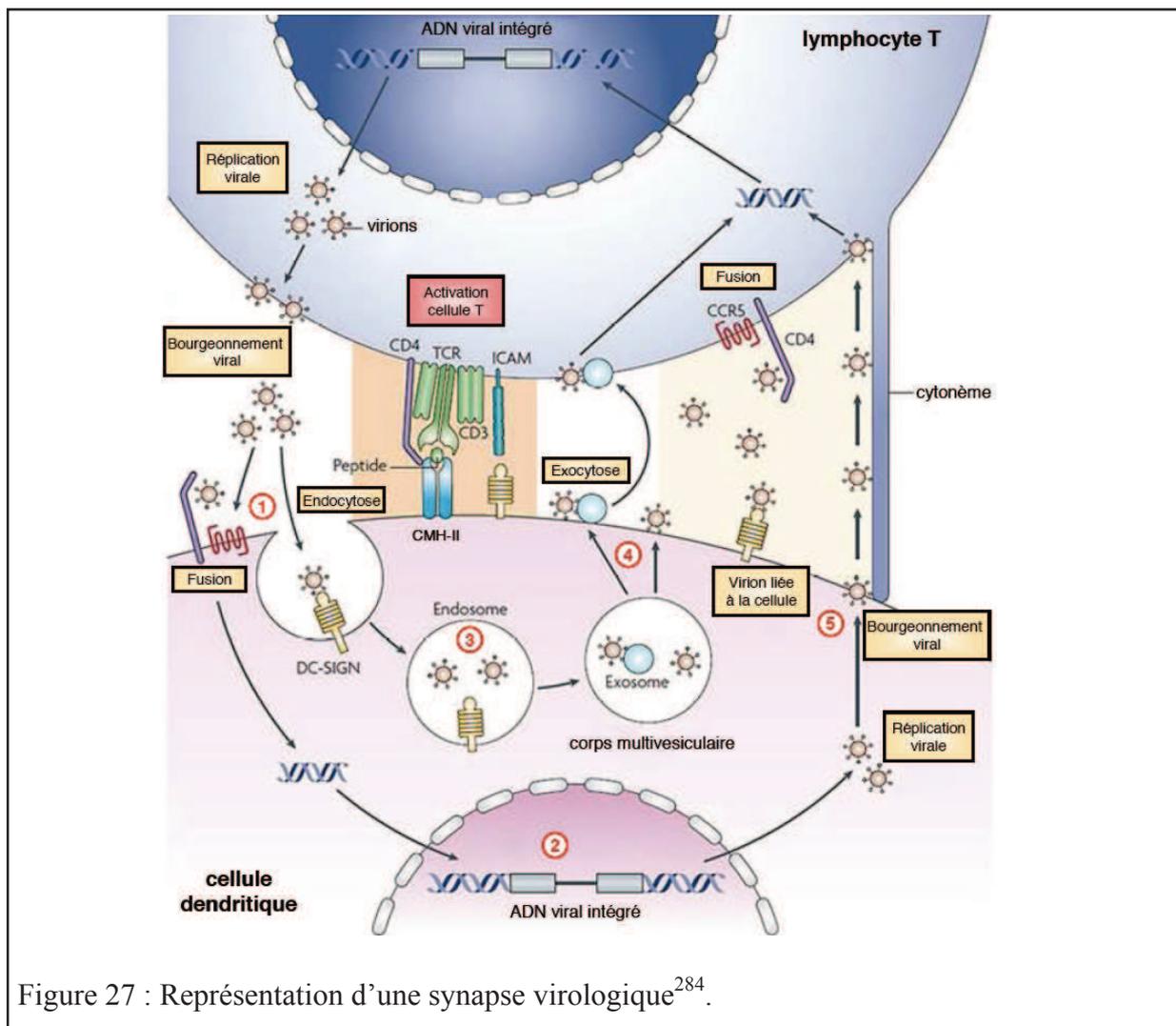
Le principal avantage de ce mode de diffusion est de parvenir à infecter des cellules particulièrement éloignées de celle d'origine, voire même d'atteindre un autre organisme. Ainsi, les virions peuvent être transportés par la plupart des liquides corporels comme le sang, la lymphe, les sécrétions génitales et celles des glandes mammaires. Cependant, durant leur transport, ces virus sont relativement contraints par les barrières épithéliales et surtout ils sont exposés à certaines défenses du système immunitaire de l'hôte. Enfin, à l'extérieur de l'organisme, ils sont particulièrement vulnérables à la dessiccation, aux variations de température, aux rayonnements UV, aux protéases et aux nucléases présentes dans l'environnement.

De façon intéressante, il a été montré que lors de son bourgeonnement, le virion peut incorporer dans son enveloppe des protéines membranaires de la cellule hôte comme LFA-1, ICAM-1, CMH-I et II, ou certaines tétraspanines (chapitre II. 1. 3.). Ces protéines permettraient de favoriser la reconnaissance, l'accrochage et/ou la fusion des virions avec les cellules cibles potentielles^{278,279}.

Ces cellules cibles sont en général des lymphocytes T CD4+, ou d'autres cellules présentatrices d'antigène comme les macrophages, qui possèdent le récepteur CD4. Il existe différents types de souches en fonction du corécepteur présent à la membrane des cellules infectées. Bien que de nombreux corécepteurs mineurs aient été identifiés comme CCR2b, CCR3, ou CXCR6, CCR5 (souches R5) ou CXCR4 (souches X4) sont les co-récepteurs privilégiés par le VIH^{280,281,282}.

Les souches R5 sont en général plus nombreuses lors de la primo-infection, mais les virions produits finissent par infecter aussi des souches X4. Ces dernières, contrairement aux souches R5, ont la capacité d'induire la formation de syncytium, transmettant alors directement la charge virale par fusion cellulaire, notamment lors de la phase symptomatique du SIDA²⁸³.

III) 2. 5. 2. Dissémination par contact cellulaire



En raison de leur fonction de reconnaissance des antigènes ou des cellules infectés, les cellules immunitaires sont évidemment susceptibles d'établir des contacts entre elles. Le virus utilise donc ces interfaces afin de se propager au delà de certaines barrières comme les muqueuses, ou la barrière hémato-encéphalique. D'une part, cela lui permet d'accéder à des tissus denses et protégés comme les organes lymphoïdes secondaires ou le système nerveux central, où il reste parfois à l'état latent durant des années ; d'autre part, le virus atteint ainsi directement d'autres cellules cibles du système immunitaire, qui font rapidement de même.

La façon la plus évidente par laquelle deux cellules présentatrices d'antigènes ont la possibilité d'établir une jonction stable dans le temps et l'espace est la synapse immunologique, que le virus détourne alors en une synapse virologique (figure 27).

Par ailleurs, il a récemment été suggéré que le VIH pourrait stabiliser des structures permettant la communication intercellulaire à des distance de 200 à 400 nm : les nanotubes (NT) membranaires^{285,286,287}. Ces véritables tunnels seraient utilisés par le virus afin de s'assurer un trafic à longue portée, d'une cellule à l'autre (figure 28).

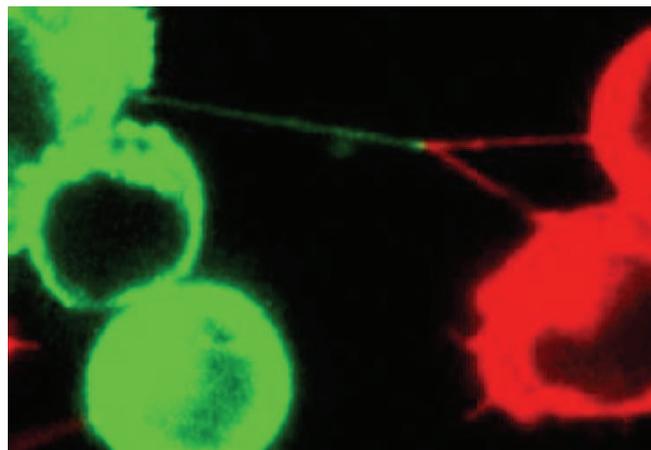
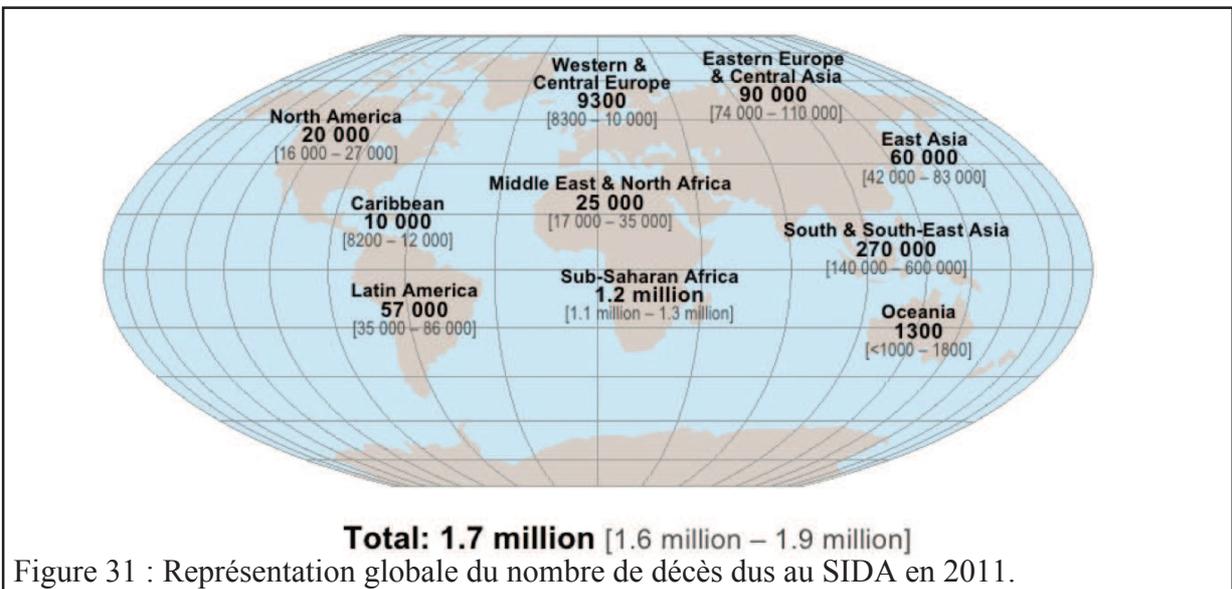
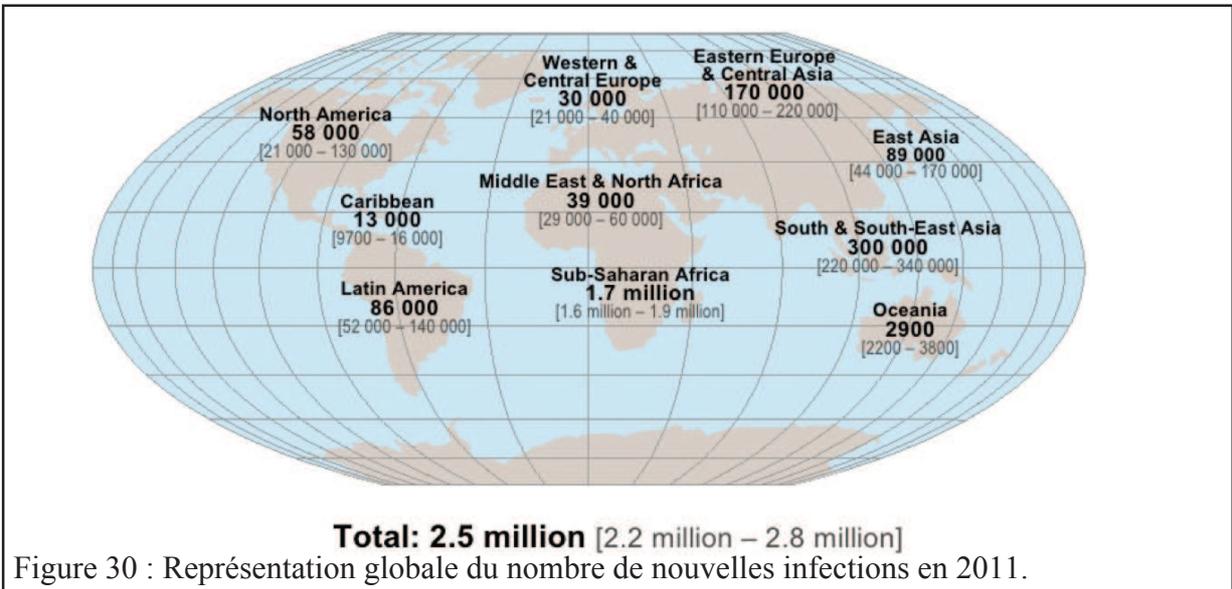
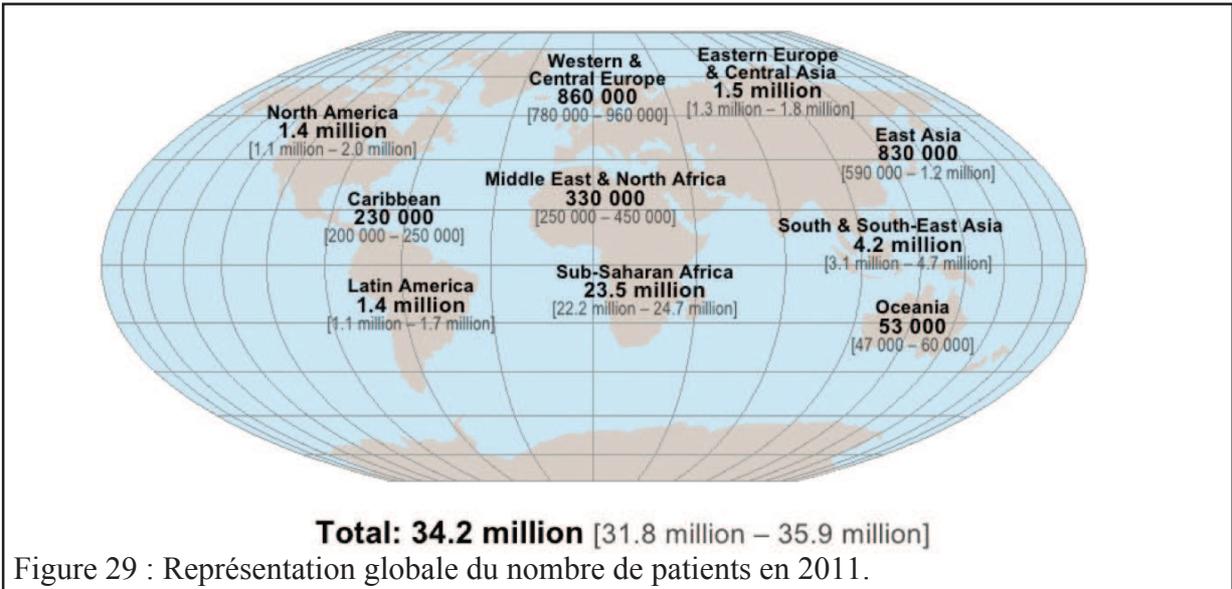


Figure 28 : Image en immunofluorescence de 3 lymphocytes liés par un NT²⁸⁷.

III) 3. Epidémiologie du SIDA

Durant l'année 2011, on estime à 34,2 millions le nombre de personnes qui vivent avec le VIH, dont 2,5 millions de nouvelles infections. Même si ce dernier chiffre est en baisse de 20% par rapport à 2001, on compte encore 1,7 millions de patients décédés l'an dernier de maladies liées au SIDA, généralement dans le cadre de multi-infections, notamment avec la tuberculose. Malgré les 16,8 milliards de dollars d'investissement pour lutter contre le SIDA, les moyens thérapeutiques et prophylactiques permettent juste de contenir l'infection, quand leur accès est possible ; d'où les 97% des nouvelles infections dans les pays en voie de développement (sources : UNAIDS 2012) (figures 29, 30 et 31).



III) 3. 1. Origine et diversité génétique du VIH

Bien que l'origine géographique précise du virus ne puisse être déterminée, le premier cas aurait été observé en 1959, dans la ville de Léopoldville, maintenant dénommée Kinshasa, dans l'actuelle République Démocratique du Congo. D'autres cas sont aussi rapportés en Afrique, voire en Europe avant les années 1980.

Mais c'est durant l'été 1981, que l'apparition de plusieurs cas atypiques de sarcomes de Kaposi et d'autres maladies opportunistes dans la communauté homosexuelle, alertent le « Center for Disease Control » d'Atlanta. Cette pathologie se manifeste par une forte immunodépression, si bien qu'elle est nommée Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquisée (SIDA). De nouveaux cas sont rapidement détectés en Europe, notamment en France, par les docteurs Leibovitch et Rozenbaum²³⁵, en particulier chez les patients hémophiles qui ont été transfusés, malgré l'utilisation de filtres anti-bactériens. L'hypothèse fongique ou bactérienne s'effondre donc, laissant la place à celle d'un virus, que l'équipe du docteur Montagnier parvient à isoler à partir de lymphocytes T d'un patient contaminé. Ils le nomment Lymphadepathy Associated Virus (LAV)²⁸⁸ et remarquent des différences entre ce virus et ceux de la famille des « Human T cell Leukemia Virus (HTLV). Pourtant, l'équipe du docteur R.C. Gallo prétend identifier l'année suivante un virus qu'ils nomment HTLV-III et qui est officiellement reconnu comme agent étiologique du SIDA. Bien que ce virus soit finalement renommé Virus de l'ImmunoDéficience Humaine de type I (VIH-1) et qu'il soit bientôt prouvé que le LAV correspond au HTLV-III²⁸⁹, il faudra des années pour que la communauté scientifique accorde la paternité de cette découverte à l'équipe du docteur Montagnier. De plus, certains scientifiques ont longtemps rejeté le lien entre le VIH-1 et le SIDA, malgré les nombreuses publications en faveur de cette thèse, cherchant la cause de cette pathologie dans l'hémophilie, les pratiques toxicomanes ou homosexuelles et stigmatisant à tort ces communautés^{290,291,292}. En 1986, l'équipe de Montagnier a découvert une nouvelle souche du virus, le VIH-2, à la structure et aux symptômes cliniques similaires, mais générant chez les individus atteints, des anticorps ne reconnaissant pas les protéines d'enveloppe du VIH-1²⁹³. Quelle que soit la souche virale, la transcriptase inverse n'est pas en mesure de rectifier les erreurs commises lors de la synthèse d'ADN. Le taux de substitutions étant évalué entre 1/1700 et 1/7500, il se produit 1 à 5 modifications nucléotidiques par copie virale^{294,295}. De plus, si plusieurs virus infectent la même cellule, la recombinaison entre leurs génomes est une source non négligeable de diversité. Ainsi, il existe une variabilité génétique très large au sein de la famille du VIH, ce qui a poussé les spécialistes à définir des sous-groupes (M,N, O et P), dont le M, majoritaire, est divisé en sous-types (clades A à D, F à H, J et K)²⁹⁶.

L'apparition des premiers cas en Afrique de l'Ouest, où le VIH-2 est toujours très concentré et surtout les analyses phylogénétiques (figure 32) ont montré un lien évident avec le Virus de l'Immunodéficience Simienne, suggérant qu'une transmission directe du chimpanzé à l'homme soit à l'origine de la pandémie²⁹⁷.

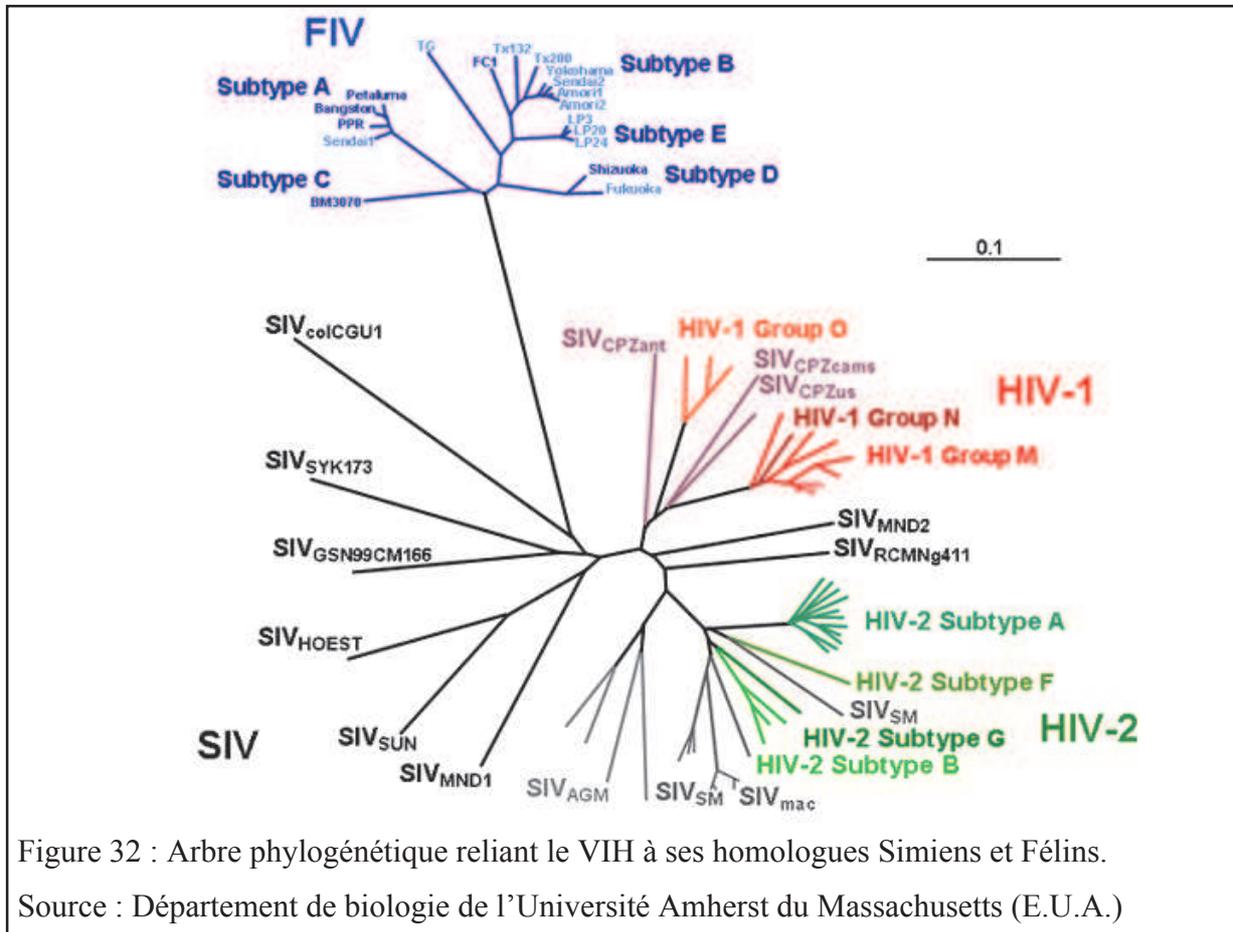


Figure 32 : Arbre phylogénétique reliant le VIH à ses homologues Simiens et Félines.

Source : Département de biologie de l'Université Amherst du Massachusetts (E.U.A.)

III) 3. 2. Transmission du virus

De part la vulnérabilité du virus au milieu extérieur et sa concentration préférentielle dans le sang, le lait maternel et les sécrétions sexuelles (sperme, liquide pré-séminal et sécrétions vaginales), les seuls mécanismes avérés de transmission sont : la transfusion sanguine (induisant dans 9 cas sur 10, le développement du SIDA), l'accouchement (entraînant l'apparition de la pathologie chez 25% des enfants), une blessure percutanée avec une aiguille utilisée par une personne contaminée (émergence de la maladie dans moins de 5% des cas), les rapports sexuels non protégés (l'infection dans 0,1% à 5% des cas).

En définitive, il suffit qu'un seul virion fonctionnel traverse les barrières naturelles (épithéliums, muqueuses) ou parvienne à atteindre une cellule dendritique périphérique qui peut migrer vers le compartiment sanguin, pour que théoriquement l'infection puisse débuter, avant de se propager rapidement au sein de l'organisme^{298,299,300,301}.

III) 3. 3. Apparition et évolution de la pathologie

La maladie apparaît et évolue en 3 temps caractéristiques : la phase aigüe, la latence clinique et le SIDA proprement dit (figure 33). Tout d'abord, lors de la phase aigüe, dont les symptômes ressemblent souvent à une forte grippe (céphalées, hyperthermie, contractures...), le nombre de lymphocytes T CD4+ baisse de façon importante et rapide, tandis qu'au contraire, la charge virale augmente largement. Ceci est dû à la contamination exponentielle par le virus de ces lymphocytes, jusqu'à ce que le système immunitaire se mette en place et que le nombre de virions produit et le nombre cellules éradiquées (notamment par le système immunitaire) s'équilibrent en quelques semaines. C'est alors que s'engage une longue phase de latente, qui peut durer plusieurs années et pendant laquelle les symptômes cliniques sont atténués, même si l'organisme est plus susceptible aux autres pathogène du fait de l'affaiblissement général de son système immunitaire. Celui-ci ne parvient pas à éradiquer le virus, de par le ciblage en parallèle des cellules censées défendre l'organisme et aussi des cellules réservoirs, à l'abri des différentes stratégies de lutte contre l'infection³⁰². Ainsi, le nombre de lymphocytes T CD4+ diminue progressivement, jusqu'à atteindre un seuil critique (moins de 350 cellules par mL de plasma), où ces cellules ne peuvent plus faire face à une augmentation croissante du nombre de virions. C'est alors que le Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis apparaît vraiment, avec comme principal signe le développement de maladies opportunistes (sarcome de Kaposi, infections pulmonaires, tuberculose, etc) qui s'aggravent et/ou s'additionnent jusqu'à la mort.

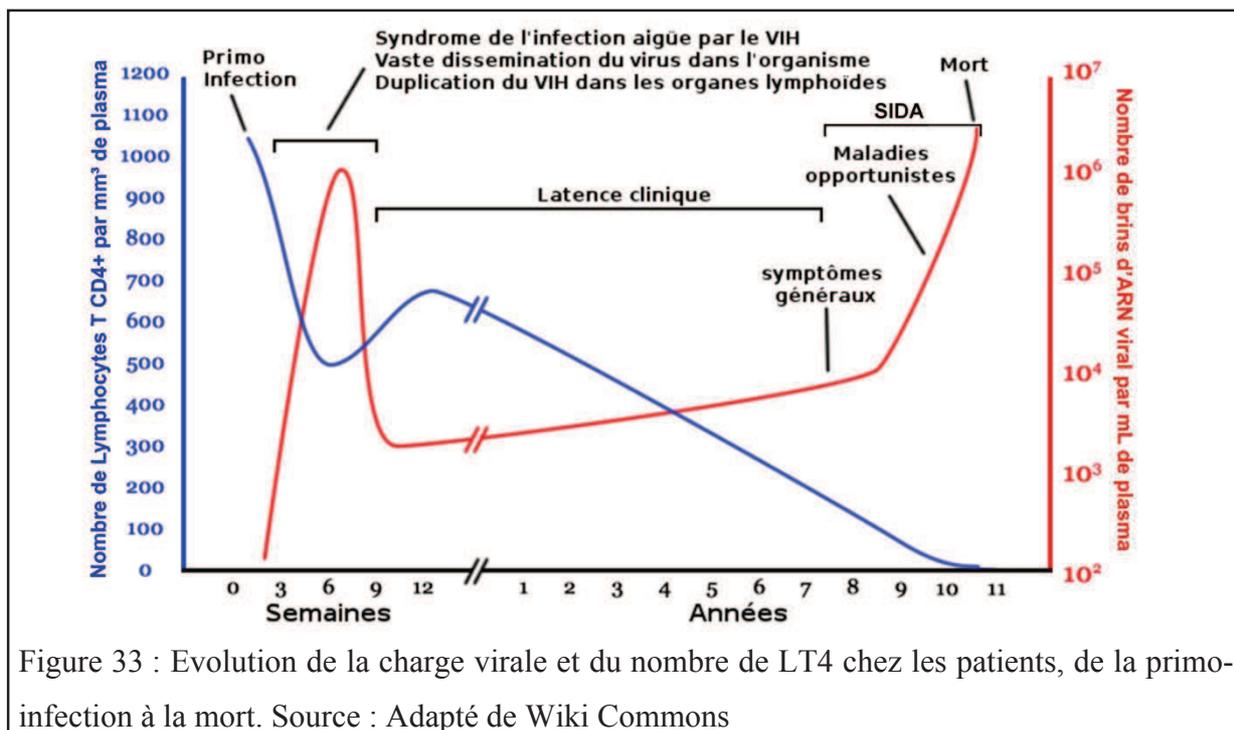


Figure 33 : Evolution de la charge virale et du nombre de LT4 chez les patients, de la primo-infection à la mort. Source : Adapté de Wiki Commons

III) 3. 4. Stratégies de lutte contre l'infection

III) 3. 4. 1. Mécanismes endogènes innés et adaptatifs

III) 3. 4. 1. 1. Actions de l'immunité innée

La première défense contre l'infection est assurée par les épithéliums, que le virus doit traverser pour atteindre les cellules cibles. Si le virus parvient à franchir ces barrières, il peut être détecté grâce aux profils moléculaires de pathogènes associés ou « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (PAMPs) qu'il induit, via des Pattern Recognition Receptor (PRR) comme les récepteurs de type Toll ou TLR (Toll-Like Receptor) portés par certaines cellules du système immunitaire. Ainsi, les cellules de l'immunité innée comme les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules NK (Natural Killer), les cellules de Langerhans et les lymphocytes T $\gamma\delta$, sont activés de façon précoce. Mais, cette activation serait aussi un moyen pour le virus d'accentuer l'immunosuppression à long terme dans l'organisme^{303,304}.

Cependant, l'activation décrite ci-dessus permet aussi la libération, la concentration ou l'action de facteurs extracellulaires comme :

- les interférons α et β produits par les macrophages ou les cellules dendritiques, qui accentuent la réponse immunitaire en inhibant l'apoptose des lymphocytes T^{305,306} ;
- les défensines qui s'attaquent directement à la membrane virale³⁰⁷ ;
- les Mannose Binding Lectines (MBL) et les molécules du complément qui inactivent le virus par opsonisation et/ou lyse des virions³⁰⁸ ;
- les nombreuses chimiokines qui entreraient en compétition avec les protéines de l'enveloppe virale, inhibant la fusion avec les cellules hôtes potentielles³⁰⁹.

Si malgré tout le virus parvient à pénétrer dans une cellule, il existe encore des mécanismes intracellulaires pour lutter contre l'infection :

- APOBEC3G (Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme-Catalytic polypeptide-like-3G), une désaminase qui substitue les Cytosines par des Uraciles durant l'action de la transcriptase inverse, générant un grand nombre de mutations dans l'ADN viral. Cependant, cette enzyme est dégradée sous l'influence de la protéine virale Vif³¹⁰ ;
- TRIM22, protéine dépendante des interférons, qui limite la transcription virale³¹¹ ;
- les HDAC (Histones DéAcétylases) qui inhibent la transcription virale, jusqu'à ce que la protéine Tat virale intervienne et transactive ce processus³¹² ;
- TRIM5 α , protéine induite par les interférons qui s'associerait à la protéine de capsid du virus pour provoquer sa dégradation³¹³ ;
- BST (ou tetherin), une protéine qui prévient le détachement des virion néoformés, tant que la protéine virale Vpu n'est pas exprimée et n'a pas induit sa dégradation³¹⁴.

III) 3. 4. 1. 2. Actions de l'immunité adaptative

Lorsqu'un antigène est reconnu à la surface d'une cellule par des anticorps spécifiques, sa destruction est induite soit directement par l'action lytique des lymphocytes T cytotoxiques CD8+, soit indirectement par la différenciation de lymphocytes B en plasmocytes, produisant des anticorps spécifiques. Ces anticorps ciblent les cellules infectées, avant qu'entrent en action les éléments du complément ou les cellules immunitaires possédant des récepteurs aux fragments Fc (FcR). De façon intéressante, ces anticorps peuvent aussi neutraliser la cellule infectée en entrant en compétition avec les protéines membranaires.

Cependant, il a été démontré que le virus régule négativement l'expression des FcR et il existeraient d'autres mécanismes de contournement de ces défenses^{315,316}.

III) 3. 4. 1. 3. Effets de certains polymorphismes

Certaines variantes alléliques rares peuvent réduire significativement la progression de la maladie, notamment celles qui touchent des gènes codant pour des protéines impliquées dans la reconnaissance ou la destruction des virions par le système immunitaire, ou utilisées par le virus durant son cycle infectieux.

Ainsi, l'allèle CCR5 Δ 32 induit la production d'un corécepteur tronqué, dont la dimérisation l'empêcherait d'accéder à la membrane. Ainsi, sans corécepteur CCR5, aucune souche R5 ne se développe. Cependant, ce polymorphisme ne protège pas contre la multiplication des souches X4^{317,318,319}.

Les « Long Term Non Progressors » (LTNP) sont des individus chez qui le nombre de copies du virus reste particulièrement bas (moins de 50 par mL de plasma). La plupart d'entre eux présentent un polymorphisme au niveau des allèles B27 et B57 des Human Leukocyte Antigens (HLA), altérant la capacité du virus à reconnaître et infecter les lymphocytes. Cependant, certains LTPN produisent aussi des anticorps dirigés contre CCR5, ce qui mène à leur internalisation et donc à la réduction de la progression virale³²⁰.

Enfin, d'autres polymorphismes concernant les gènes codant pour des chimiokines sont identifiés sans que le mécanisme de protection soit toujours identifié²⁸¹.

III) 3. 4. 2. Méthodes prophylactiques et thérapeutiques

III) 3. 4. 2. 1. Moyens de protection, de prévention et prophylaxie

Pour limiter le risque de contamination, il faut évidemment éviter les expositions à risque (chapitre 3. 2.). Utiliser un préservatif, proscrire la consommation du lait maternel et se munir de gants adaptés en cas de risque de piqûre en milieu hospitalier sont des gestes vitaux à long terme pour les personnes exposées.

De plus, dans le cas d'une exposition avérée, il existe dans les hôpitaux des procédures spécifiques qui comprennent notamment la prise préventive de traitements antiviraux.

Récemment, la Food and Drug Administration (FDA) a autorisé la mise sur le marché du Truvada, un médicament prophylactique à destination des personnes exposées comme les conjoints de sidéens. Cependant, la prise de ce médicament ne se substitue pas aux autres moyens de prévention et de protection décrits dans ce chapitre^{321,322,323}.

III) 3. 4. 2. 2. Moyens thérapeutiques en cours

Après plusieurs dizaines d'années de recherche et de développement, une vingtaine de molécules sont maintenant à la disposition des médecins et des patients pour lutter contre l'infection. Voici les différents types de médicaments en circulation.

- Les inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse : le premier à avoir été commercialisé (en 1987) est la zidovudine (AZT), qui comme les autres membres de ce groupe bloque la RT en se liant directement au niveau du site catalytique³²⁴.
- Les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse : ces molécules se lient en général de façon allostérique, hors du site catalytique, pour perturber l'action de la RT³²⁵.
- Les inhibiteurs de protéase : la plupart sont des peptidomimétiques, dont le groupement hydroxyéthylène entre en compétition avec le clivage peptidique. Avec les inhibiteurs de protéase, ils forment ce que l'on appelle la trithérapie ou Highly Active AntiRetroviral combination Therapy (HAART) qui a prouvé son efficacité. Cependant, des effets secondaires apparaissent tout de même à long terme, comme l'inhibition de la réplication du génome mitochondrial³²⁶.
- Un inhibiteur d'entrée du virus : le maraviroc est un antagoniste allostérique de CCR5, qui limite son interaction avec les protéines d'enveloppe du virion³²⁷.
- Un inhibiteur de fusion virion : l'enfuvirtide est un peptide capable de se lier avec la gp41 afin de bloquer la fusion membranaire avec la cellule hôte³²⁸.
- Un inhibiteur de l'intégrase virale : le raltegravir parvient à bloquer la recombinaison de l'ADN viral avec le génome de la cellule hôte³²⁹.

Cependant, malgré tous ces moyens thérapeutiques, l'élimination complète du VIH chez un patient atteint est à l'heure actuelle impossible et, même si la qualité de vie des malade a été grandement améliorée, les effets secondaires des traitements et le pronostic à long terme des patients n'est toujours pas satisfaisant.

III) 3. 4. 2. 3. Moyens thérapeutiques en développement

Afin de lutter plus en profondeur contre le VIH, l'un des objectifs est d'éradiquer ses réservoirs, notamment en activant ces virus en dormance via un inhibiteur d'HDAC. Cependant, le risque est évidemment de ne pas contrôler cette progression virale, surtout si d'autres pathogènes sont présents³³⁰.

Pour limiter la destruction des cellules immunitaires qui sont suractivées durant l'infection, il est possible d'utiliser des inhibiteurs comme le celecoxib, avec le risque de ne pas pouvoir répondre à d'autres infections³³¹.

Malgré des années de recherche, la stratégie vaccinale n'a toujours pas fait ses preuves, mais des études sont toujours en cours pour déterminer quel serait le meilleur épitope³³².

Enfin, la thérapie génique par transplantation autologue de cellules résistante est une voie prometteuse, notamment chez les patients répondant mal à la trithérapie.

Par ailleurs, un autre axe de recherche consiste à inhiber l'interaction entre les récepteurs de la cellule hôte et les protéines de l'enveloppe virale. Des méthodes comme le design de molécules similaires au maraviroc, ou des anticorps humanisés dirigés contre les corécepteurs du VIH sont en développement^{333,334,335,336,337}.

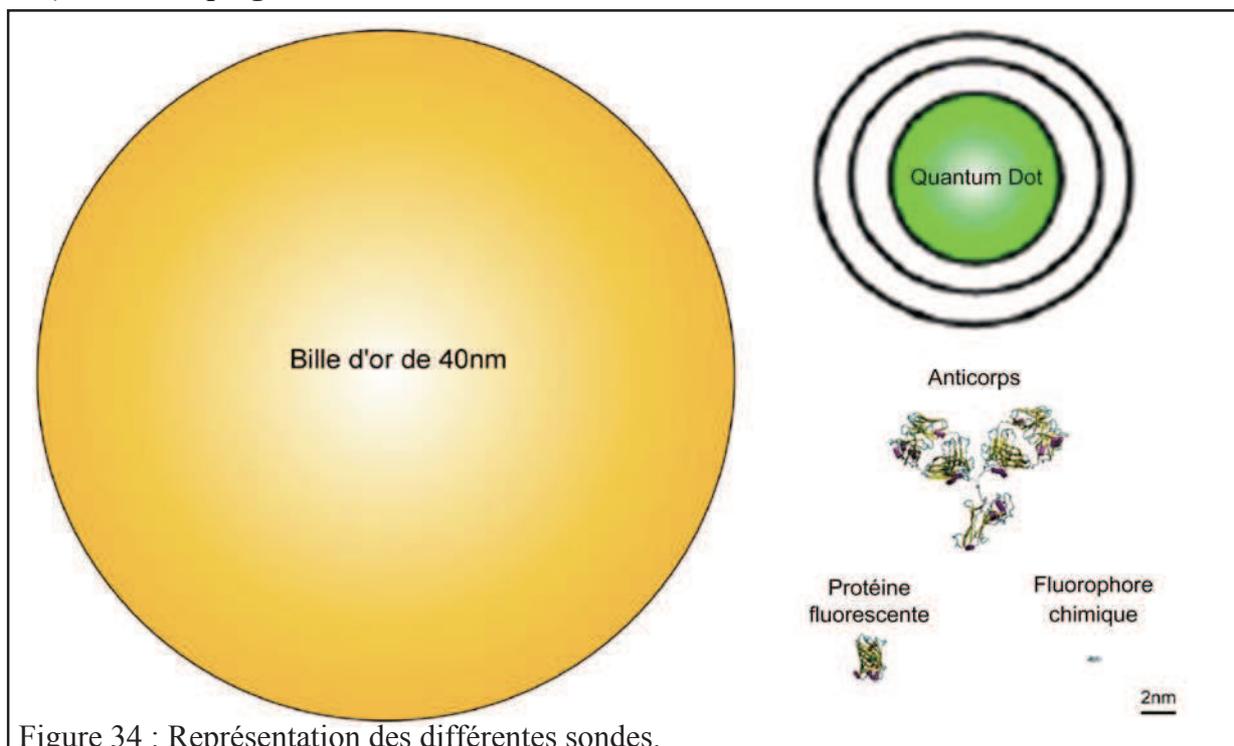
IV) La dynamique membranaire

« Ne jamais confondre mouvement et action » Ernest Hemingway

IV) 1. Techniques d'imagerie et de mesure

Afin d'étudier la dynamique membranaire en général ou la mobilité d'une protéine en particulier au sein de la membrane cellulaire, il faut avant tout choisir ou développer des moyens pour détecter les molécules d'intérêt et des outils pour observer ou mesurer leur diffusion.

IV) 1. 1. Marquages



Différents types de sondes sont aujourd'hui disponibles en fonction de l'application que l'on souhaite en faire (figure 34):

- les billes de latex ou d'or sont des colloïdes de quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres de diamètre, fonctionnalisées pour se lier spécifiquement aux molécules à suivre. L'illumination de ces particules de taille submicrométrique produit pour chacune d'entre elles un profil de diffraction qui permet de les localiser individuellement en temps réel. Bien que cette méthode de marquage pour le suivi en molécule unique soit relativement peu onéreuse, la taille de ces billes et le manque de précision sur leur monovalence conduit à certains résultats artefactuels^{338,339} ;

- les protéines fluorescentes de fusion sont issues de la découverte de protéines naturellement fluorescentes chez certains organismes marins et des travaux de biologie moléculaire développant une large gamme de fluorophores dans le spectre visible. Ainsi, le sous-clonage de la protéine d'intérêt dans un plasmide en fusion avec l'une de ces protéines fluorescentes permet ensuite l'expression exogène de la protéine marquée. L'avantage principal de cette méthode est de marquer spécifiquement avec une stochiométrie de 1 une large population de protéines d'intérêt. Par contre, la surexpression de ces protéines et la fusion en elle-même avec la protéine fluorescente peuvent induire des artefacts que ce soit via un repliement différent de la protéine, ou une altération des interactions avec ses partenaires et/ou son environnement proche. De plus, outre l'utilisation de molécules photoactivables, il est difficile de contrôler le taux d'expression de ces protéines marquées, que l'on observe donc à l'échelle de la population plutôt que de la molécule unique. Enfin, ces fluorophores sont particulièrement photolabiles, si bien que leur excitation et donc leur observation est restreinte dans le temps³⁴⁰ ;

- les fluorophores chimiques comme les cyanines ou les rhodamines sont des molécules de l'ordre du nanomètre qui sont couplées la plupart du temps à un anticorps capable de reconnaître spécifiquement la protéine étudiée. Comme les protéines fluorescentes, il en existe pour toute la gamme spectrale du visible. Ces sondes sont relativement photostables comparées aux précédentes et permettent des observations soit de populations, soit à l'échelle de la molécule unique en fonction de la dilution à laquelle le marqueur est apporté. Par contre, le suivi de molécule fluorescente sur des temps longs (plus d'une minute) n'est pas envisageable à cause de leur photoblanchiment précoce. Enfin, cette stratégie de marquage est en général bien plus délicate et coûteuse que les précédentes³⁴¹ ;

- les Quantum Dots (QD) sont des nanocristaux semi-conducteurs constitués d'un noyau de quelques atomes de Cadmium et de Sélénium et d'une enveloppe inorganique entourée d'un ligand amphiphile. Leur fluorescence est particulièrement intense et stable dans le temps malgré un phénomène de clignotement parfois gênant pour le suivi de molécule. Malgré l'ajout possible de polyéthylène glycol pour réduire les interactions non spécifiques, certaines liaisons indésirables peuvent apparaître, ce qui nuit à la monovalence de ce marqueur. Toutefois, certaines publications récentes montrent que ce problème peut être évité³⁴².

Toutes ces techniques possèdent donc leurs avantages et leurs défauts et sont utilisées avec succès pour suivre différentes molécules membranaires.

Il existe différents types de couplages chimiques directs ou indirects, covalents ou par affinité, entre la sonde et la protéine à étudier. Mais l'un des moyens les plus efficaces et spécifiques est l'utilisation d'un anticorps ou d'un Fab (Fragment antibody) lié à une bille ou un fluorophore et dirigé contre un épitope extracellulaire de cette protéine si elle en possède. Pour les protéines qui n'en présentent pas, l'expression de protéines de fusion fluorescentes est l'option la plus courante. Il est aussi possible d'incorporer dans des membranes modèles voire la membrane plasmique, des lipides ou des protéines préalablement purifiées et marquées *in vitro*, mais les résultats peuvent être biaisés par l'incorporation^{343,344}.

IV) 1. 2. Microscopies et spectroscopies

Pour observer ou mesurer la dynamique membranaire d'une molécule d'intérêt, l'utilisation d'une des stratégies de marquage développées dans le chapitre précédent doit être associée à un système d'illumination ou d'excitation et de détection des sondes, ainsi qu'à l'enregistrement de ces données au fil du temps. Même avec des sondes monovalentes, spécifiques et photostables, l'observation de la dynamique de molécules à la membrane plasmique de cellules vivantes n'est pas triviale et nécessite la plupart du temps le développement de certaines astuces techniques et/ou computationnelles (figures 35 à 38). En effet, l'illumination monophotonique en épifluorescence de l'échantillon excite à la fois les molécules de la membrane basale et apicale, et des éléments autofluorescents non spécifiques. Afin de n'observer qu'un plan de quelques centaines de microns d'épaisseur, aligné sur la membrane, l'une des possibilités est d'utiliser le *pinhole* d'un microscope confocal. En fonction du fluorophore, il est aussi envisageable de scanner la membrane plasmique avec une excitation biphotonique localisée dans un volume de moins d'un femto litre. Dans tous les cas, les signaux d'émissions sont ensuite collectés via des photodiodes à avalanches ou une caméra CCD (Charge Coupled Device)^{345,346,347,348}. Enfin, le système de microscopie de fluorescence avec la réflexion totale interne du laser (TIRFM : Total Internal Reflexion Fluorescence Microscopy) permet d'exciter seulement les fluorophores distants de moins de 300 nanomètres environ de la lamelle de verre qui supporte les cellules. Le principe de cette excitation locale réside dans l'illumination de cette lamelle avec un angle d'incidence critique, auquel la réflexion totale du laser est concomitante à la production d'une onde évanescente de même longueur d'onde, mais ne se propageant dans l'échantillon que sur quelques dizaines à quelques centaines de nanomètres en fonction de la fréquence et de la puissance de la source d'excitation. Cet angle critique peut être obtenu soit par le passage du faisceau laser dans un prisme, soit au travers d'un objectif à grande ouverture numérique³⁴⁹.

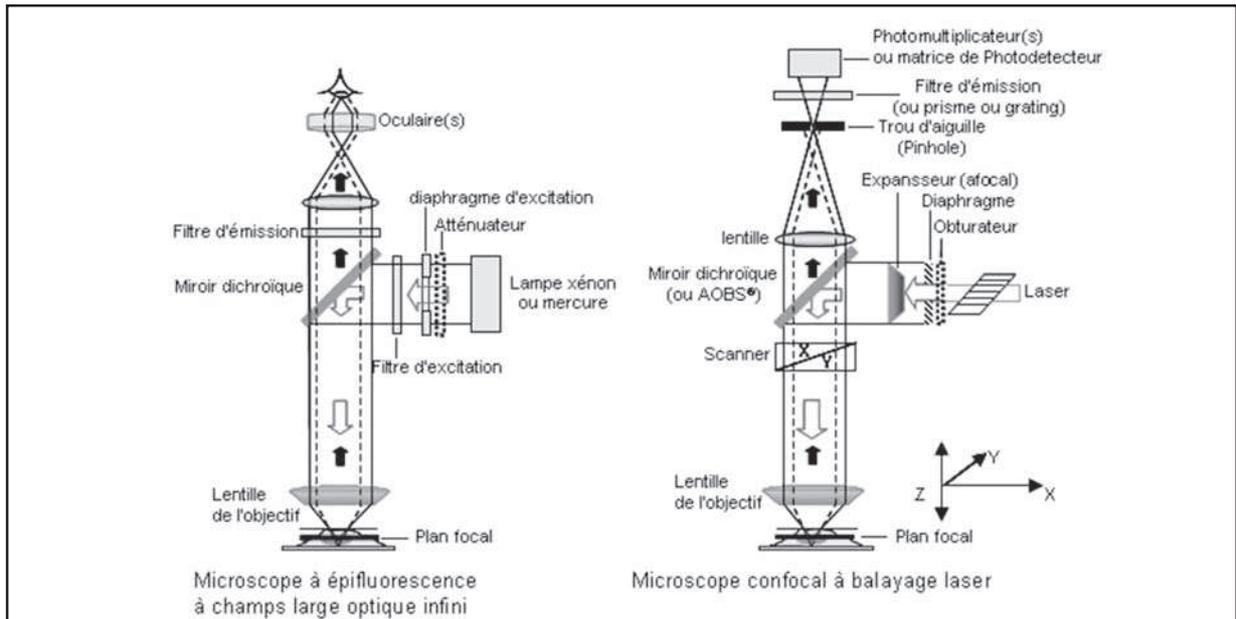


Figure 35 : Comparaison entre un microscope à épifluorescence et un microscope confocal.
 Source : Nikon

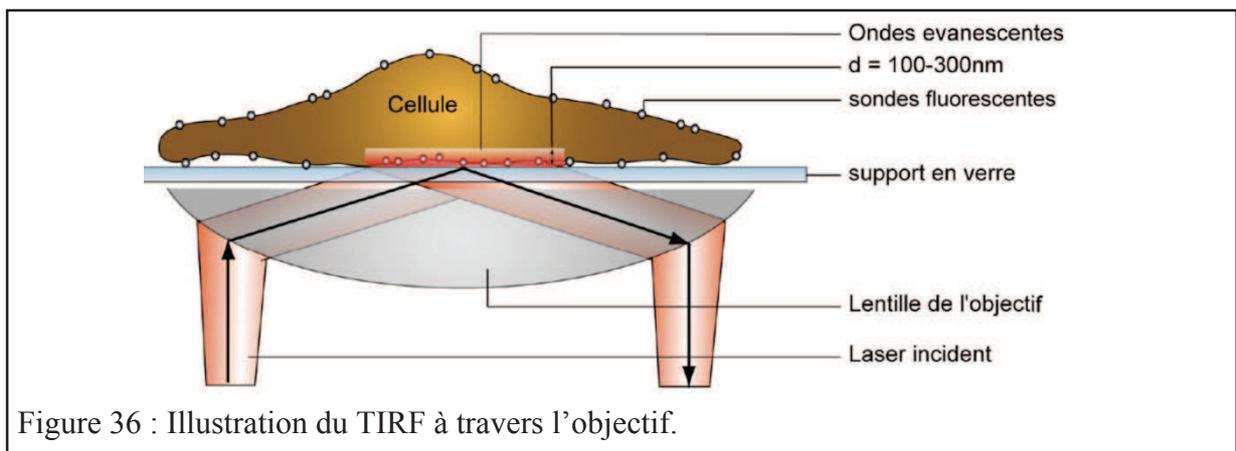


Figure 36 : Illustration du TIRF à travers l'objectif.

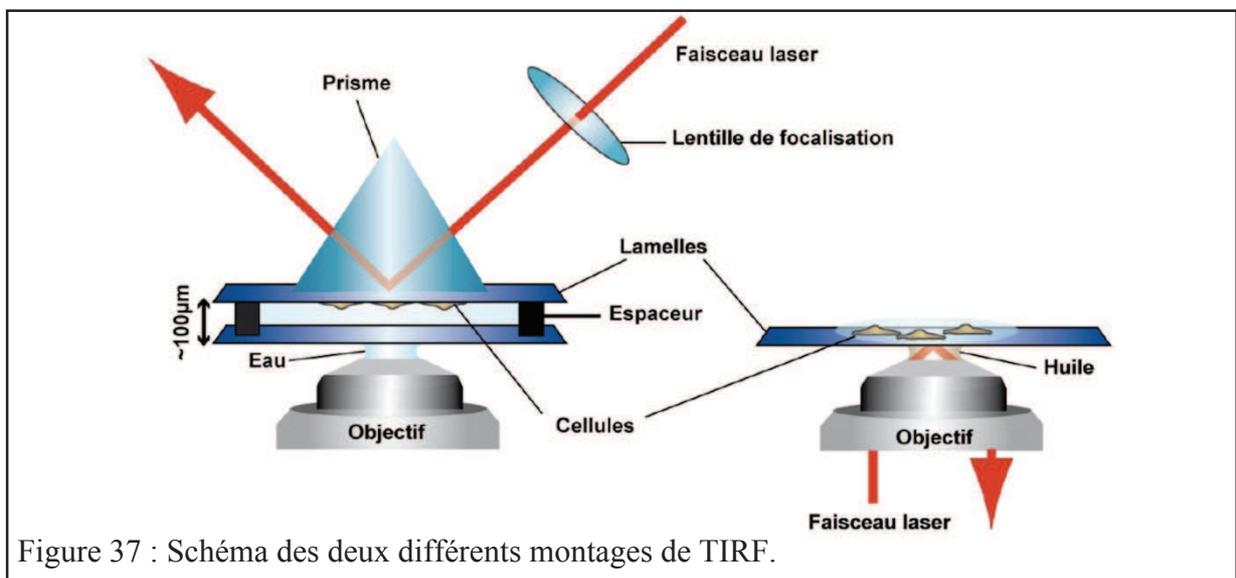


Figure 37 : Schéma des deux différents montages de TIRF.

Type de TIRF	Par l'objectif	Par le prisme
Bruit de fond	Acceptable	Faible
Homogénéité du champ évanescent	Acceptable	Bonne
Accessibilité de l'échantillon	Facile	Difficile
Montage	Simple	Complexe

Figure 38 : Avantages et inconvénients des différents types de TIRF.

IV) 2. Analyse de la dynamique membranaire

IV) 2. 1. Notions de diffusion

A une température donnée correspond une agitation moléculaire qui se caractérise par les vibrations interatomiques et les chocs intermoléculaires du système. Cette instabilité induit de façon mécanique un mouvement aléatoire des particules : le mouvement Brownien. Bien que la découverte d'un processus stochastique lors de l'observation du déplacement de grain de pollens soit établie depuis 1828 par Brown, il faut attendre 1905 et les travaux d'Einstein et Sutherland pour mettre en équation les différents facteurs régissant ces mouvements :

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \text{ avec } D = kT/6\pi\eta R ;$$

où $\langle x^2 \rangle$ représente de déplacement quadratique moyen d'une particule, D la constante de diffusion de cette particule, t le temps, k la constante de Boltzmann, η la viscosité du milieu et R le rayon hydrodynamique de la particule³⁵⁰. Ce modèle montre l'influence de la viscosité du milieu, de la température et de la taille de la particule dans ses propriétés diffusives, mais suppose que le milieu est homogène et le déplacement aléatoire dans les trois dimensions.

Or, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, la membrane plasmique est un espace hétérogène, composé de zones plus visqueuses que d'autres, de points d'ancrage, de barrières, qui peuvent conduire au confinement des particules. Enfin, des mouvements dirigés sont envisageables, notamment via des protéines motrices liées au cytosquelette.

Les mesures de diffusion à la surface des cellules vivantes sont donc complémentaires des techniques d'imagerie d'ensemble et de biochimie, pour mieux saisir l'organisation structurale et dynamique de la membrane plasmique à l'échelle de la molécule et/ou du domaine membranaire. Elles sont à l'origine de l'évolution du concept de mosaïque fluide de Singer et Nicholson vers celui des microdomaines lipidiques, protéiques et à la compartimentation dépendante du cytosquelette.

Parmi ces techniques, il existe d'une part des mesures de la dynamique de populations de molécules marquées et d'autre part le suivi de molécule unique.

IV) 2. 2. Mesures de la dynamique de populations moléculaires

IV) 2. 2. 1. Le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment

Le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) est une technique qui consiste à mesurer l'évolution croissante de l'intensité de fluorescence dans une zone micrométrique après y avoir appliqué une illumination laser intense et brève qui détruit les fluorophores initialement présents (figure 39). Le retour progressif des molécules marquées dans la zone photoblanchie est dépendant d'une part de leur coefficient de diffusion D et d'autre part, fraction mobile M , c'est à dire le pourcentage de molécules marquées qui peuvent diffuser librement dans l'ensemble du champ d'observation. Le coefficient de diffusion est donc d'autant plus haut que la vitesse avec laquelle les molécules marquées parviennent à explorer une surface donnée est grande. La fraction mobile est d'autant plus faible que le nombre de molécules fluorescentes confinées dans un compartiment immobile est important^{351,352}.

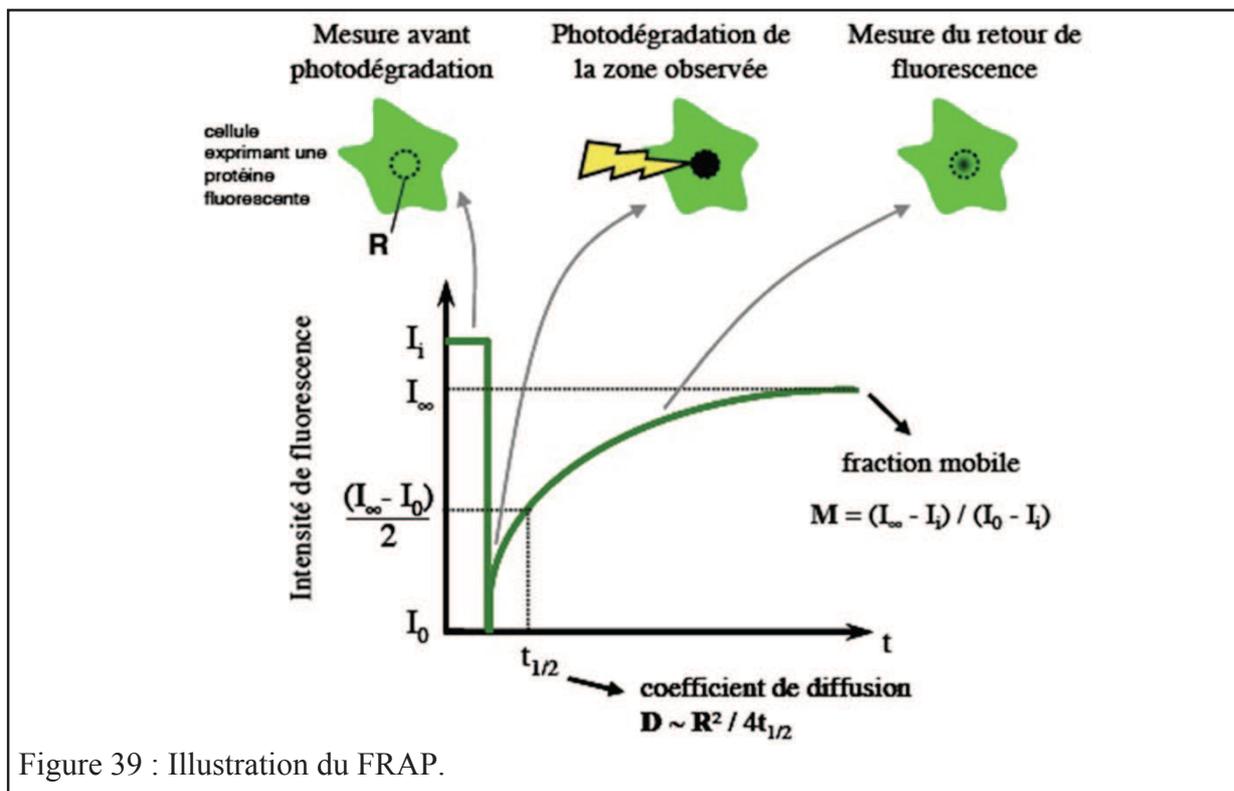
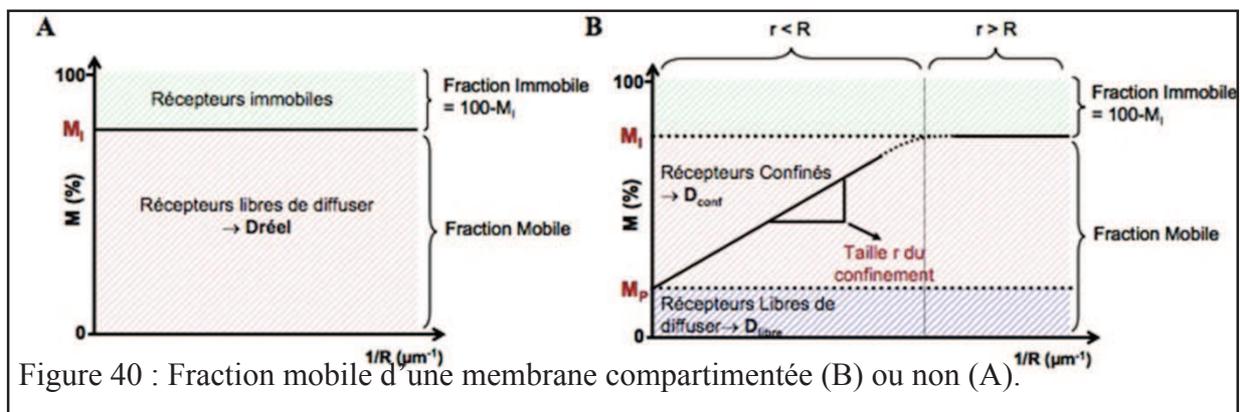


Figure 39 : Illustration du FRAP.

Cependant, les flux ou le trafic membranaire à longue distance et la qualité du photoblanchiment peuvent biaiser les résultats expérimentaux. De plus, la précision sur la mesure de la zone observée et le modèle mathématique utilisé pour analyser ces données influencent directement les valeurs de D et de M . Enfin, cette technique n'informe ni sur la taille ni sur l'homogénéité des domaines de confinement⁴².

Mais le développement du FRAP à rayon variable apporte maintenant à la fois une validation supplémentaire et des informations complémentaires sur les zones de confinement, notamment à la membrane plasmique. En effet, en reproduisant des mesures de FRAP avec différentes tailles de rayon R de photoblanchiment, M et D ne doivent pas varier en fonction de R si et seulement si aucune compartimentation ne chevauche la zone observée. Dans le cas contraire, M et D dépendent de R , ainsi que de la taille r du domaine de confinement. La valeur de M en fonction de l'inverse de R permet d'en déduire r , ainsi que le coefficient de diffusion à l'intérieur (D_{conf}) et à l'extérieur (D_{libre}) de la zone de confinement, si r est plus petit que R ^{353,354} (figure 40).



Enfin, une autre manière d'accéder à des informations sur les propriétés de diffusion en utilisant le photoblanchiment localisé de molécules d'intérêt est le FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching). Cette technique consiste à suivre la décroissance progressive de fluorescence dans une zone adjacente à celle qui subit au préalable un flash pour photodétruire les fluorophores qu'elle contient. Cette méthode permet ainsi d'analyser la continuité entre différentes aires en fonction de leur localisation cellulaire et de leur éloignement l'une de l'autre³⁵⁵.

IV) 2. 2. 2. La spectroscopie de fluctuation de fluorescence

Le FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) repose sur le suivi d'intensité de fluorescence dans un très petit volume pour que la variation au cours du temps du nombre de molécules marquées qui y entrent et/ou en sortent soit quantifiable³⁵⁶ (figures 41 à 44). A partir de cette évolution d'intensité de fluorescence en fonction du temps, il est possible de construire une courbe d'autocorrelation temporelle qui permet d'évaluer la concentration dans le volume d'excitation et de déterminer le coefficient de diffusion.

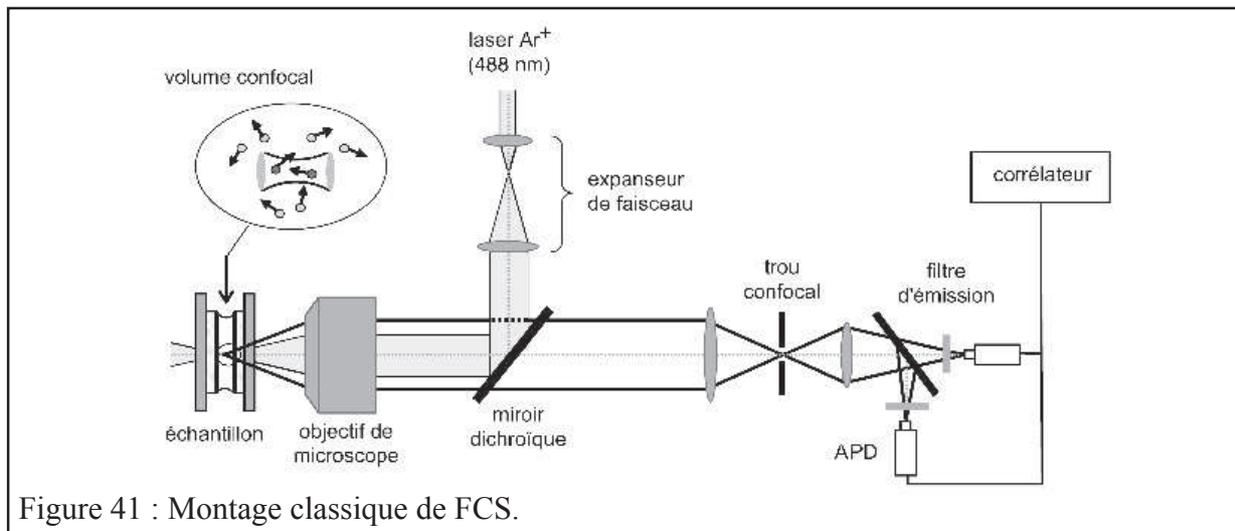


Figure 41 : Montage classique de FCS.

La fonction d'autocorrélation G en fonction du décalage de temps τ s'écrit :

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1$$

$\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$ étant l'écart d'intensité au temps t par rapport à la moyenne ;

Pour une diffusion dans les trois dimensions on obtient :

$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{(1 + (\tau/\tau_D))(1 + a^{-2}(\tau/\tau_D))^{1/2}} + G(\infty) \quad \text{avec :}$$

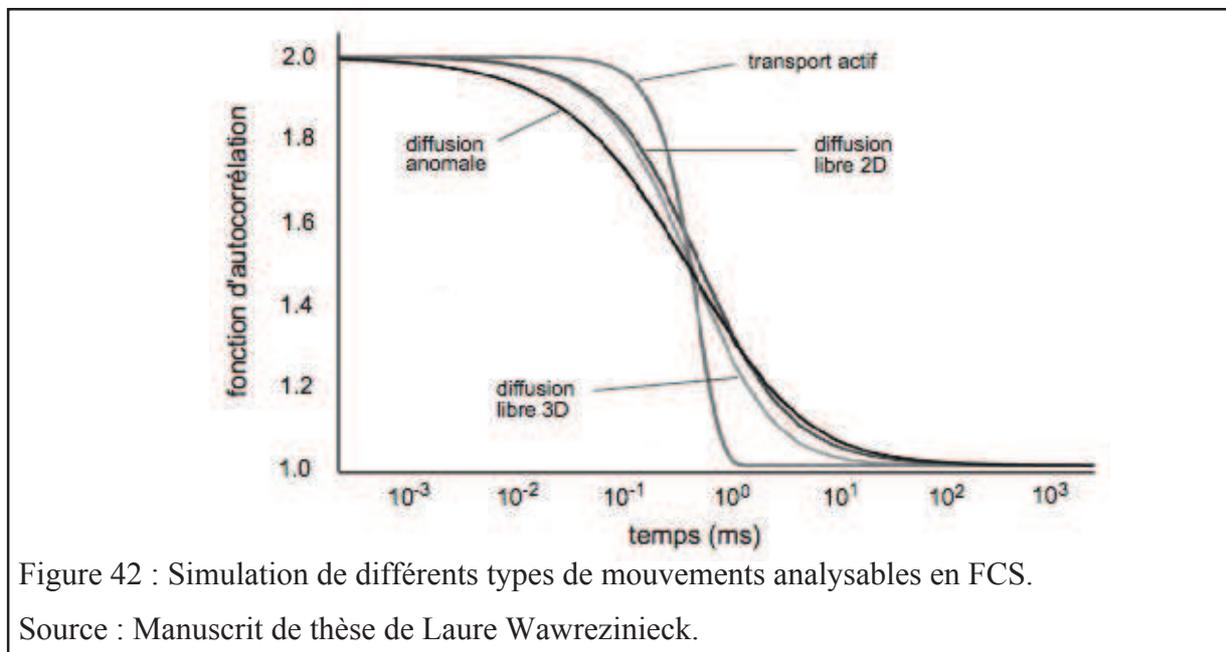
$a = \omega_z / \omega_{xy}$ et τ_D le temps caractéristique de résidence, et :

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} ; \quad V_{\text{eff}} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z$$

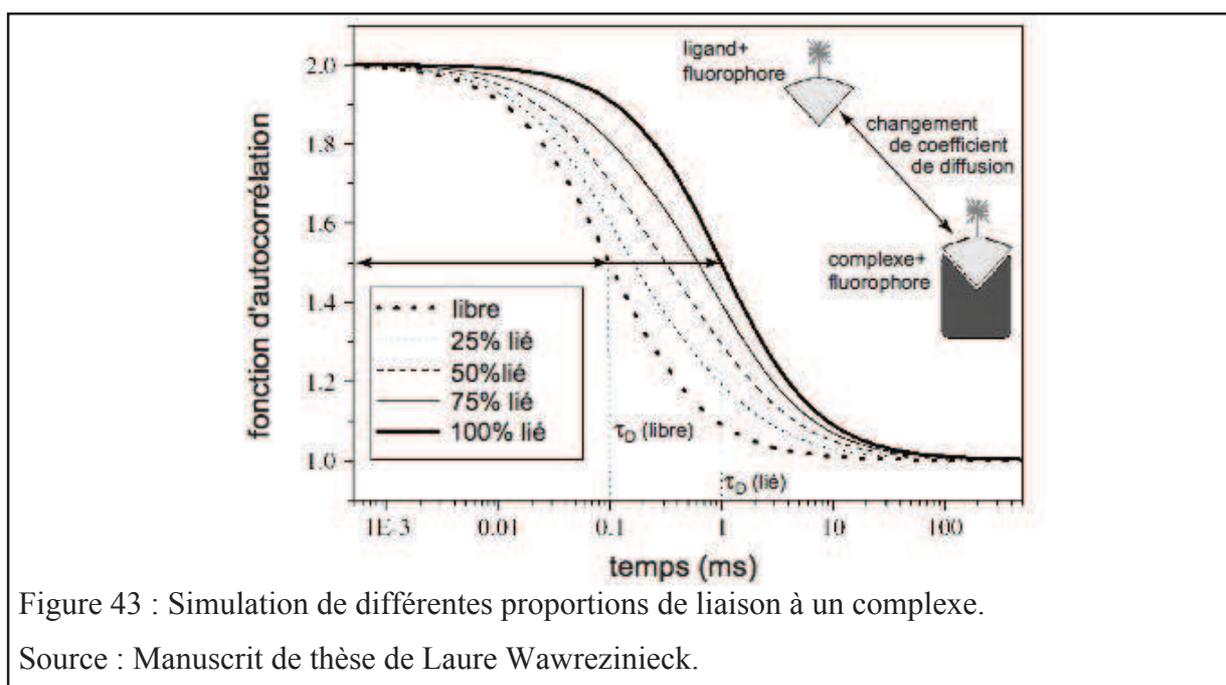
d'où on déduit :

$$D = \omega_{xy}^2 / 4\tau_D$$

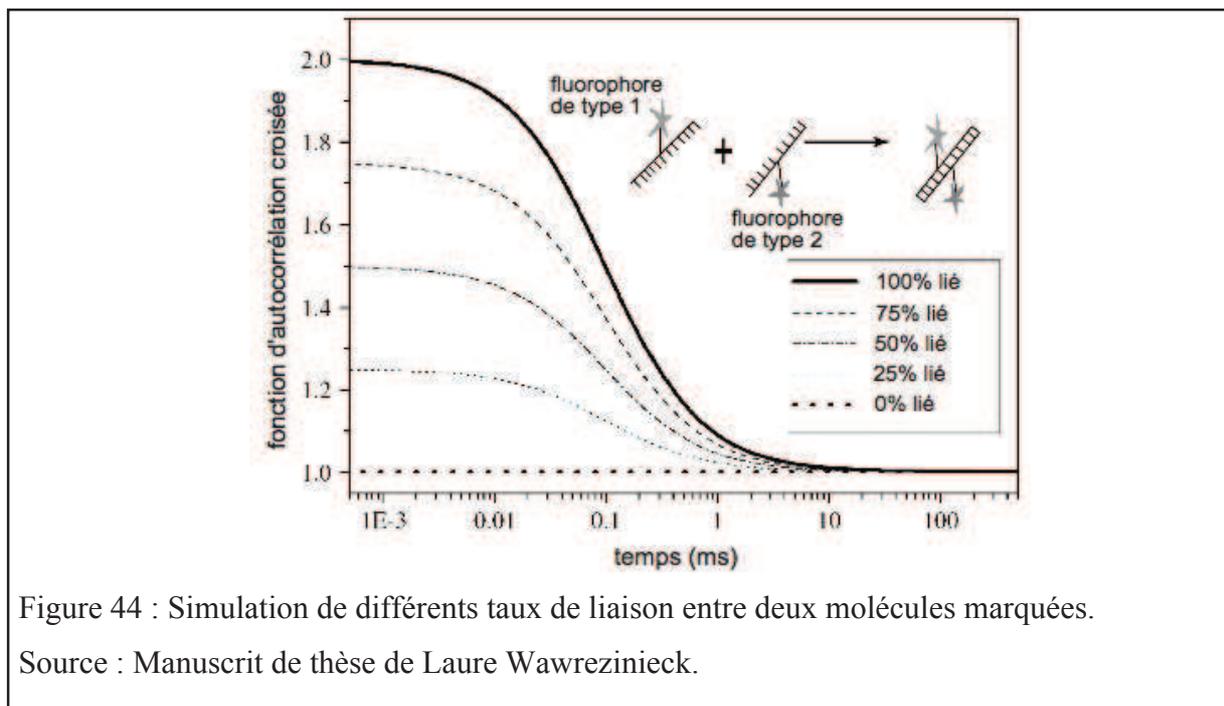
La forme de la courbe d'autocorrélation est donc caractéristique du type de mouvement (diffusion libre, anormale, 3D, 2D, libre, transport actif...).



Il est aussi possible de déterminer la proportion de molécules libres et liées à un complexe donc la diffusion est plus lente voire confinée.



Par ailleurs, il existe aussi la possibilité de suivre en parallèle les fluctuations de fluorescence dans le même volume de deux molécules marquées différemment afin d'évaluer la part de mouvements communs. La fonction de corrélation croisée entre les intensités des deux sondes permet donc de calculer la proportion de diffusion simultanée et donc la proportion de liaison entre les molécules d'intérêt.



L'un des principaux défauts du FCS classique est d'appliquer des mesures uniquement dans le même espace, ce qui ne permet pas d'explorer ce qui se produit en parallèle dans le reste de l'échantillon et induit par ailleurs un photoblanchiment progressif indésirable dans ce volume. Pour pallier ce problème, il existe maintenant le FSC à balayage (sFCS : scanning FCS) qui permet d'effectuer en parallèle des mesures (le plus souvent en cercle) à différentes positions x/y sur le même échantillon, allant jusqu'au suivi du flux de particules ou la cartographie générale des coefficients de diffusion sur la surface analysée³⁵⁷. Un développement de ces méthodes est la spectroscopie de corrélation d'images (ICS : Image Correlation Spectroscopy) qui permet d'analyser ces variations sur des temps longs³⁵⁸.

Enfin, l'analyse de la distribution des intensités de fluorescence mesurées apporte dans certains cas des informations sur l'oligomérisation des molécules marquées, puisque celle-ci est directement liée à la brillance relative observée. Ainsi, pour chaque pixel analysé, la brillance moyenne est liée à la variance et à l'intensité moyenne, ce qui permet théoriquement de cartographier dans le temps et l'espace le nombre de molécules marquées réparties sur le plan de l'échantillon³⁵⁹.

IV) 2. 3. Mesures à l'échelle de la molécule unique

Les méthodes en molécules uniques apportent des avantages considérables dans l'analyse des résultats, comparé aux mesures groupées sur des populations moléculaires :

- elles permettent de mettre en lumière des populations hétérogènes dans leur activité, leur structure ou leur localisation qui ne seraient pas identifiable par les méthodes conventionnelles qui ne donnent que la moyenne de ces différents états ;
- elles révèlent aussi les hétérogénéités dynamiques, c'est à dire les comportements transitoires que présente chaque molécule et qui est en général masqué dans les mesures globales ;
- elles révèlent différents types d'événements rares qui ne seraient pas détectés par des moyens classiques ;
- elles peuvent donc apporter des informations précises sur la cinétique thermodynamique à l'équilibre de chaque composant d'un système donné plutôt que de récolter la moyenne des états par des méthodes conventionnelles.

Cependant, les techniques d'analyse en molécule unique nécessitent un échantillonnage important afin de valider une certaine reproductibilité, ainsi que le développement d'outils efficaces pour garantir que chaque élément mesuré l'est de façon individuel et précis. Le suivi de molécule unique nécessite donc un marquage spécifique des molécules d'intérêt et un système de localisation précis de ces molécules dans le temps et l'espace. L'analyse de chaque trajectoire conduit à la détermination des propriétés diffusives de la molécule correspondante et un grand nombre de données doivent être collectées et regroupées sans masquer les populations minoritaires, afin de quantifier chaque type de mouvement.

Que la molécule d'intérêt soit marquée avec une bille, un fluorophore organique ou synthétique, son illumination se fait en général à une longueur d'onde bien supérieure à son diamètre, ce qui induit un signal d'émission constitué de différents disques de diffraction³⁶⁰.

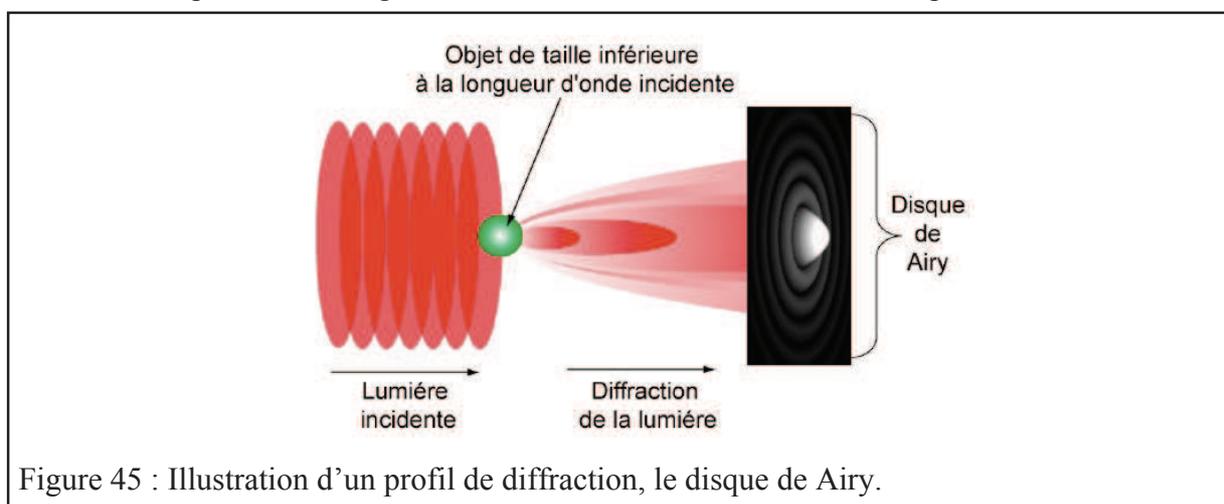


Figure 45 : Illustration d'un profil de diffraction, le disque de Airy.

Chaque molécule produit donc un disque de Airy (figure 45) dont l'intensité fonction de la distance par rapport au centre $k_B(x)$ est définie par :

$$k_B(x) = \left(\frac{2J_1(r)}{r} \right)^2 \text{ avec } r = \left(\frac{2\pi ON}{\lambda} \right) |x|$$

où ON est l'ouverture numérique de l'objectif, λ est la longueur d'onde et J_1 est la fonction de Bessel de première espèce et d'ordre un, dont le premier zéro définit le rayon de Airy, R . Selon Rayleigh, le pouvoir séparateur d'un tel système optique est défini par la distance entre deux points objets pour laquelle le maximum d'intensité du disque de Airy du premier point est superposé au premier minimum d'intensité du disque du second point et vaut théoriquement :

$$R \approx \frac{1,22\lambda}{2ON}$$

Différents algorithmes existent pour optimiser la résolution latérale et déterminer la position précise de chaque particule, sur chaque image, notamment pour le suivi de molécule unique. Il est généralement admis que pour un faible ratio signal sur bruit et un profil de diffraction, l'algorithme le plus approprié consiste à ajuster chaque spot sur une gaussienne bidimensionnelle dont le centre correspond à la position de la particule. L'équation est de la forme :

$$G(x, y) = A \times \exp \left[- \frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{B} \right]$$

où x_0 et y_0 sont les coordonnées du centre du spot et A et B des constantes³⁶¹.

Pour chaque image d'un film, il est ainsi possible de déterminer avec précision la position de chaque particule³⁶². Pour reconstruire les différentes trajectoires, il faut ensuite choisir entre une méthode globale ou séquentielle. La première consiste à appliquer un algorithme (de Vogel) sur l'ensemble des images afin de retracer les liens entre les différents points selon leur proximité relative en minimisant la probabilité de dispersion³⁶³. Cet outil est particulièrement rapide et efficace pour un nombre de trajectoire assez faible par rapport à la surface analysée, mais source d'erreurs qui ne sont pas facilement identifiables si la densité de marquage est trop importante. La méthode séquentielle quant à elle, permet de relier les points d'une image à ceux de la suivante de façon chronologique, soit manuellement, soit grâce à des algorithmes capables de repérer les points voisins entre les temps t et $t+1$. Cette méthode est beaucoup plus longue que la première, mais assure un contrôle plus efficace des trajectoires construites.

Ces mouvements à la membrane plasmique peuvent être mis en équation en exprimant le déplacement quadratique moyen $\langle r^2 \rangle$ d'une particule simulée ou suivie en molécule unique par rapport à différents intervalles de temps³⁶⁴ :

$$\langle r^2(n\delta t) \rangle = \frac{1}{N-n} \sum_{j=0}^{N-n-1} \left([x(j\delta t + n\delta t) - x(j\delta t)]^2 + [y(j\delta t + n\delta t) - y(j\delta t)]^2 \right)$$

où δt correspond à la résolution temporelle (temps entre deux points), $x(j\delta t)$ et $y(j\delta t)$ sont les coordonnées de la particule au temps $t = j\delta t$; avec N le nombre total d'intervalles définis pour la trajectoire analysée et $n = 0, 1, 2, \dots, N-1$.

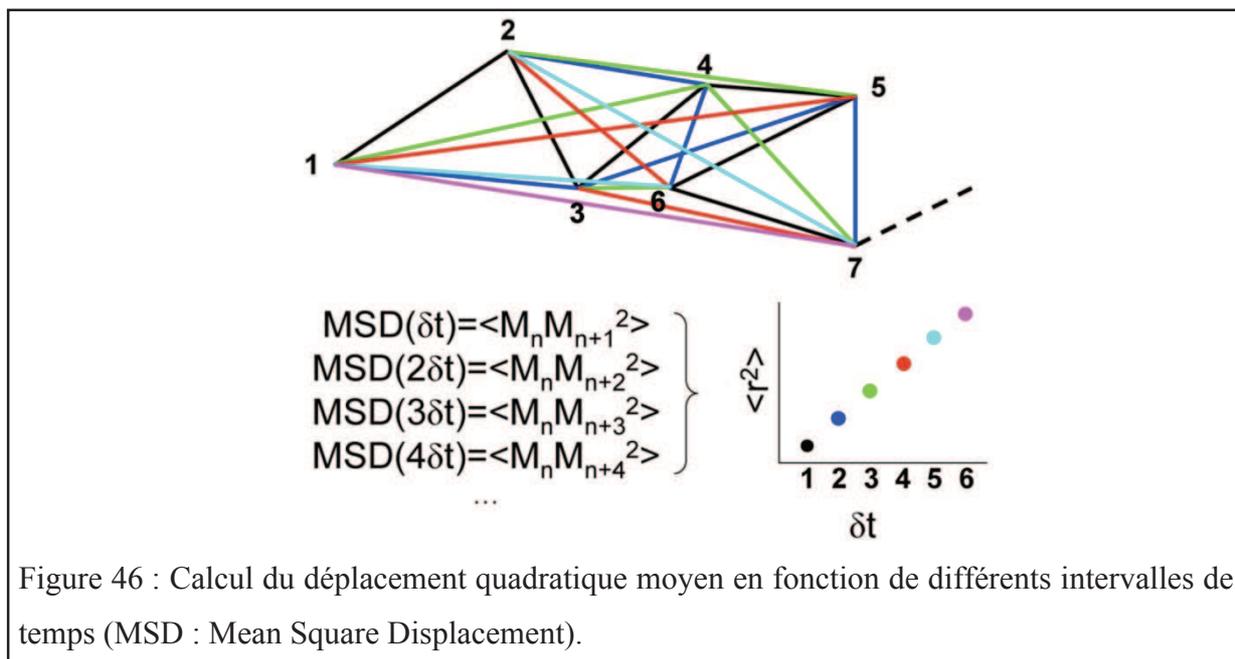


Figure 46 : Calcul du déplacement quadratique moyen en fonction de différents intervalles de temps (MSD : Mean Square Displacement).

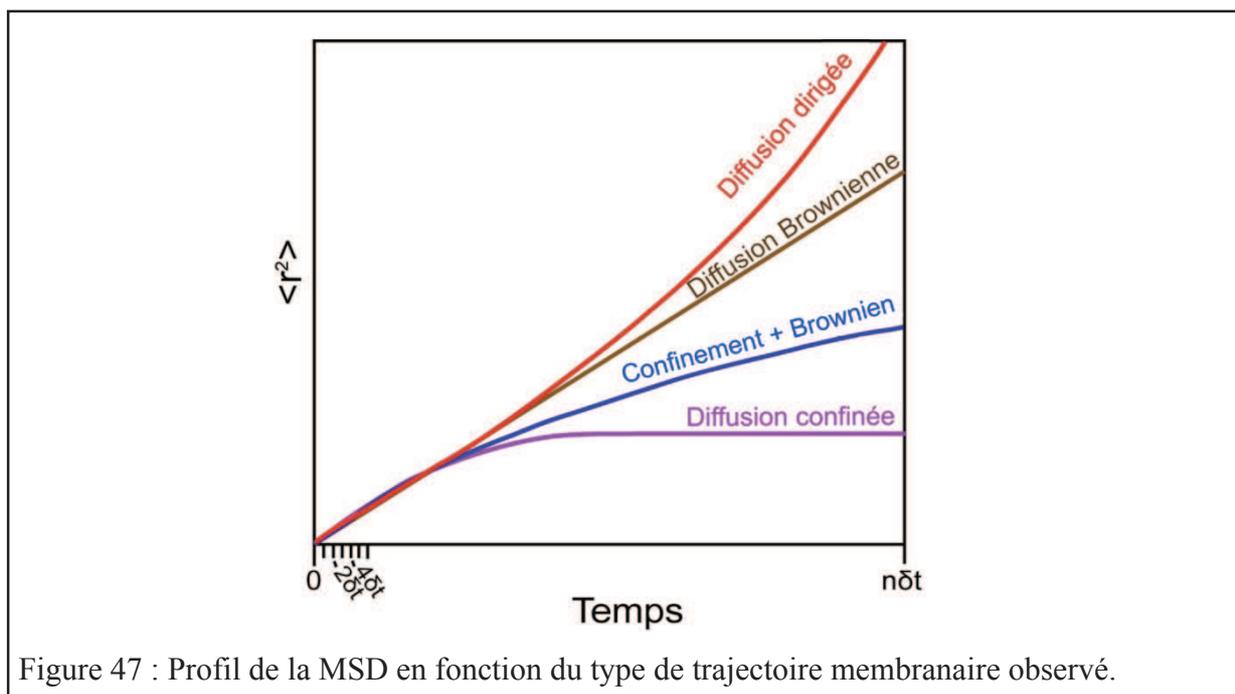


Figure 47 : Profil de la MSD en fonction du type de trajectoire membranaire observé.

A partir de la MSD, il est ainsi possible de déduire le type de trajectoire et de déterminer le coefficient de diffusion D (figures 46 et 47) ainsi que la taille de la zone de confinement éventuelle L, en ajustant la courbe obtenue pour chaque trajectoire sur les équations suivantes.

Pour un mouvement purement Brownien :

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt$$

Pour une diffusion dirigée de vitesse V :

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt + (Vt)^2$$

Pour une diffusion anormale, c'est à dire intermédiaire entre libre et confinée :

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt^\alpha \text{ avec } \alpha < 1$$

Pour un mouvement confiné dont la diffusion est restreinte à un domaine de taille L :

$$\langle r^2 \rangle = \frac{L^2}{6} - \frac{16L^2}{\pi^4} \sum_{k=1(\text{odd})}^{\infty} \frac{1}{k^4} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{k\pi}{L}\right)^2 2D_{\text{micro}} t_{\text{lag}}\right\}$$

k étant une constante⁸⁰.

Pour un confinement auquel s'ajoute une diffusion libre et lente au fil du temps³⁶⁵ :

$$\langle r^2 \rangle = \frac{L^2}{6} - \frac{16L^2}{\pi^4} \sum_{k=1(\text{odd})}^{\infty} \frac{1}{k^4} \exp\left\{-\frac{1}{2}\left(\frac{k\pi}{L}\right)^2 2D_{\text{micro}} t_{\text{lag}}\right\} + 4D_{\text{macro}} t_{\text{lag}}$$

Cependant, les travaux reposant sur l'étude de la MSD se confrontent à certaines limitations. En effet, des simulations et des analyses sur trajectoires réelles montrent que seuls les premiers points de la MSD sont exploitables pour appliquer une régression linéaire notamment.

C'est pourquoi différents groupes effectuent ce calcul sur les premiers points³⁶⁶. De plus, la longueur de la trajectoire joue directement sur la précision de la mesure, ce qui impose de suivre les particules sur plusieurs dizaines de points en général.

Cela dit, l'augmentation ou la réduction de l'intervalle de temps entre chaque image peut aussi avoir une influence sur le résultat, puisqu'il donne accès à des informations différentes en terme de taille de confinement par exemple. Il convient donc de trouver la vitesse d'acquisition cohérente avec la problématique biologique à étudier et de toujours utiliser des vitesses comparables pour confronter différents résultats.

En plus des trajectoires totalement Browniennes, confinées, ou dirigées, il existe *in vivo* des mouvements mixtes qui combinent ces différents types de diffusion. C'est d'ailleurs le cas de CD9, qui passe successivement d'un régime Brownien à un confinement, avant de retrouver une diffusion libre, lorsqu'il interagit transitoirement avec une zone enrichie en tétraspanines.

Or, l'analyse de la MSD ne permet pas directement de repérer les changements de type de mouvement au sein d'une même trajectoire. C'est pourquoi il existe maintenant différentes méthodes pour identifier ce type de transition pour chaque trajectoire.

La première consiste à appliquer la fonction de probabilité $P(r^2, t)$ développée par Schütz et Schmidt, pour déterminer la proportion relative de chaque mouvement^{367,368,369,370}. Il est aussi possible d'utiliser les variations de vitesse à partir du coefficient de diffusion instantanée et d'en déduire des changements de régime (valable pour des transitions assez nettes)^{371,101,372}.

Par ailleurs, l'indice de corrélation de vitesse (qui se rapproche du rayon de giration d'une portion de trajectoire à l'autre) est une autre méthode pour identifier les mouvements dirigés au sein d'une trajectoire^{373,374}.

Pour les confinements transitoires, il existe aussi un algorithme pour les caractériser : Simson propose que pour un coefficient de diffusion sur l'ensemble de la trajectoire D , la probabilité ψ que la particule reste dans une aire de taille R durant un temps t est définie par³⁷⁵ :

$$\log \psi = 0,2048 - 2,5117Dt / R^2$$

Sur la base de cette dernière méthode, une façon plus rigoureuse d'isoler des portions confinées dans la trajectoire s'appuie sur la démonstration par simulations que le confinement est réel si $\Lambda > 4$ dans l'équation :

$$\Lambda = \frac{D_{1-2} \Delta t}{\Delta R^2}$$

où Λ représente l'index de confinement dans un segment Δt de la trajectoire, avec un coefficient de diffusion D_{1-2} mesuré par régression linéaire entre les points 1 et 2 et ΔR^2 la variance des distances entre les points du segment³⁷⁶.

Enfin, notre laboratoire est doté d'une technique d'analyse par un réseau de neurones qui permet de déterminer pour une fenêtre glissante de 31 points, si la MSD de cette portion correspond plutôt à un mouvement Brownien, confiné ou dirigé. Il est ainsi possible d'attribuer un type de mouvement pour chaque point, dès que la trajectoire analysée fait plus de 30 images, ce qui implique de sélectionner des trajectoires assez longues, mais permet de mettre en lumière avec précision et de façon automatique les différents changements de régime pour chaque trajectoire (voir l'annexe correspondante).

D'autres méthodes ne reposant pas sur la MSD se développent toutefois en parallèle, comme l'approche Bayésienne proposée par Masson et Alexandrou qui consiste à relier la variance de la dispersion des points constituant une trajectoire en fonction du temps et du rayon considéré. Il est ainsi possible de déterminer pour chaque trajectoire l'existence et la taille de portions confinées^{377,378}.

IV) 2. 4. Etude de la dynamique membranaire

L'ensemble des méthodes décrites dans les chapitres précédents permet de confirmer dans un premier temps que la dynamique des molécules à la membrane plasmique est particulièrement lente par rapport aux mesures dans les membranes modèles³⁷⁹. Ce phénomène s'explique par l'hétérogénéité et la complexité de la membrane plasmique, facteurs qui restreignent la diffusion latérale de ses constituants. Des zones de confinement et des plateformes stables enrichies en lipides et en protéines sont mises en évidence par ces différentes techniques. Pour expliquer l'influence du cytosquelette, des interactions protéine-lipide et protéine-protéine sur ces domaines membranaires, plusieurs modèles d'organisation sont proposés comme les rafts, le fence-picket ou les réseaux protéiques (voir le chapitre I).

C'est en effet l'étude de la dynamique membranaire qui démontre d'une part, l'existence de zones où les molécules persistent, et d'autre part, des confinements transitoires, dont la taille ne dépasserait pas quelques centaines de nanomètres^{380,381,382,383}.

De façon intéressante, le taux de cholestérol membranaire influence la diffusion latérale des composants membranaires, mais peut aussi moduler leur répartition à l'intérieur et à l'extérieur des zones de confinement. Ces résultats soulignent l'importance des lipides dans la structure de la membrane plasmique, surtout au niveau des différentes plateformes^{384,385,386,387}.

Par ailleurs, la diminution de la température affecte aussi la dynamique membranaire, que ce soit par la réduction de l'agitation moléculaire globale ou la génération d'un plus grand nombre de domaines larges de confinement^{388,389,390}.

Selon le groupe de Mc Connel et Moener, la désorganisation du cytosquelette par des drogues (comme la cytochalasine D pour l'actine et le nocodazole pour les microtubules) n'ont aucun effet sur la dynamique membranaire de certaines protéines à ancre GPI. Cependant, le cytosquelette est impliqué dans la ségrégation de certains récepteurs à l'acétylcholine aux jonction neuromusculaire, ou dans l'exclusion de la podocalyxine au niveau des cils des cellules épithéliales, notamment grâce à des protéine intermédiaire de pontage entre l'actine et la membrane plasmique comme les ERM (Ezrine, Radixin, Moésine)^{89,90,91}. De plus, les travaux du groupe de Kusumi suggèrent qu'il existe un maillage cortical d'actine qui induirait le confinement transitoire (hop diffusion entre des compartiments de 30 à 230 nm) de différentes protéines membranaires comme les récepteurs à la transferrine, les E-cadhérines, les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (MHC II), mais aussi des protéines à ancre GPI telles que CD59^{391,80,392,393,394,395,396}.

En définitive, l'étude de la dynamique des constituants membranaires révèle l'existence de zones de confinement dont la taille varie entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres, en échange avec le reste de la membrane plasmique, sous l'influence de la température, du cholestérol, du cytosquelette, donc des interactions protéine-lipide et protéine-protéine.

L'exemple du réseau et des domaines enrichis en tétraspanines (voir chapitre II) illustre bien la complexité des différents niveaux d'interactions qui peuvent contrôler la dynamique de ces molécules à l'intérieur et à l'extérieur des zones de confinement. Il reste ainsi beaucoup à faire pour saisir les mécanismes de nucléation et de régulation de ces phénomènes, notamment lors de processus cellulaires ou infectieux²³².

Plusieurs études sur la diffusion du VIH ou de ses partenaires membranaires nous renseignent déjà sur la dynamique de ces molécules et la cinétique de fusion du virus lors des premières étapes de l'entrée du virus^{397,398,399,400,401}. Cependant, au début de mon travail de thèse, aucune étude n'avait encore été menée pour déterminer quelle était la dynamique membranaire associée aux zones d'assemblage et de bourgeonnement du VIH.

Problématiques de thèse

Malgré plusieurs dizaines d'années de recherche, les mécanismes moléculaires d'assemblage et de bourgeonnement des particules virales de type VIH-1 dans les cellules infectées sont encore relativement mal connus. Il semble toutefois établi que la multimérisation de la protéine Gag s'effectue à la membrane plasmique et que le bourgeonnement des particules virales a lieu au niveau de régions enrichies en tétraspanines. Ces protéines transmembranaires forment un réseau d'interactions protéiques à la surface de la cellule et sont organisées en microdomaines enrichis en cholestérol et sphingolipides mais clairement différents des radeaux lipidiques de type raft.

En utilisant la technique de suivi de molécules uniques fluorescentes sur des cellules HeLa exprimant la protéine Gag, le premier objectif de mon travail de thèse est de déterminer l'influence de l'assemblage et du bourgeonnement de pseudoparticules virales sur la dynamique et la répartition membranaires des tétraspanines CD9 et CD81. Il s'agit aussi de comparer cette dynamique à celle des constituants des rafts, microdomaines membranaires également présents au niveau des zones de bourgeonnement.

Des travaux préliminaires de Cédric Espenel, ancien étudiant en thèse du laboratoire, avaient montré que les protéines CD9 et CD81 présentaient une mobilité et une proportion de confinements différentes dans les cellules cancéreuses de prostate PC3. Alors que ces deux protéines possèdent une forte homologie (64%) et un certain nombre de partenaires communs, le second objectif de ma thèse a consisté à confirmer cette différence de comportement dans différents types cellulaires et à trouver les déterminants moléculaires impliqués. Pour cela, différentes chimères de CD9 et de CD81 ont été étudiées, ainsi que le rôle des éléments du cytosquelette dans ces phénomènes de diffusion membranaire. Enfin, une implication fonctionnelle de cette différence a été explorée dans le contexte de l'infection du VIH-1.

Résultats et discussion

D) Analyse en molécule unique de l'influence de l'assemblage du VIH-1 sur la dynamique et la répartition membranaire des tétraspanines CD9 et CD81

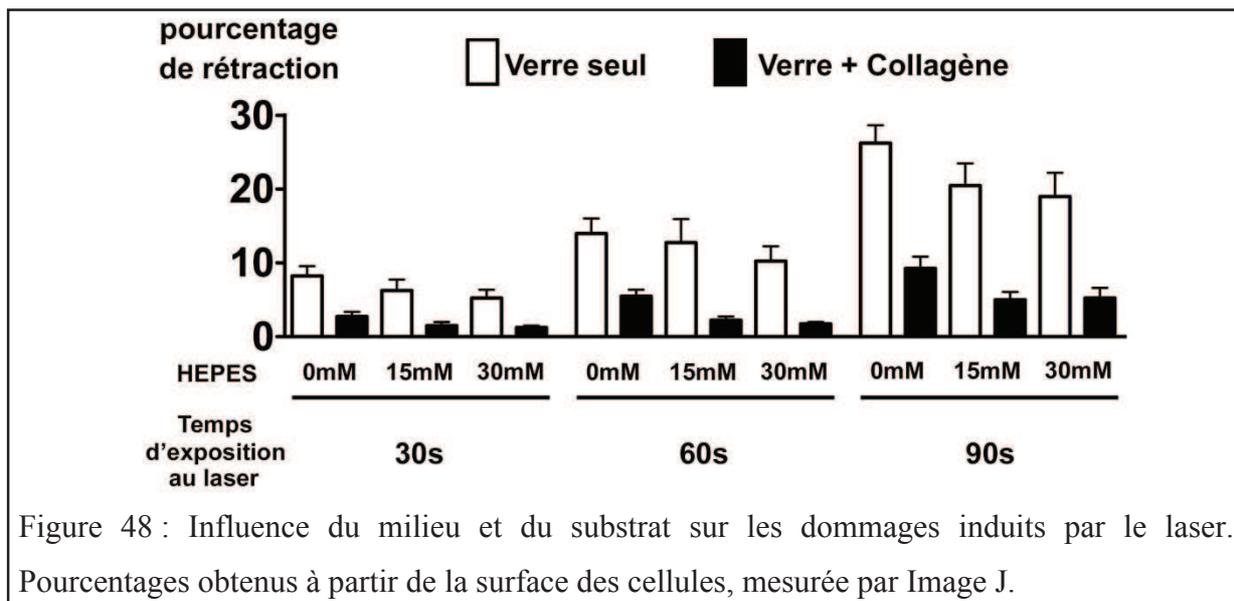
I) 1. Approches expérimentales et travaux préliminaires

I) 1. 1. Expression membranaire de pseudo virus sur cellules vivantes

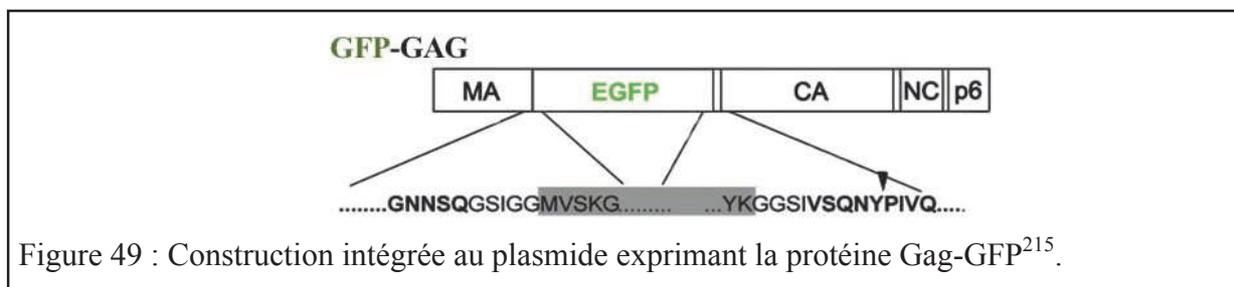
Pour visualiser les phénomènes d'assemblage et de bourgeonnement du VIH, il est indispensable au préalable d'exprimer les protéines virales marquées et d'observer leur apparition à la membrane de cellules vivantes.

Bien que la plupart des cellules cibles du VIH soient des cellules en suspension telles que les lymphocytes, le virus est aussi susceptible d'infecter des cellules adhérentes comme les cellules dendritique ou les macrophages⁴⁰². Par ailleurs, l'étude de ces processus dans des cellules en suspension telles que des Jurkat implique leur adhésion à un substrat de Poly-lysine, ce qui induit des cascades de signalisation au sein de ces cellules, qui perdent ainsi leur état natif⁴⁰³. De plus, la petite taille et la forme particulièrement arrondie de ces cellules ne permet pas de suivre facilement dans le temps et l'espace les protéines qui diffusent à la membrane plasmique⁴⁰⁴.

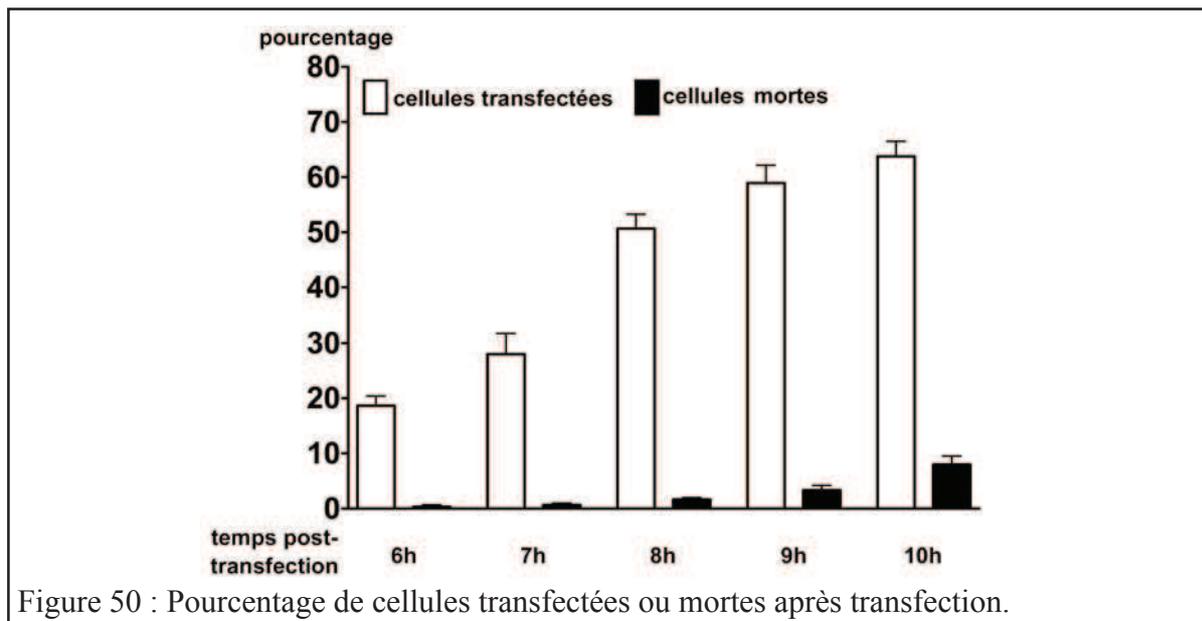
Les cellules HeLa ont déjà été utilisées pour étudier les processus d'assemblage membranaire du VIH-1^{405,406}. Ce type cellulaire est une alternative de choix pour les expériences de suivi de molécules uniques, de par ses propriétés d'adhésion et de résistance aux dommages photophysiques⁴⁰⁷. Cependant, ces cellules sont tout de même susceptibles de s'arrondir et de se dégrader sous l'effet de l'illumination laser si le milieu ou le substrat n'est pas approprié ou la puissance du laser trop importante. Nous avons ainsi testé différents milieux et substrats afin de déterminer les paramètres idéaux pour accomplir nos expériences sur cellules vivantes. Nous avons observé qu'après 30 secondes d'exposition, les cellules se rétractent de façon significative, sauf si un substrat de collagène et un milieu enrichi en Hepes est utilisé (figue 48). Nous avons donc traité au collagène des lamelles de verre supportant les cellules pour renforcer l'adhésion à leur substrat, puis les cellules ont été incubées avec les sondes dans une solution contenant de l'Hepes pour réguler le pH extracellulaire.



La polyprotéine Gag est capable à elle seule d'effectuer les étapes d'auto-assemblage membranaire, jusqu'à la formation de pseudo virions^{408,409}. Mais l'expression de la protéine Gag-GFP (figure 49) conduit à des bourgeonnements anormaux, caractérisés en microscopie électronique⁴¹⁰. Pour pallier ce problème il suffit de coexprimer la protéine Gag-GFP avec la protéine Gag non marquée⁴¹¹.



Tout comme il nous a fallu optimiser la composition du milieu et du substrat, les conditions de transfections ont dû être adaptées. Nous avons observé que les meilleurs taux de transfection étaient obtenus en transfectant 1µg de chaque plasmide par puits de 30mm, dans lesquels les cellules présentent environ 50% de confluence. Dans ces conditions, les premiers spots fluorescents apparaissent entre 6 et 7 heures après la transfection. Une à deux heures plus tard, plus de 50% des cellules présentent à leur membrane plusieurs dizaines de bourgeonnements viraux. Par contre, 10 heures après l'introduction des plasmides dans les cellules, le nombre de cellules rondes ou éclatées (suite à la production massive de virions) atteint plus de 10%, pour moins de 1% deux heures plus tôt (figure 50). Nous avons donc choisi de mener nos expériences 8 à 9 heures après la transfection.



1) 1. 2. Choix des protéines et lipides membranaires étudiées

Comme il a été précédemment décrit dans l'introduction, les tétraspanines CD9 et CD81 sont largement exprimées dans les cellules humaines¹¹³. De plus, leur expression pourrait moduler la progression virale et elles sont présentes dans l'enveloppe des virions²¹³. Enfin, leur localisation au niveau des zones d'assemblage et de bourgeonnement du VIH suggère que ces tétraspanines sont spécifiquement impliquées dans ces processus infectieux²¹⁵. Cependant, l'étude de la dynamique et de la répartition membranaire de ces tétraspanines nécessite la mesure en parallèle des paramètres de diffusion d'autres protéines témoins afin d'évaluer la spécificité des phénomènes observés. C'est pourquoi nous avons utilisé CD46 comme contrôle négatif : une protéine membranaire de type I avec une partie extramembranaire constituée de quatre domaines CCP (Complement Control Protein), recrutée lors de l'activation du complément (Membrane Co-factor Protein) et des lymphocyte T^{412,413}. Dans de rares cas, CD46 s'associe à certaines tétraspanines, mais elle est en général exclue des zones enrichies en tétraspanines et des radeaux lipidiques^{414,232}. Nous nous sommes aussi intéressés à CD55 (ou DAF : Decay Accelerating Factor), une autre protéine du complément possédant des domaines extracellulaires similaires à ceux de CD46, mais liée à la membrane via une ancre GPI^{415,416} (figure 51). Cette protéine s'associe donc aux rafts mais pas aux zones enrichies en tétraspanines. De façon remarquable, CD55 et CD46 (dans une moindre mesure) sont aussi retrouvées dans la membrane des virions du VIH, mais leur expression ne module pas la progression virale comme le font CD9 et CD81⁴¹⁷. Cependant, lorsque ces travaux de thèse ont débuté, aucune expérience de colocalisation n'avait encore été menée pour évaluer la spécificité et l'importance de cette association avec le bourgeonnement du virus.

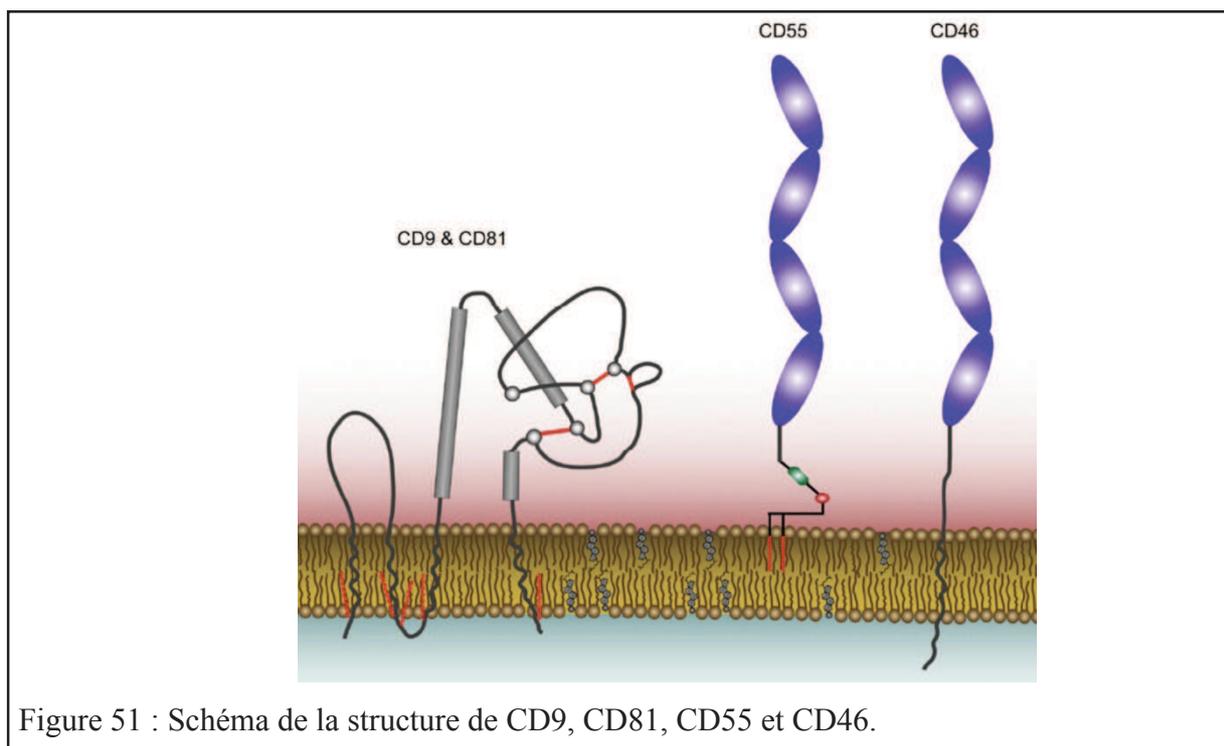


Figure 51 : Schéma de la structure de CD9, CD81, CD55 et CD46.

En collaboration avec l'équipe de Markus Thali (Vermont, Etats-Unis), nous nous sommes aussi intéressés en parallèle au GM1, un glycosphingolipide utilisé comme marqueur des rafts et colocalisé avec la polyprotéine Gag du VIH^{418,419,420,421,422}.

Nous avons voulu évaluer l'influence du cholestérol dans les mécanismes observés en traitant la cellule à la cholestérol oxydase. Contrairement à la méthyl- β -cyclodextrine qui est décrite pour ces effets non spécifiques sur des membranes modèles et qui est assez toxique pour les cellules, cette enzyme agit spécifiquement en oxydant le cholestérol en cholesténone, ce qui déstabilise les interactions avec ses partenaires sans altérer la composition générale de la membrane plasmique^{423,424,425}. Les cellules sont incubées 10 à 30 minutes avec 0,5 à 5 unités de cholestérol oxydase. Nos résultats montrent qu'en dessous de 20 minutes, l'action de l'enzyme n'est pas suffisante et qu'au delà de ce temps, ou à des concentrations supérieures à 1U/mL, la toxicité du traitement n'est plus négligeable (figure 52). Nous avons donc choisi de mener nos expériences avec un traitement de 20 minutes à 1U/mL. Bien que le taux de cholestérol oxydé ne dépasse pas les 25% dans ces conditions, notons que l'enzyme n'agit que sur le cholestérol membranaire alors que ce taux comprend l'ensemble du cholestérol de la cellule (dans toutes les membranes).

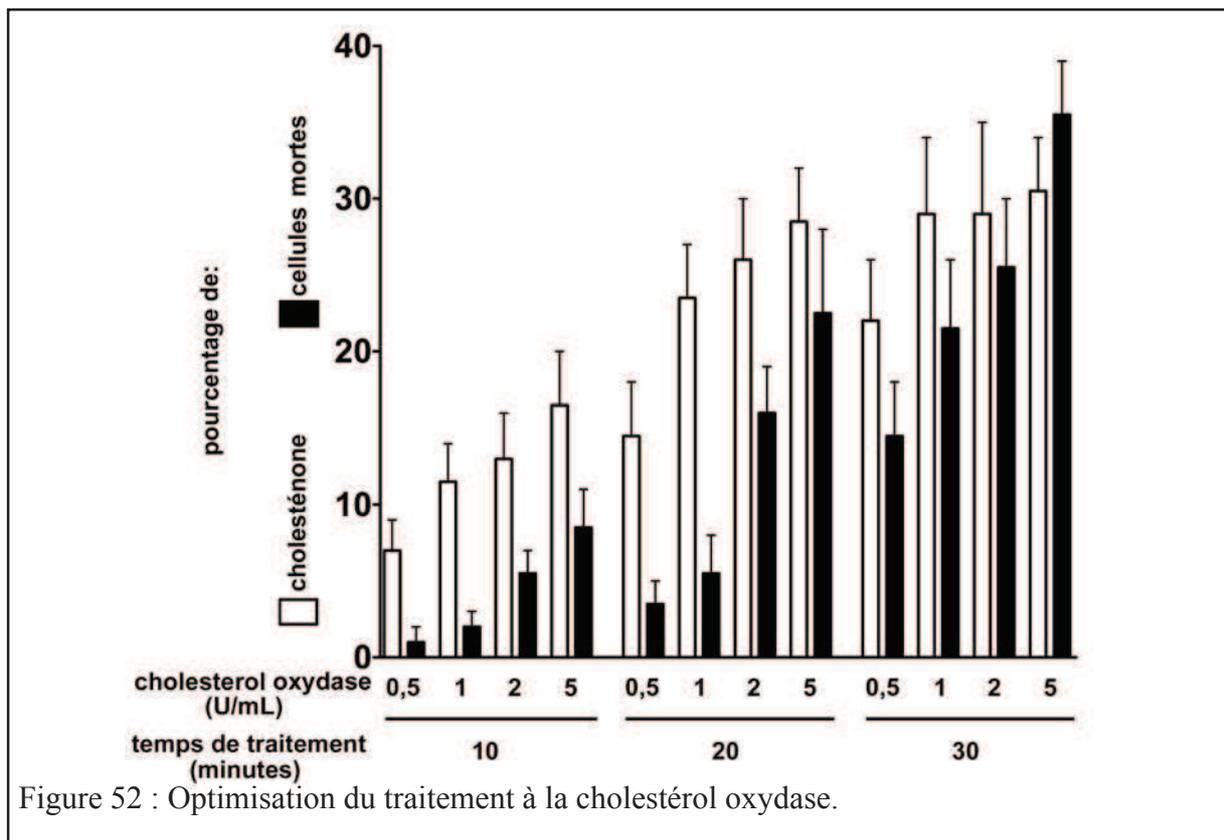


Figure 52 : Optimisation du traitement à la cholestérol oxydase.

1) 1. 3. Choix, synthèse et purification des Fab dirigés contre les protéines d'intérêt

Pour marquer les différentes protéines d'intérêt, il nous a fallu dans un premier temps purifier des anticorps monoclonaux obtenus grâce à notre collaboration avec le groupe d'Eric Rubinstein (U1004, Villejuif, France). Les ascites de souris passent donc par une colonne de protéine G, avant d'être lavés et élués. Cependant, les IgG obtenues sont des anticorps bivalents, si bien qu'ils peuvent induire des pontages entre tétraspanines comme décrit plus loin et montré pendant la thèse de Cédric Espenel au CBS²³². Pour vérifier cette hypothèse et choisir la méthode la plus appropriée à notre étude, nous avons donc généré des Fab à partir de ces anticorps. Pour cela, une digestion à la papaine suivie d'une purification sur colonne d'exclusion a été nécessaire (figure 53).

Les anticorps complets (Ab) ou les fragments monovalents (Fab) ont ensuite été indépendamment marqués avec des fluorophores utilisables en suivi de molécule unique et différents au niveau spectral comme Atto647N et Cy3B. Il s'est avéré que ces fluorophores, de par leur fort caractère hydrophobe, adhéraient aux colonnes de purification, si bien que cette étape de marquage des Fab ne doit intervenir qu'en dernier pour obtenir un meilleur rendement (figure 54).

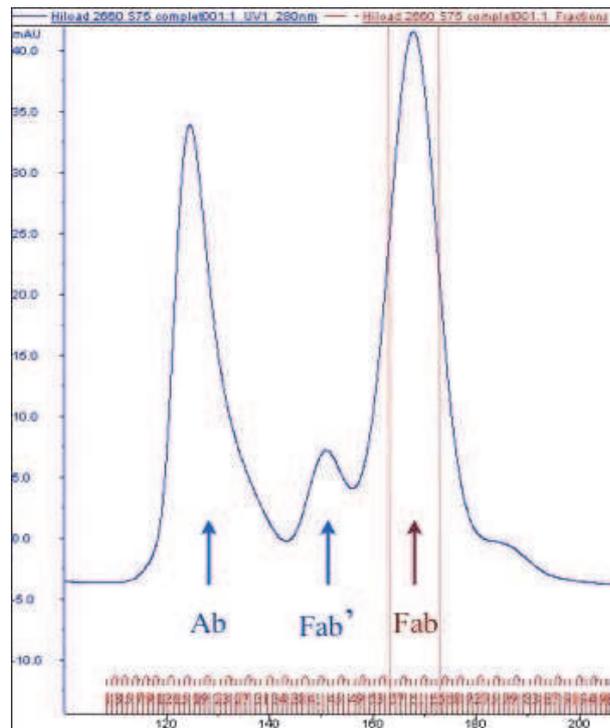


Figure 53 : Profil d'élution en gel filtration après digestion d'anticorps à la papaïne. Cette image a été choisie pour mettre en évidence les réactifs et les produits de la réaction. Après optimisation des conditions de digestion à la papaïne, le rendement de la réaction est en effet bien plus important (jusqu'à 90%), si bien que le pic Ab n'est quasiment plus visible.

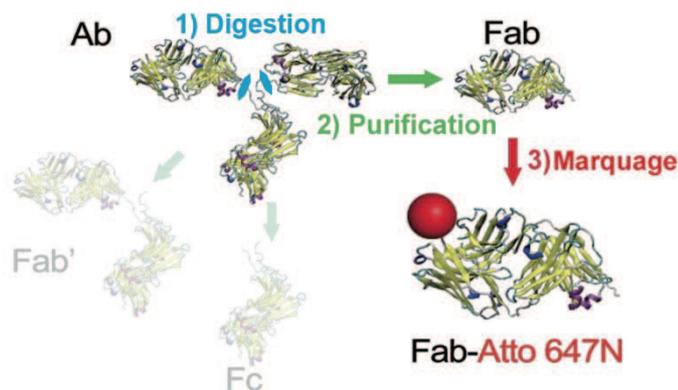
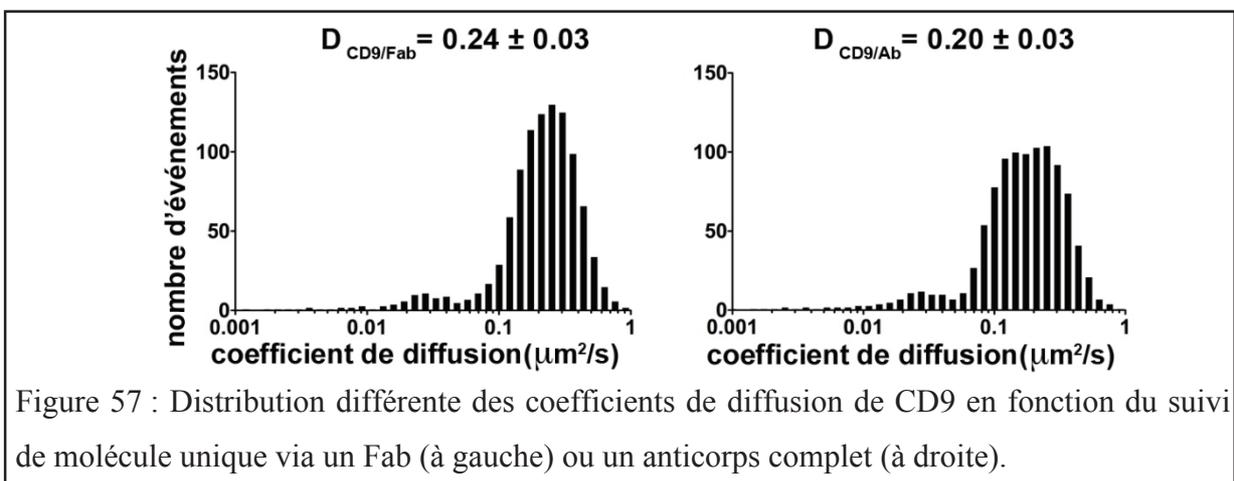
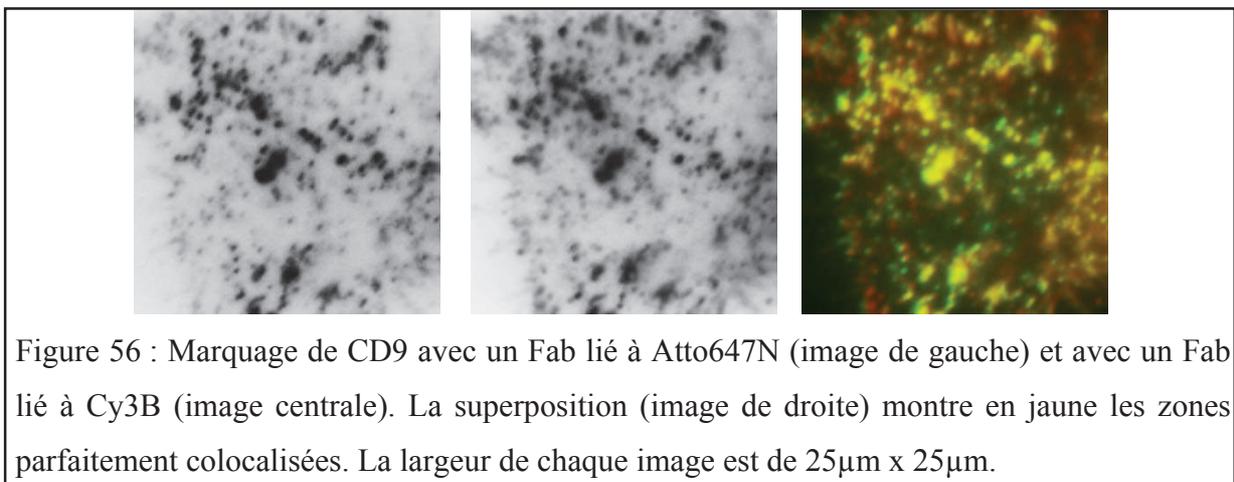
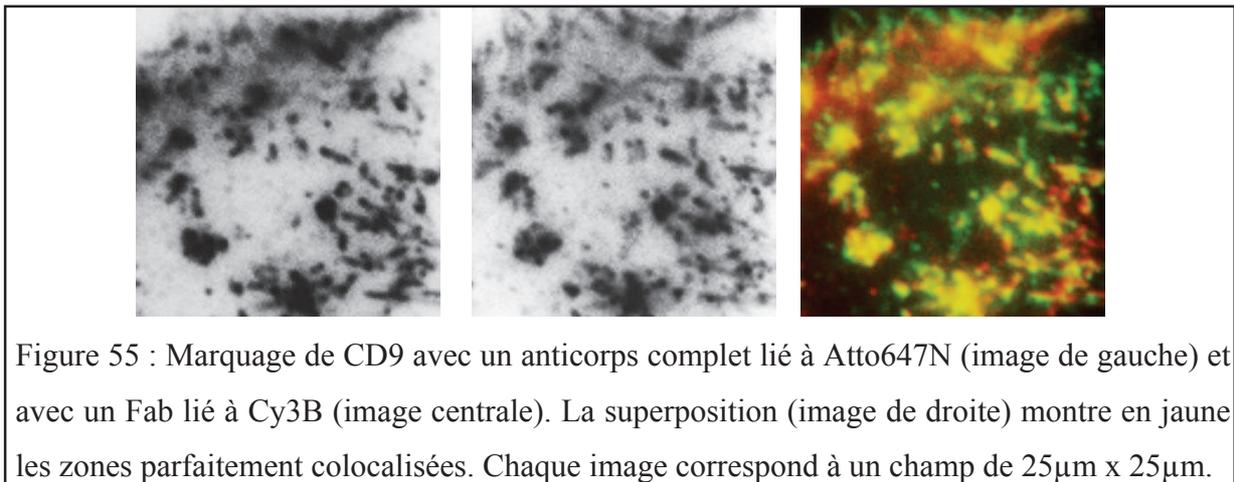


Figure 54 : Résumé des différentes étapes pour générer nos Fab marqués.

Le couplage se produit au pH et à la concentration optimisés pour que le succinimidyl ester lié au fluorophore réagisse majoritairement avec l'amine N-terminale d'un anticorps avec statistiquement moins d'un fluorophore par anticorps ou par Fab.

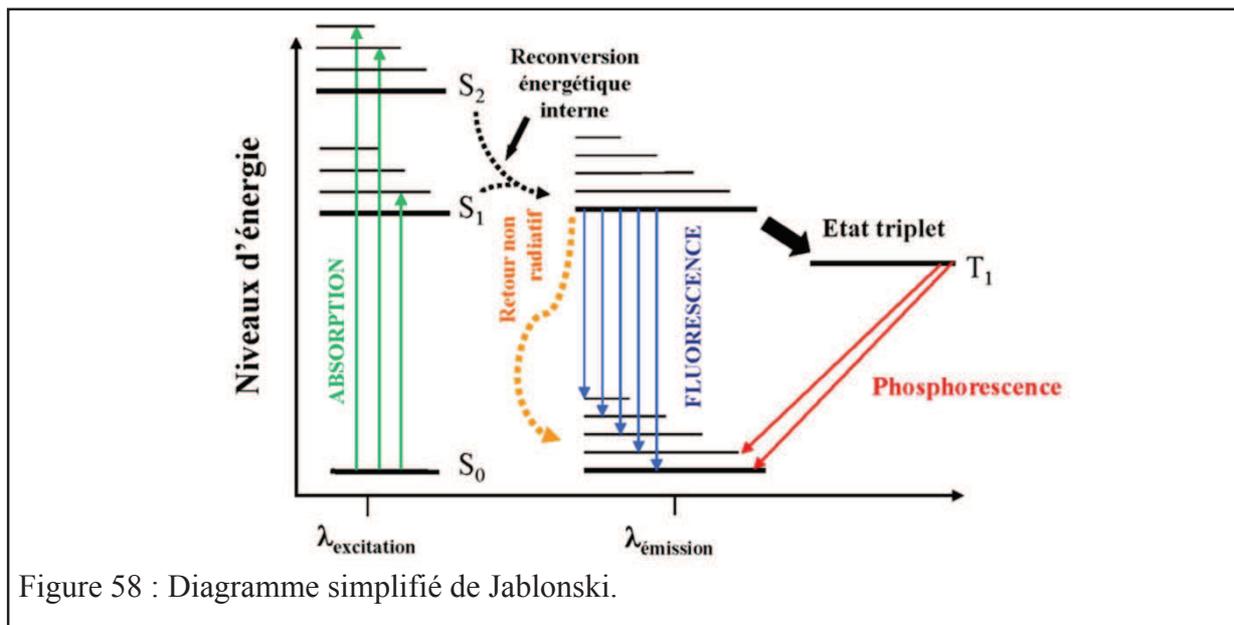
Nous avons ensuite vérifié que les Ab et les Fab reconnaissent les mêmes zones enrichies lors du comarquage des tétraspanines CD9 ou CD81 sur cellules vivantes (figure 55).

La taille des plateformes semble plus importante et le marquage moins diffus lors de l'utilisation d'anticorps complets par rapports aux Fab (figure 56). De plus, nos expériences de suivi de molécule unique avec des anticorps complet ou des Fab, montrent que la distribution des coefficients de diffusion est différente (figure 57). Ces résultats montrent un effet de pontage avec les anticorps complets qui incite à utiliser plutôt les Fab.

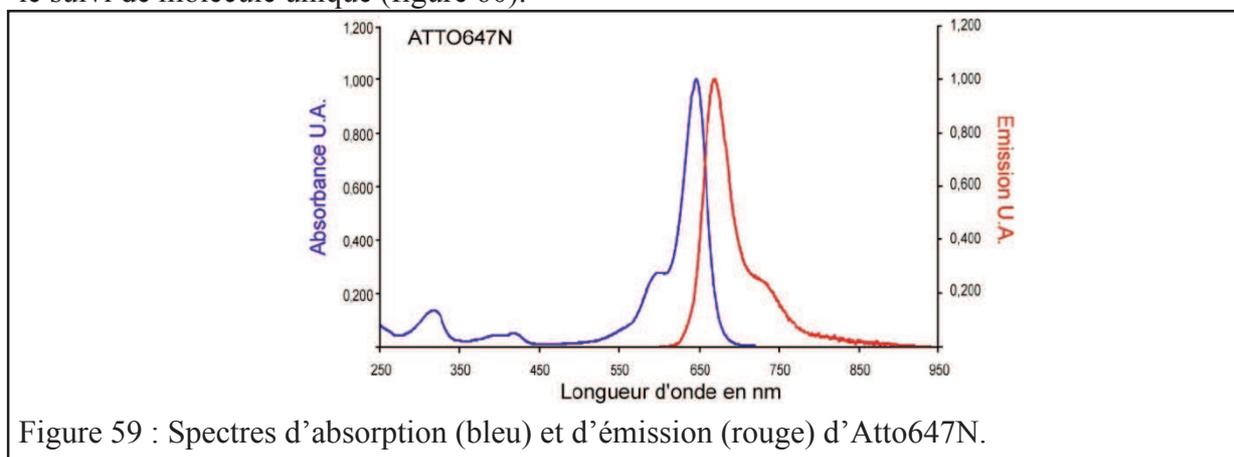


D) 1. 4. Choix du fluorophore, montage expérimental et acquisition des données.

Rappelons que lorsqu'une molécule absorbe un photon, elle passe d'abord d'un état fondamental, où les électrons de sa couche périphérique peuplent les orbitales de plus faible énergie, à un état excité où l'énergie d'absorption permet à un électron d'atteindre transitoirement une couche ou un niveau vibrationnel supérieur. L'énergie potentielle ainsi créée peut ainsi produire un photon et/ou de la chaleur lors du retour à l'état fondamental. Le diagramme de Jablonski (simplifié en figure 58) illustre différentes transitions énergétiques entre les couches (traits épais) et les niveaux énergétiques vibrationnels (traits fins)⁴²⁶.



Ainsi, chaque molécule fluorescente est caractérisée par un spectre d'absorption et un spectre d'émission, décalé par rapport au précédent vers les longueurs d'ondes plus grandes, selon la loi de Stokes. Remarquons que les spectres d'Atto647N sont assez fins et relativement éloignés des longueurs d'ondes qui correspondent à l'autofluorescence cellulaire (figure 59). De plus, sa forte brillance et sa photostabilité importante en font un fluorophore de choix pour le suivi de molécule unique (figure 60).

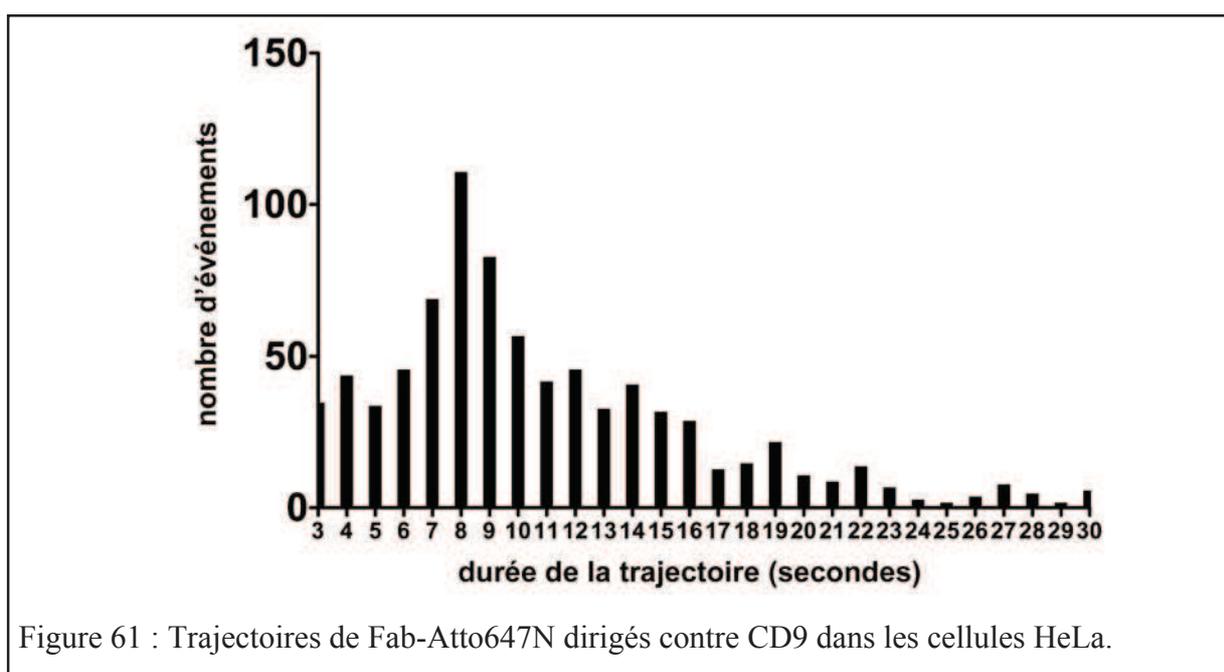


Sonde	Taille	coefficient d'extinction molaire (ϵ) en $M^{-1}cm^{-1}$	rendement quantique (Φ)	Photostabilité	Brillance (u.a)	Stoechiométrie
Alexa 488	< 1 nm	$7,1 \cdot 10^4$	0,60	1 à 5 s	42600	Bonne
Cyanine 5	< 1 nm	$2,5 \cdot 10^5$	0,35	1 à 5 s	90000	Bonne
EGFP	~2-4 nm	$5,5 \cdot 10^4$	0,60	100ms à 1s	33000	Excellente
Quantum dots (605)	~10-25nm	$1 \cdot 10^6$	0,55	> 20min	550000	Moyenne
Atto647N	< 1 nm	$1,5 \cdot 10^5$	0,65	> 10s	97500	Bonne

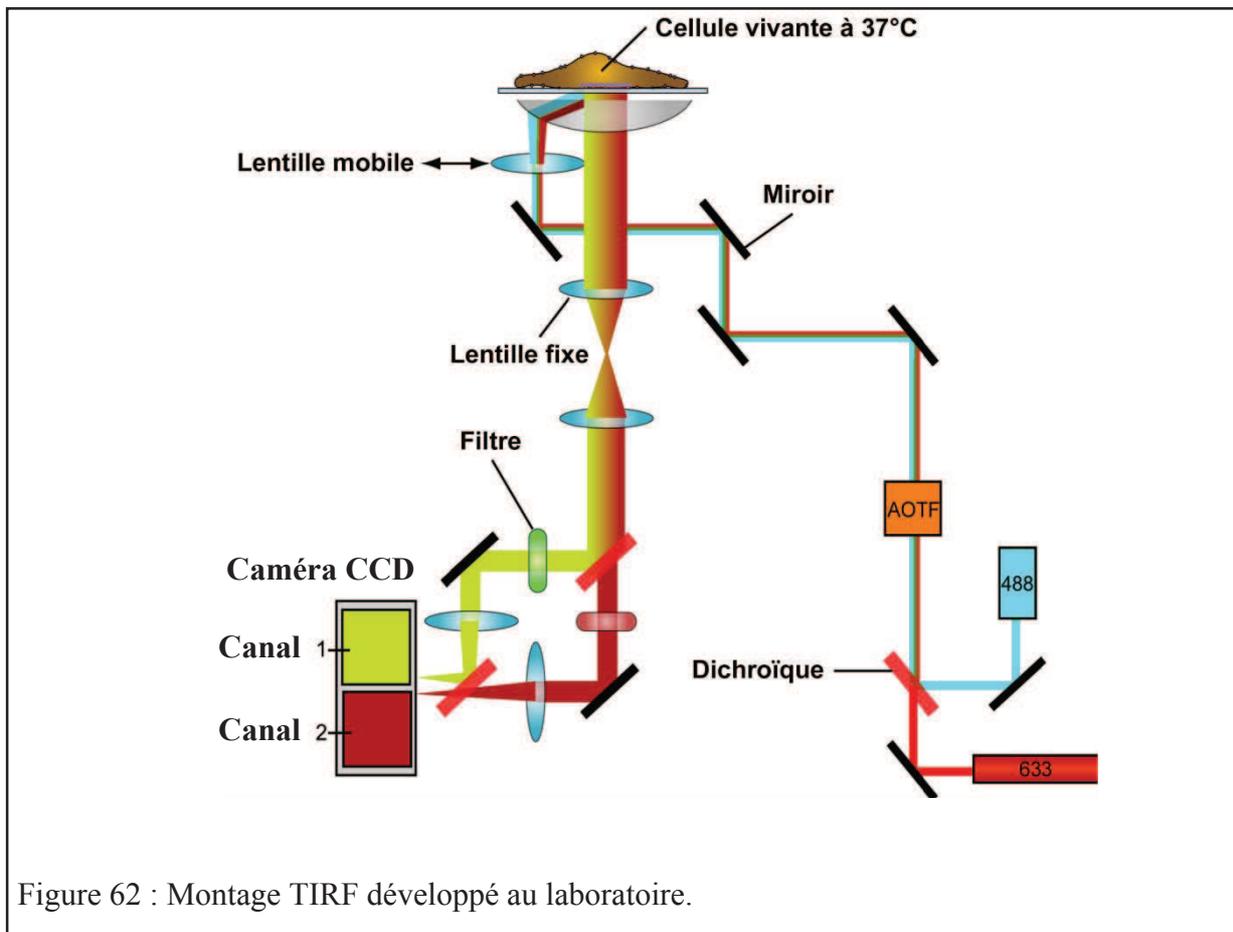
Figure 60 : Tableau récapitulatif des propriétés de différents fluorophores.

A la surface des cellules HeLa, le signal de fluorescence enregistré pour les Fab dirigés contre CD9 et couplés à Atto647N persiste jusqu'à plusieurs dizaines de secondes. En moyenne, les trajectoires exploitables obtenues durent 10 à 11 secondes, avec un maximum aux environs de 8 secondes (figure 61).

Nous avons calculé le ratio signal sur bruit en divisant la moyenne de l'intensité du signal de fluorescence par l'écart type du bruit des images correspondantes⁴²⁷. Dans nos conditions, nous avons observé un ratio signal sur bruit d'environ 5, ce qui permet de suivre relativement facilement les protéines marquées.



Ce bon ratio signal sur bruit est aussi dû à notre montage expérimental de microscopie où l'excitation de l'échantillon est réalisée par réflexion totale interne (TIRFM) à travers un objectif à forte ouverture numérique (NA=1,45). La profondeur du champ évanescent est contrôlable en temps réel grâce à une lentille convergente, dont la position variable sur le trajet optique permet d'ajuster l'angle d'excitation (figure 62). Comme il l'a été décrit dans l'introduction, ce système permet de réduire significativement le bruit de fond en excitant seulement les molécules à la membrane basale des cellules et en s'affranchissant ainsi du bruit provenant du reste de la cellule (figure 63). Par ailleurs, pour enregistrer d'une part le signal de Gag-GFP et d'autre part celui des protéines marquées par les Fab-Atto647N, l'échantillon est excité alternativement avec un laser émettant à 488nm de longueur d'onde et un autre à 633nm. De plus, les signaux d'émission sont décomposés dans l'espace par un miroir dichroïque, puis filtrés et collectés sur deux zones distinctes d'une caméra CCD des 512x512 pixels (système « dual view »). L'utilisation préalable de microsphères fluorescentes émettant dans les deux couleurs et immobilisées sur un support, permet de générer une matrice de transformation pour superposer ensuite les images rouges et vertes.



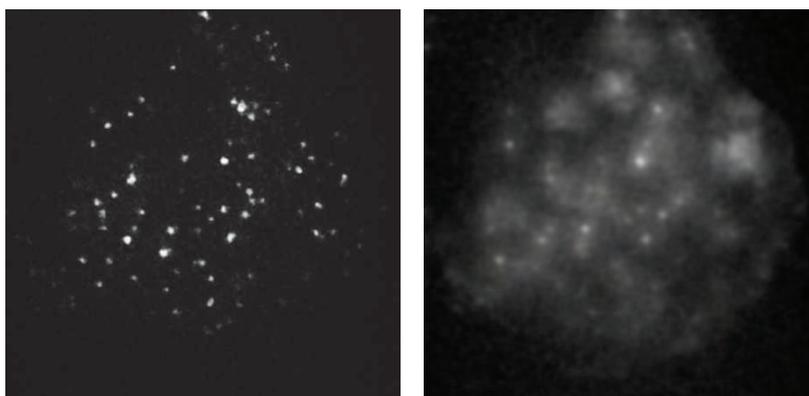


Figure 63 : Comparaison du TIRF (gauche) et de l'épifluorescence (droite) sur CD9 marqué avec des Fab-Atto647N en molécule unique dans les HeLa. Champ: 30 μ m x 30 μ m.

Nous avons ensuite mesuré la dynamique de CD9 avec des temps d'acquisition de 33ms et 100ms (figure 64). Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives de la distribution des coefficients de diffusion dans ces conditions. Cependant, le ratio signal sur bruit à 33ms est plus faible, ce qui implique un échantillonnage plus large. En conséquence, nous avons choisi de mener nos expériences à 100ms.

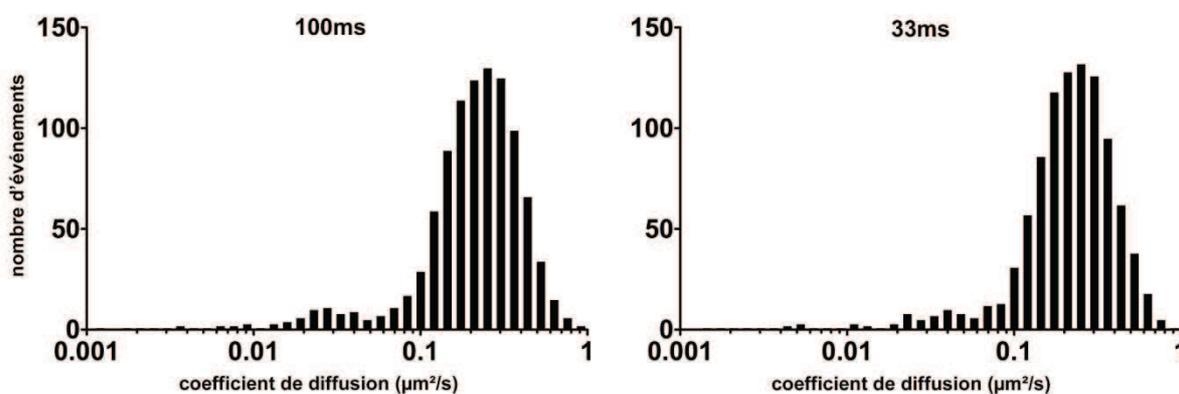


Figure 64 : Distribution des coefficients de diffusion de CD9 en fonction du temps d'acquisition : 100ms à gauche et 33ms à droite.

D'un point de vue pratique, les cellules sont maintenues à 37°C grâce à une platine et un objectif chauffant. Avant et après chaque acquisition en fluorescence, une image en transmission du champs d'observation est réalisée pour ne conserver que les données qui correspondent à des cellules mononuclées, parfaitement adhérentes et dont la forme ou la taille n'a pas été altérée par l'illumination.

La fenêtre d'acquisition de 512x512 pixels est séparée en deux moitiés qui sont chacune attribuées à un canal (rouge ou vert). L'objectif 100X permet de visualiser une zone d'intérêt d'environ 40µm x 80µm dans chaque canal, avec une taille de pixel de 160nm x 160nm. La zone d'excitation du TIRF se limite à environ 40µm x 40µm pour permettre une illumination homogène.

Les films sont réalisés avec 10% à 40% de l'excitation du laser avec 600 images consécutives de 100ms. En effet, au delà de 60 secondes, la plupart des fluorophores sont photodétruits et les cellules commencent à s'arrondir et mourir. Les données sont enregistrées au format fits ou spe avec le logiciel WinView32, avant d'être analysées par Patrack, un programme conçu au laboratoire.

1) 1. 5. Analyse des données

Afin d'évaluer la colocalisation des différentes protéines membranaires étudiées avec Gag, nous avons traité indépendamment les images de marquage d'ensemble pour chaque couleur. Ce filtrage préliminaire permet d'éliminer tous les pixels dont l'intensité est inférieure à 2,5 fois le bruit de fond, afin de limiter les faux positifs lors de la superposition. Ainsi, le pourcentage de colocalisation est défini par le nombre de pixels jaunes sur la somme du nombre pixels jaunes et de pixels verts, quantifiés par le logiciel Colocalizer Pro⁴²⁸.

Le suivi de molécule unique est effectué par le logiciel Patrack, développé par Patrice Dosset au laboratoire. Il permet dans un premier temps de lisser chaque image pour éliminer le bruit de fond, grâce à l'application d'un filtre passe bande. Ensuite, un masque gaussien est automatiquement formé en fonction de l'étalement prédéfini des spots (0,7µm à 0,8µm dans nos conditions), localisant ainsi chacun d'entre eux. Puis leur localisation précise (quelques dizaines de nm) est déterminée en calculant le centre de la fonction gaussienne de chaque spot (figure 65).

L'analyse séquentielle des images permet de relier les points d'une image à ceux de la suivante de façon chronologique. Si aucun point n'est retrouvé dans les 300ms, la trajectoire est arrêtée sans qu'une nouvelle connexion soit possible. De même si deux particules apparaissent simultanément dans l'aire de recherche, le tracé est arrêté afin d'éviter les erreurs d'attribution lors de la construction des trajectoires. Malgré ce système de traitement des erreurs, il est nécessaire d'effectuer une correction manuelle supplémentaire afin d'éliminer les trajectoires qui correspondent à des vésicules juxta membranaire, des fluorophores immobiles sur la lamelle, ou le relai entre une molécule qui a photoblanchie et une autre molécule à proximité.

A partir des coordonnées x et y des points formant chaque trajectoire, le logiciel est capable de tracer la MSD et d'en extraire le coefficient de diffusion apparent par régression linéaire entre les points 1 et 4. De plus, une analyse par un réseau de neurones permet de déterminer pour une fenêtre glissante de 31 points, si la MSD de cette portion correspond plutôt à un mouvement Brownien, confiné, ou dirigé.

Il est ainsi possible d'attribuer un type de trajectoire pour chaque segment de 31 points, ce qui implique de sélectionner des trajectoires assez longues, mais permet de mettre en lumière avec précision et de façon automatique les différents changements de régime pour chaque trajectoire (voir l'annexe correspondante). Enfin, pour des trajectoires ou des portions attribuées comme confinées, nous pouvons déterminer le diamètre de confinement L en appliquant sur la MSD la fonction suivante :

$$\langle r^2 \rangle = \frac{L^2}{3} \left(1 - \exp\left(\frac{-12Dt}{L^2}\right) \right)$$

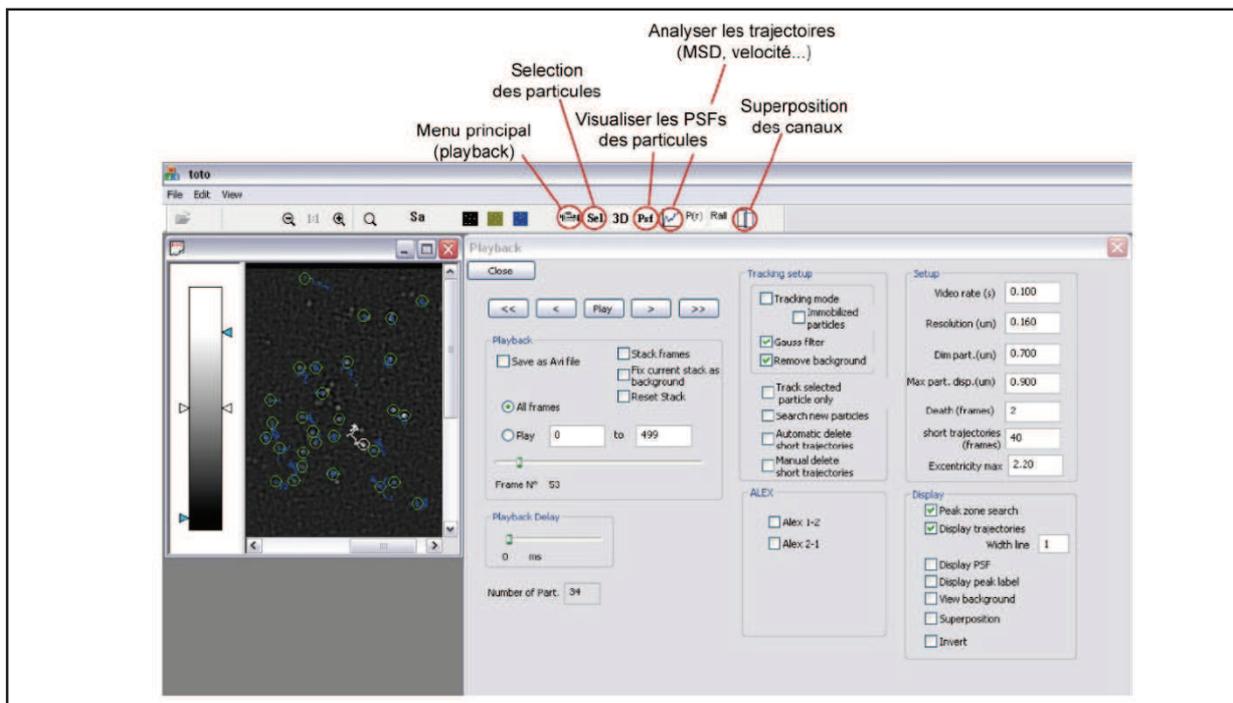


Figure 65 : Interface du logiciel Patrack. Elle permet de travailler avec différentes vitesses d'acquisition (vidéo rate), tailles de pixel (resolution), tailles de particule (dim. part), distances maximale de recherche (max. part. disp.), durées maximales de recherche (death frames), longueurs minimum des trajectoires (short trajectories), asymétries de spot (excentricity max.). Il est aussi possible d'ajouter le filtre gaussien (gauss filter) et d'éliminer le bruit de fond (remove background), de ne suivre qu'une seule particule (track selected trajectory) ou au contraire de suivre les spots qui apparaissent au fur et à mesure que le film se prolonge (seach new particle).

I) 2. Article n°1

HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components⁴²⁹

Dimitry N. Krementsov^{1,2,#}, Patrice Rassam^{3,4,#}, Emmanuel Margeat^{3,4}, Nathan Roy^{1,2}, Jürgen Schneider-Schaulies⁵, Pierre-Emmanuel Milhiet^{3,4,*} and Markus Thali^{1,2,*}

¹Graduate Program in Cell and Molecular Biology, and ²Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Vermont, Burlington, VT 05405 USA.

³Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale, Unité 554, 34090 Montpellier, France, and ⁴Université de Montpellier, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte Recherche 5048, Centre de Biochimie Structurale, 34090 Montpellier, France.

⁵Institute for Virology and Immunobiology, University of Würzburg, Versbacher Str. 7, D-97078 Würzburg, Germany

contributed equally

* corresponding authors

Keywords: virus, assembly, tetraspanin, raft, microdomain, cholesterol, HIV-1, Gag

Summary

Partitioning of membrane proteins into various types of microdomains is crucial for many cellular functions. Tetraspanin-enriched microdomains (TEMs) are a unique type of protein-based microdomain, clearly distinct from membrane rafts, and important for several cellular processes such as fusion, migration, and signaling. Paradoxically, HIV-1 assembly/egress occurs at TEMs, yet the viral particles also incorporate raft lipids.

Using different quantitative microscopy approaches, we investigated the dynamic relationship between TEMs, membrane rafts, and HIV-1 exit sites, focusing mainly on the tetraspanin CD9. Our results demonstrate that clustering of CD9 correlates with multimerization of the major viral structural component, Gag, at the plasma membrane. CD9 exhibited confined behavior and reduced lateral mobility at viral assembly sites, suggesting that Gag locally traps tetraspanins. In contrast, the raft lipid GM1 and the raft-associated protein CD55, while also recruited to assembly/budding sites, were only transiently trapped in these membrane areas. CD9 recruitment and confinement were found to be partially cholesterol-dependent, while those of CD55 were completely dependent on cholesterol. Importantly, our findings support the emerging concept that cellular and viral components, instead of clustering at pre-existing microdomain platforms, direct the formation of distinct domains for the execution of specific functions.

Introduction

Compartmentalization of cellular membranes is important for the coordination of specialized processes such as signaling, adhesion, migration and fusion. Membrane rafts (formerly called lipid rafts), i.e. membrane protein-lipid clusters rich in sphingolipids and cholesterol, have been suggested to achieve such compartmentalization by recruiting specific proteins into plasma membrane (PM) microdomains. Rafts were originally thought to be relatively large (average diameter 100-200nm, e.g. (Pike, 2003)) and stable entities. However, though some current definitions of rafts still give an upper limit of 200 nm (Pike, 2006), recent studies utilizing newly developed methods, such as super-resolution microscopy, have documented that basic raft entities are highly dynamic, transient, and typically less than 50nm in diameter (e.g. (Eggeling et al., 2009; Goswami et al., 2008)). Further, it was proposed that aggregation of such small protein-lipid nanodomains leads to the formation of larger platforms for the organization of various cellular processes (Harding and Hancock, 2008; Jacobson et al., 2007; Kusumi et al., 2004). Also, such lateral segregation is now thought to be driven in large part by protein-protein interactions (e.g. (Douglass and Vale, 2005; Sieber et al., 2007)).

One group of cellular proteins involved in the formation and organization of membrane molecule micro-clusters are the tetraspanins. By virtue of their multiple interactions with partner proteins and due to their strong propensity to multimerize, they are thought to create scaffolds in membranes, recruiting or excluding specific proteins needed for a particular cellular process (Charrin et al., 2009; Hemler, 2005; Yanez-Mo et al., 2009). Studies from our laboratories and others provided a preliminary analysis of TEMs in fixed cells, and showed detectable clusters of tetraspanins present at the PM (Berditchevski and Odintsova, 1999; Nydegger et al., 2006; Unternaehrer et al., 2007). Such platforms have been termed tetraspanin-enriched microdomains/areas (TEMs, TErMs, or TEAs) (Berditchevski and Odintsova, 2007; Espenel et al., 2008; Hemler, 2003). More recently, using single molecule fluorescence microscopy and other analytical microscopy techniques in live cells, we and others confirmed the existence of small tetraspanin-based microdomains/platforms (Barreiro et al., 2008; Espenel et al., 2008).

It was demonstrated that the tetraspanin CD9 could be confined in these platforms but also escaped and freely diffused in the PM. TEMs can therefore be viewed as stable platforms in position and shape but in permanent exchange with the rest of the membrane.

Tetraspanins are co-regulators of many cellular functions including antigen presentation, cell-cell fusion, cell adhesion, cell migration, and signaling (reviewed in (Hemler, 2001; Hemler, 2005; Levy and Shoham, 2005a; Levy and Shoham, 2005b)). They also are co-opted by pathogenic microorganisms such as plasmodium (Silvie et al., 2003), listeria (Tham et al., 2009), and various viruses. For example, both human T-lymphotropic virus-1 (HTLV-1) Gag and human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) Gag accumulate at, and bud through, PM TEMs containing CD9, CD63, CD81, and CD82 (Booth et al., 2006; Jolly and Sattentau, 2007; Mazurov et al., 2006; Nydegger et al., 2006; Turville et al., 2008; Welsch et al., 2007). Notably, recent work from our laboratory and others has documented functional roles of tetraspanins in regulating HIV-1-induced virus-cell and cell-to-cell fusion, budding, and cell-to-cell transmission (Grigorov et al., 2009; Kremontsov et al., 2009; Sato et al., 2008; Weng et al., 2009), although their putative role in viral release is still under debate (Chen et al., 2008; Grigorov et al., 2009; Kremontsov et al., 2009; Ruiz-Mateos et al., 2008). Importantly, how tetraspanin dynamics and their organization relate to specific membrane-based processes, such as viral assembly, remains largely unexplored.

Here, using multiple fluorescence microscopy approaches, we provide the first analysis, in live cells, of the distribution and dynamics of tetraspanins relative to HIV-1 assembly sites. Previous studies hypothesized that Gag assembly may be targeted to pre-existing assembly platforms, either membrane rafts or TEMs (Jolly and Sattentau, 2005; Jolly and Sattentau, 2007; Leung et al., 2008; Nydegger et al., 2006; Ono and Freed, 2001). In contrast, in this study we show that HIV-1 assembly leads to formation of new platforms and immobilization of CD9 at viral exit sites, while the mobility of the raft lipid GM1 and raft-associated protein CD55, which are also recruited to Gag assembly sites, is not locally restricted. Overall, these data are compatible with the concept that protein-protein interactions (here: multimerization of HIV-1 Gag) drive the formation of specific membrane microdomains.

Results

Previous studies clearly established that TEMs serve as exit sites for HIV-1. However, it remained unclear whether these were pre-existing platforms to which Gag assembly was targeted or whether Gag assembly induced the formation of these platforms. To answer this question we analyzed the native distribution and the dynamics of endogenous tetraspanins in live cells and using different imaging approaches.

Colocalization of CD9 and Gag colocalize in live cells

Multiple reports have shown that HIV-1 Gag and Env colocalize with tetraspanins at the PM. However, since all of these studies utilized bivalent antibodies to detect tetraspanins in fixed cells, we set out to determine whether colocalization of Gag and tetraspanins could still be detected in the absence of potential cross-linking or fixation artifacts. If no Gag was expressed, live cells labeled with monovalent Fab fragments exhibited a more diffuse distribution of CD9 compared to cells labeled with bivalent antibodies (Fig. 1A and B), even if the bivalent labeling was carried out after fixation (data not shown). A distribution similar to monovalent labeling was obtained with CD9 fused to green fluorescent protein (GFP) (data not shown). In order to visualize Gag, HeLa cells were transfected with NL4-3 provirus harboring matrix protein (MA) fused to GFP or monomeric red fluorescent protein (mRFP) (Muller et al., 2004), and live cells were labeled with anti-CD9 Fab and secondary Fabs. While much of the CD9 signal remained relatively diffuse in Gag expressing cells, enrichment of CD9 at Gag assembly sites was readily observed (Fig. 1C). Similar results were obtained in infected Jurkat T lymphocytes (data not shown). Overall, these results demonstrate that endogenous CD9 clusters at Gag assembly sites. They also document that bivalent labeling still represents a valid approach to study Gag–tetraspanin association, and this method, because of its convenience, was thus still used in some of the colocalization analyses in this study.

Since Gag assembly appeared to be the driving factor behind CD9 redistribution and clustering, we tested whether multimerization of Gag was required for these phenomena. Cells expressing a multimerization-deficient Gag that can still be targeted to the PM (Dou et al., 2009) were labeled for CD9. In the absence of Gag multimerization, no clustering of CD9 by Gag was observed and the overall distribution of CD9 resembled that in untransfected cells (Fig. 1D).

Kinetics of Gag colocalization with tetraspanins

To investigate the kinetics of Gag-tetraspanin association, HeLa cells expressing HIV-1 GagGFP (which colocalizes with tetraspanins in the absence of other viral components (Nydegger et al., 2006)) were fixed at various time points post-transfection, stained with antibodies against CD9, and assessed for colocalization between these two antigens at the PM. Only cells displaying detectable PM Gag punctae (which are known to represent assembling and budding structures (Gomez and Hope, 2006; Hubner et al., 2007; Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2008; Jouvenet et al., 2006; Larson et al., 2005; Manley et al., 2008)) were included in the analysis. Colocalization of Gag punctae with CD9 increased over time (Fig. 2A). However, because the level of GagGFP expression varied greatly from cell to cell, even at the same time points, we refined our analysis by pooling data from different time points and sorting cells by their total GagGFP intensity (Fig. 2B), which, on a single cell level, is proportional to expression time (Fig. 2C). We found that cells displaying more intense GagGFP signal (and thus those cells that have been expressing Gag for a longer time and/or at a faster rate) exhibited higher colocalization with CD9 (Fig. 2B). Similar results were obtained for surface CD63 (data not shown). Representative images of cells displaying low and high colocalization of Gag with CD9 are shown (Fig. 2, D and E, respectively). Since colocalization was expressed as percentage of Gag⁺ pixels colocalizing with CD9 and not vice versa, it was not biased by the overall amount of Gag signal. Overall, these data strongly suggested that tetraspanin-Gag colocalization increases over time, i.e. as virus assembly proceeds, and that Gag assembly is not targeted to pre-existing TEMs.

HIV-1 Gag influences mobility of CD9 but not of the raft marker GM1

The observation that HIV-1 Gag clusters CD9 over time suggested that Gag induces CD9 trapping at assembly/budding sites. To test this hypothesis, we measured the mobility of CD9 at the population level by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis. FRAP is commonly utilized to study the mobility of membrane proteins and lipids, and can yield important information about membrane compartmentalization (reviewed in e.g. (Chen et al., 2006)). Here, FRAP measurements were used to calculate two parameters, the diffusion coefficient, D , and the mobile fraction, M_f , indicative of the fraction of molecules available for diffusion, for both CD9 and GM1. Vero cells were used in the FRAP experiments, because they express relatively high levels of CD9 (and GM1, see below) allowing for robust fluorescence bleaching and recovery. Further, colocalization between Gag and the former antigens was more apparent in these cells due to low numbers of microvilli on ventral side.

Live cells were labeled with anti-CD9 Fab fragments on ice to visualize surface CD9, then FRAP experiments were carried out at 37°C. Representative FRAP analyses of single cells and average recovery curves (from multiple cells) for CD9 are shown in figure 3. The mean Mf and D values from all FRAP experiments are summarized in Table S1.

In cells not expressing Gag, bleached regions of interest (ROIs) in planar membranes recovered relatively rapidly, though not completely, with an apparent D for CD9 of 0.214 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, and Mf of 76%. FRAP of microvilli-like structures enriched in CD9 yielded a lower (though not significantly, $p>0.05$) apparent D (0.144 $\mu\text{m}^2/\text{s}$) and a similar Mf (77%). However, in Gag-expressing cells, at planar membrane areas containing Gag puncta, CD9 exhibited a considerably lower D (0.137 $\mu\text{m}^2/\text{s}$) and a drastically decreased Mf (29%), indicating that CD9 is trapped at Gag assembly sites. Consistent with this idea, CD9-enriched areas containing Gag puncta within the bleach ROI failed to recover to their initial intensity, whereas areas adjacent to Gag puncta within the same ROIs recovered most of their (diffuse) CD9 signal (see insets in Fig. 3 B and C). The amount of recovery in Gag-containing ROIs decreased with increasing amounts of Gag expression (compare Fig. 3, panels B and C).

Typically, the ventral side of the cell was used for FRAP analysis, because it provided a large, flat, uniform membrane area. However, since previous studies have shown that HIV particles released from ventral side of cells can get trapped between the cell and the coverslip ((Ivanchenko et al., 2009; Jouvenet et al., 2008; Larson et al., 2005)) we also performed FRAP experiments on the dorsal side of cells, to rule out the possibility that the Gag puncta analyzed in our experiment represent detached, budded particles which cannot exchange proteins with the rest of the membrane. As on the ventral side, recovery of CD9 at Gag-containing structures on the dorsal side was also strongly reduced (data not shown).

Membrane rafts have been proposed to serve as platforms for many membrane-based processes, including budding of HIV-1 and other viruses (recently reviewed in (Waheed and Freed, 2009)). The glycosphingolipid GM1 was used as a marker of raft-like domains, since it is a prototypical component of membrane rafts (see e.g. (Dietrich et al., 2001)), and has been reported to colocalize with HIV-1 Gag (Holm et al., 2003; Jolly and Sattentau, 2005; Nguyen and Hildreth, 2000; Ono and Freed, 2005). Since Gag appeared to cluster and colocalize with GM1 (as previously reported) comparably to CD9 (also see Fig. 4B), we also measured mobility of this raft marker (labeled with fluorescently-labeled cholera toxin subunit B (CTxB)) in the presence or absence of Gag. Overall, GM1 exhibited relatively slow diffusion and low recovery, likely due to the clustering and/or internalization induced by pentavalent CTxB, as previously reported (Kenworthy et al., 2004; Pinaud et al., 2009).

Interestingly, neither diffusion nor recovery of GM1 was significantly altered by the presence of Gag assembly sites (Fig. 4 and Table S1). Further, GM1, like CD9, showed apparent accumulation at Gag-rich areas, but unlike CD9, this enrichment could be recovered after photobleaching (see insets in Fig. 4B). Together, these results imply that while both GM1 and CD9 are recruited to Gag assembly sites, CD9 becomes trapped but GM1 remains free to diffuse. Importantly, the fact that GM1 is still in exchange with the rest of the PM also demonstrates that a majority of the Gag puncta analyzed in our experiments represent viral assembly sites that are still connected to the PM, as opposed to being released particles.

HIV-1 Gag differentially influences CD9 and CD55 dynamics and membrane partitioning at the single molecule level

To corroborate and expand upon the population level mobility measurements obtained by FRAP, single molecule fluorescence experiments were performed to analyze the behavior of single CD9 molecules. Single molecules were tracked using Atto647-labeled Fab fragments with a high temporal (100 ms) and spatial (~ 50 nm) resolution, as in our previous work (Espenel et al., 2008). As observed in PC3 cells, CD9 molecules exhibited 3 main types of diffusion in control GFP-expressing HeLa cells, namely Brownian (48 %), confined (14 %) and mixed (38 %), a combination of Brownian and confined behavior (Fig. 5, Table S2) for the distribution of diffusion coefficient and detailed values). In the absence of Gag expression, the mean value of CD9 apparent diffusion coefficient (ADC) was $0.24 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$, which is comparable to that previously obtained in PC3 cells and in concurrence with the D obtained in the FRAP measurements in this study. Upon expression of Gag, the percentage of CD9 molecules exhibiting confined motion increased significantly (from 14 to 34% of the total number of trajectories) at the expense of Brownian trajectories (from 48 to 27%) (Fig. 5 and Table S2). The amplitude of this increase was comparable to that of the mobile fraction measured in our FRAP experiments. Reflecting the increase in CD9 confinement, the mean ADC decreased to $0.16 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Comparable results were obtained with SMT analysis of CD81, another tetraspanin recruited to Gag assembly sites, where expression of Gag induced trapping of CD81 (data not shown). Note that, while the confined fraction observed by single molecule analysis was not quite as large as that observed by FRAP, the SMT analysis included the entire cell, which contained large areas of membrane not containing Gag, whereas the FRAP analyses focused on an ROI containing large amounts of Gag.

To determine the generality of membrane protein trapping by Gag assembly, we also investigated the membrane behavior of CD46, a non-raft transmembrane protein which is not confined by TEMs (Espenel et al., 2008). The mean ADC of this protein ($0.16 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$) as well as the percentage of the different diffusion modes were in the same range than those previously observed in PC3 cells (Fig. 5 and Table S1).

However, compared to CD9, CD46 membrane behavior was mostly unaffected by Gag expression, with only a slight but non-significant increase of the number of confined trajectories (from 11 to 13 % of the total number of trajectories) as well as slight decrease of the mean ADC value (from 0.16 to $0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$). These results demonstrate that trapping of CD9 at Gag assembly sites is a specific process.

Since Gag assembly also appeared to recruit raft-like domains and in order to parallel the FRAP experiments with GM1, we investigated the behavior of CD55, a putative raft-associated protein (Charrin et al, 2002). CD55 ADC was slightly but significantly reduced in the presence of Gag ($p < 0.01$ using the Mann-Whitney test, Fig. 5), as was the proportion of Brownian trajectories (from 43% to 36%, $p < 0.01$), while the percentage of confined and mixed trajectories was increased (respectively from 16% to 19% and 41% to 45%) but not significantly (Fig. 5, upper panel). Taken together, these results show that CD9 and CD55 distribution of ADC were both modified upon Gag assembling but with a large difference in magnitude.

To confirm these findings, we analyzed the subpopulations of CD9, CD46, and CD55 trajectories that coincided with Gag-enriched areas (Fig. 5, lower panel). 16% of total CD9 trajectories colocalized with Gag (see Materials and Methods for details). As expected from the increase in confinement described above, the majority of these trajectories displayed a confined behavior (68%) (note that confinement areas not co-localized with Gag were often observed, presumably the same areas that were seen in the cells not expressing Gag). Interestingly, CD55 trajectories were less often associated with Gag (11%) as compared to CD9. More importantly, membrane behavior of CD55 in Gag areas was also different, with most of the trajectories (71%) exhibiting mixed diffusion which corresponds to a transient confinement. As expected, CD46 trajectories that colocalized with Gag-enriched regions exhibited similar membrane behavior to that obtained with GFP-expressing control cells (upper panel of Fig. 5). Altogether, these data show that, while CD9 and CD55 are specifically recruited into assembly sites, tetraspanins interact with Gag in a very different manner compared to raft components.

Differential dependence on cholesterol for enrichment and confinement of CD55 and CD9 at HIV-1 assembly sites

Since raft components and tetraspanins were clustered to HIV-1 Gag assembly sites, we tested whether cholesterol, a key structural component of membrane rafts and TEMs, was required for this clustering. Cells expressing HIV-1 GagGFP were briefly treated with cholesterol oxidase (COase) to decrease membrane cholesterol content, labeled with Fabs to visualize CD9, CD46, or CD55 (ensemble labeling conditions), and processed for colocalization analysis (Fig. 6). In agreement with our results on trajectories that overlapped with Gag-enriched areas (Fig. 5, lower panel), this colocalization analysis indicated that CD9 is associated with these areas (57%) as was CD55, although to a lesser degree (36%). Interestingly, when cells were treated with COase, the fraction of Gag that colocalized with CD9 partially decreased (from 57% to 38%). However, the overlap of Gag and CD55 was almost completely abolished (from 36% to 9%). In contrast, CD46 showed little colocalization Gag-enriched areas (6%) and this association was not significantly affected by COase treatment (from 6% to 5%). These results suggest that the recruitment of CD9 to assembly sites only partially depends on cholesterol, while this lipid is fully required for CD55 association with Gag-enriched areas.

The effect of COase treatment was then investigated at the single molecule level (Fig. 7). When membrane cholesterol content was decreased, the mobility of CD9, CD55 and CD46, as measured by their Brownian diffusion coefficient in the absence of Gag was slightly decreased, as previously observed with methyl- β -cyclodextrin treatment (Espenel et al, 2008). This decrease was attributed to a general effect on membrane dynamics upon cholesterol depletion. While the effect of Gag expression, namely the increase of confined CD9 trajectories at the expense of Brownian trajectories, was reduced by cholesterol depletion (Fig. 7 and Table S2), the expression of Gag still clearly increased the percentage of confined trajectories under these conditions. Meanwhile, the increase in CD55 confinement by Gag was almost completely abolished by cholesterol depletion. The behavior of CD46 was not affected by cholesterol depletion, since no effect of Gag expression was observed in the first place. Taken together, these data suggest that CD9 confinement at Gag assembly sites is partially cholesterol dependent, whereas the transient recruitment of CD55 in these areas is completely dependent on cholesterol.

Discussion

While several studies have documented the presence of raft-like domains and TEMs at HIV-1 budding sites, the dynamics and the underlying mechanisms of their relationships have not been explored. In this study, we have employed different microscopy techniques to analyze the interactions between raft lipids and proteins (tetraspanins), and HIV-1 assembly sites. Our results indicate that HIV-1 assembly creates specialized microdomains, recruiting components of both rafts and TEMs. They also support the idea that protein composition (here Gag) can determine the specificity of microdomains (see e.g. (Douglass and Vale, 2005; Gomez-Mouton et al., 2001; Roper et al., 2000), etc).

Using monovalent antibody labeling of CD9, we were able to visualize the native distribution of endogenous CD9 in the PM of live cells. While the distribution of CD9 appeared more diffuse than when detected with bivalent antibodies, some punctate structures were detectable, although their number and size varied considerably depending on the cell type, presence or absence and of extracellular matrix, or imaging conditions (epifluorescence vs. TIRF). Importantly though, assembly of HIV-1 Gag at the PM clearly clustered CD9, whether detected by bivalent or monovalent methods, and this clustering depended on multimerization of Gag. Further, colocalization between Gag and tetraspanins gradually increased during Gag expression and assembly, suggesting that Gag assembly is not targeted to large pre-existing tetraspanin platforms.

Since CD9 was locally enriched at Gag assembly sites, we hypothesized that Gag restricts the mobility of this protein. FRAP experiments indicated that CD9 is indeed locally trapped at Gag assembly sites, while raft lipid GM1 is still in exchange with the rest of the membrane, despite the fact that it is enriched at sites of assembly. It is likely that Gag assembly creates a local membrane microenvironment which can accommodate a higher concentration of raft lipids and proteins, without trapping them. The FRAP results were corroborated by SMT analyses, which also showed confinement of single CD9 molecules at Gag-rich areas

Cholesterol depletion by COase treatment only partially reduced Gag-CD9 colocalization, but almost completely abolished colocalization between Gag and raft-associated protein CD55. Interestingly, the mobility of CD55 was also restricted by Gag, though to a lesser degree, and this confinement was completely reversed by cholesterol depletion, while confinement of CD9 was only partially dependent on cholesterol. Mobility of CD46, a non-raft membrane protein, which sometimes can be found associated with CD9 and other tetraspanins (Lozahic et al., 2000), was not significantly influenced by the presence of Gag.

While CD46, like tetraspanins, has been shown to be incorporated into HIV-1 particles (Montefiori et al., 1994; Sullivan et al., 1996), the fact that this protein shows little trapping at Gag assembly sites suggests that it is incorporated into retroviral particles non-specifically, comparable to many other PM components (Hammarstedt et al., 2000).

Trapping of CD9 but not of raft components raises questions about the mechanisms that are involved in the lateral segregation of these proteins. Although CD81 and CD82 have been shown to interact (directly or indirectly) with HIV-1 Gag (Grigorov et al., 2009) and with HTLV-I Gag (Mazurov et al., 2007), it was also shown that this latter interaction does not take place in the absence of Gag multimerization (Mazurov et al., 2006). If this is the case, it is not likely that direct and specific interactions between individual Gag and tetraspanin molecules, followed by multimerization of Gag, drive the clustering of tetraspanins at retroviral assembly sites. In an alternative scenario, the recruitment and coalescence of cholesterol-rich domains by Gag (see below), indirectly recruits tetraspanins because of their interactions with cholesterol (Charrin et al., 2003b; Delaguillaumie et al., 2004), thus providing the nucleation trigger, which is followed by tetraspanin retention due to tetraspanin homo- and heteromultimerization. This hypothesis can explain why CD9 molecules may be drastically confined, whereas CD55 molecules are only transiently trapped by Gag assemblies, probably reflecting their weaker interaction with these clusters. The coalescence of cholesterol-enriched domains is also in agreement with the observation that cholesterol is partially required for CD9-Gag colocalization and necessary for CD55-Gag overlap.

Altogether, our results suggest that components of both raft-like domains and TEMs are actively enriched or stabilized at sites of Gag assembly. Such regulation is inconsistent with the still prevalent notion that lipid- or protein-based membrane microdomains constitute stable, preformed platforms to which viral or cellular components are targeted (e.g. (Briggs et al., 2003; Leung et al., 2008; Pickl et al., 2001)), but instead supports the idea that specific (smaller) rafts and TEMs are clustered during HIV-1 budding (as expressed e.g. in (Brugger et al., 2006)). Further, the gradual increase in Gag-TEM association over time (as demonstrated in this report, see Fig. 2), also argues against targeting of Gag to preassembled TEMs, a scenario that we previously favored (Nydegger et al., 2006). Instead, our current results suggest that large membrane domains enriched in TEM and raft components form only upon Gag expression, probably through the clustering of many smaller preformed nanodomains of different composition and behavior.

This is analogous to how attachment of leukocytes to endothelial cells causes the coalescence of preformed tetraspanin-based nanoscale adhesion platforms into larger stable docking structures, where tetraspanins and their partners exhibit reduced mobility, but glycosylphosphatidylinositol-anchored GFP, a commonly used raft marker, diffuses freely (Barreiro et al., 2008).

The exquisite membrane compartmentalization by Gag described in this report, suggests that HIV-1 (and likely many other enveloped viruses) have evolved to regulate both the lipid and protein composition of their assembly sites and subsequently released virions. Proper composition of egress sites probably helps viruses to achieve maximal fitness, e.g. by appropriately targeting viral budding, by maintaining virion stability, and by enhancing virion infectivity. Consistent with this idea, our previous results suggest that the optimal levels of tetraspanins (in virus-producing cells or in virions) likely ensure efficient virus spread (Krementsov et al., 2009; Weng et al., 2009). Overall, our study presents the first dynamic view of the relationship between TEMs, rafts, and HIV-1 assembly sites, providing new information about how this human pathogen re-organizes the PM at the microdomain level.

Materials and Methods

Cells, plasmids, and transfections:

HeLa cells were maintained in DMEM with 10% FBS. Jurkat T cells were maintained in RPMI with 10% FBS. HeLa and Jurkat cells stably expressing CD9-EGFP were selected and maintained using 0.8 mg/ml or 0.5 mg/ml G418 (Invitrogen) respectively.

The CD9-EGFP (in pEGFP-N1 vector, containing a mutation preventing the dimerization of EGFP) plasmid kindly provided by M. Hemler (DFCI, Boston, USA) (Kovalenko et al., 2004). The NL4-3(MA-EGFP) and NL4-3(MA-mRFP) proviruses were kindly provided by B. Müller (University of Heidelberg, Germany) (Muller et al., 2004). The codon-optimized GagGFP fusion construct has been previously described (Nydegger et al., 2003). Venus-fused monomeric Gag construct was kindly provided by P. Spearman.

Transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. For stable transfections, cells were transfected and passaged continuously for approximately 2 weeks in the presence of G418, until mock transfected cells had died. Clones were then isolated using cloning cylinders (HeLa) or the limiting dilution method (Jurkat).

Epifluorescence Microscopy:

HeLa cells were grown on glass-bottom dishes (Mattek, USA). Cells were either labeled on ice or after fixation, as indicated in figure legends. Fixation was done in 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 10 minutes, unless otherwise indicated. The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-CD9 K41 (BACHEM), mouse monoclonal anti-CD63, H5C6 (Developmental Studies Hybridoma Bank); anti-Gag p6 rabbit serum, kind gift of D. Ott (NCI, Frederick). Secondary antibodies were AlexaFluor488, 594, or 647-conjugated and directed against the appropriate species (Invitrogen).

Anti-CD9 Fab fragments were prepared using the ImmunoPure Fab Preparation Kit (Pierce), and their purity was tested by SDS-PAGE. When monovalent labeling was performed, FITC- or DyLight(488, 594 or 649)-conjugated anti-mouse Fab secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used. Single molecule tracking was performed with Atto647N-conjugated SYB-1 Fab as previously described (Espenel et al., 2008).

For GM1 labeling, cells were incubated on ice using AlexaFluor488-conjugated cholera toxin subunit B (CTxB) (Invitrogen) for 30- 60 minutes, fixed, and incubated with anti-CTxB rabbit antibody (Invitrogen) to enhance clustering. For TfnR labeling, cells were incubated with transferrin conjugated to AlexaFluor594 (Invitrogen) for 30 min on ice, then fixed.

Image acquisition and deconvolution were performed using either a DeltaVision deconvolution microscopy station (Applied Precision, Inc), as previously described (Nydegger et al., 2006), or a Nikon Eclipse Ti-E equipped with a Nikon 60x PlanApo 1.4 NA objective, Qimaging EXi Blue camera, image software NIS Elements 3.10, and AutoQuant 2.1.0 (deconvolution). For live imaging, cells were labeled on ice, then imaged at 37°C and 5% CO₂ in a custom-built WeatherStation climate chamber (Applied Precision, Inc).

Colocalization analysis and image processing:

Colocalization analysis was carried out using Volocity software essentially as described (Nydegger et al., 2006) or CoLocalizer Pro software. Briefly, deconvolved images representing a single bottom optical z-section of a single cell were converted to tiffs and imported into Volocity software v3.7 (Improvision). The classifier module set to 2 or 3 standard deviations above the mean pixel intensity was used to detect and define the bright puncta for each channel, while excluding the dimmer fluorescent signals. The total number of pixels overlapping between two different channels was divided by the total number of pixels for a chosen channel (as indicated in the figures), yielding percent colocalization. Colocalization values from at least 10 cells were averaged to give mean percent colocalization.

Average pixel intensity measurements were obtained from corresponding images, using the classifier module. In triple colocalization analysis of GM1, Gag, and CD63 each channel was assessed for colocalization with another channel independently, as above. To calculate the percentage of Gag-associated CD63 colocalizing with GM1, the number of pixels overlapping between all 3 channels was divided by the number of pixels that overlapped between Gag and CD63.

Final image assembly, cropping and resolution adjustments for figures, including magnification of boxed regions in Fig. 1, was done using Adobe Photoshop.

FRAP analysis:

Vero cells were plated on Mattek dishes coated with fibronectin (to minimize detachment of cells during photobleaching) and transfected with the GagGFP expression vector. 16-24 hours post-transfection cells were labeled on ice with anti-CD9 Fab and DyLight649-labeled secondary Fab (Jackson Immunoresearch), or with CTxB conjugated to Alexa647 (Invitrogen). All FRAP experiments were performed on a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope at the Microscopy Imaging Facility at the University of Vermont. Cells were maintained at 37°C with a stage heater. Each dish was imaged for 20-40 minutes. A 100X PlanApochromat 1.4 NA oil immersion objective was used. GFP was excited with the Argon 488 laser line (3-15% transmission), while Alexa647 and Dylight649 were excited with the 633 nm He-Ne line (5-20% transmission), and emission was split and collected simultaneously for both channels. Single color experiments were performed to ensure no cross-talk between the two channels. Photobleaching was performed using the 633 nm laser line at full laser power for 200 iterations on a circular region of interest (ROI) approximately 3.5 μm in radius. Subsequent recovery images were collected using low laser power at 5 second intervals for approximately 2-3 minutes, until ROI recovery had reached a plateau. Only a single Z-section was bleached and imaged, typically the ventral side of the cell contacting the cover slip.

For FRAP calculations, the mean intensity over time of the bleach ROI, as well as a background ROI (containing no cells), and an unbleached ROI in the cell of interest were determined using the Zeiss LSM analysis software and exported into Microsoft Excel. The bleach ROI data were converted to fractional recovery (Snapp et al., 2003), normalized by the overall fluorescence loss in the cell, as measured by the unbleached ROI. This data was imported into GraphPad Prism and fitted using non-linear regression (an exponential decay algorithm, $Y = \text{Span} * \exp(-K * X) + \text{Plateau}$, with the half time to recovery, $t_{1/2} = 0.69/K$). The span and plateau were used to calculate M_f . D was calculated using a simple two dimensional diffusion model for a circular bleach ROI: $D = 0.224 * (\text{radius}^2 / t_{1/2})$ (Axelrod et al., 1976; Soumpasis, 1983). This analysis was performed for each individual cell and the D and M_f values were averaged to get mean D and M_f . To yield average recovery curves, mean fractional recovery over time was averaged between multiple cells.

SMT experiments and analysis:

SMT experiments were carried out as previously described (Espenel et al., 2008). Briefly, cells expressing GFP or GagGFP were incubated in DMEM at 37°C for 10min with Atto647N-labeled Fab fragments of the anti-CD9 mAb, SYB-1, and the mouse monoclonal anti-CD46, 11C5 (Charrin et al., 2003a). For COase treatment, cells were incubated for 30 min with 1 UI/ml of the enzyme before labeling. A home-made objective-type TIRF setup allowing multicolor single molecule imaging and equipped with a Plan Fluor 100X/1,45 NA objective (Zeiss, Le Peck, France Brattleboro, VT) was used. All the experiments were done with a 100ms integration time. For some experiments, to achieve a better specificity in the detection of the two fluorescent signals, alternating-laser excitation (ALEX) was performed using an acousto-optical tunable filter and controller (AOTF; AA Optoelectronics, Les Chevreuses, France) (Margeat et al., 2006).

All the movies were analyzed using a home-made software (named “PaTrack”) implemented in visual C++. Trajectories were constructed using the individual diffraction limited signal of each molecule. The center of each fluorescence peak was determined with sub-pixel resolution by fitting a two-dimensional elliptical Gaussian function.

The two-dimensional trajectories of single molecules were constructed frame per frame. Only trajectories containing at least 40 points were retained. Diffusion coefficient values were determined from a linear fit to the MSD- τ plots between the first and the fourth points (D1-4) according to the equation $MSD(t) = 4Dt$.

The determination of the motional modes (Brownian, confined or directed) and parameters was performed according to (Kusumi et al., 1993). For each trajectory we first linearly fitted the MSD on the 10% first points in order to use sufficiently populated curves. If the MSD- τ plot shows positive or negative deviation from a straight line with a slope of $4D$ (Brownian diffusion), the MSD is respectively adjusted with a quadratic curve ($4Dt + v^2t^2$) (directed diffusion) or with an exponential curve (confined diffusion where L is the side of a square domain, the confinement diameter being related to L by $d_{conf} = (2/\sqrt{\pi})L$). For the mixed trajectory exhibiting a combination of Brownian and apparent confined motion mode, the trajectory was split and the MSD of each segment was adjusted with a linear or an exponential curve as described above.

Acknowledgements

We are grateful to Martin Hemler, Paul Spearman, Barbara Müller and Hans-Georg Kraeusslich for providing plasmids, Eric Rubinstein for providing SYB-1,11C5 and 12A12 monoclonal antibodies and to Linnea Olofson for her technical help. Members of the Thali lab and Alan Howe are acknowledged for critical reading of the manuscript. Chris Huston is acknowledged for the use of this The Nikon Eclipse Ti-E instrument, which was purchased with funds from NIAID ARRA supplement R01 A1072021-0251.

This work was supported by NIH grants R56 AI047727 and R01 AI 080302 to M.T., ANR #06-BLAN-0378 to P.E.M., as well as a Vermont Genetics Network Graduate Fellowship and T32 AI055402 Training Grant to D.K. P.R. is a recipient from the French Ministry for Research and Technology.

References

- Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal* **16**, 1055-69.
- Barreiro, O., Zamai, M., Yanez-Mo, M., Tejera, E., Lopez-Romero, P., Monk, P. N., Gratton, E., Caiola, V. R. and Sanchez-Madrid, F. (2008). Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J Cell Biol* **183**, 527-42.
- Berdichevski, F. and Odintsova, E. (1999). Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol* **146**, 477-92.
- Berdichevski, F. and Odintsova, E. (2007). Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* **8**, 89-96.
- Booth, A. M., Fang, Y., Fallon, J. K., Yang, J. M., Hildreth, J. E. and Gould, S. J. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* **172**, 923-35.
- Briggs, J. A., Wilk, T. and Fuller, S. D. (2003). Do lipid rafts mediate virus assembly and pseudotyping? *J Gen Virol* **84**, 757-68.
- Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T. and Krausslich, H. G. (2006). The HIV lipidome: A raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Charrin, S., Le Naour, F., Labas, V., Billard, M., Le Caer, J.-P., Emile, J.-F., Petit, M.-A., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2003a). EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *The Biochemical journal* **373**, 409-21.
- Charrin, S., le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P. E., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochemical Journal* **420**, 133-54.
- Charrin, S., Manie, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2003b). A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *European journal of immunology* **33**, 2479-89.
- Chen, H., Dziuba, N., Friedrich, B., von Lindern, J., Murray, J. L., Rojo, D. R., Hodge, T. W., O'Brien, W. A. and Ferguson, M. R. (2008). A critical role for CD63 in HIV replication and infection of macrophages and cell lines. *Virology* **379**, 191-6.
- Chen, Y., Lagerholm, B. C., Yang, B. and Jacobson, K. (2006). Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* **39**, 147-53.
- Delaguillaumie, A., Harriague, J., Kohanna, S., Bismuth, G., Rubinstein, E., Seigneuret, M. and Conjeaud, H. (2004). Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J Cell Sci* **117**, 5269-82.
- Dietrich, C., Volovyk, Z. N., Levi, M., Thompson, N. L. and Jacobson, K. (2001). Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10642-7.
- Dou, J., Wang, J. J., Chen, X., Li, H., Ding, L. and Spearman, P. (2009). Characterization of a myristoylated, monomeric HIV Gag protein. *Virology* **387**, 341-52.
- Douglass, A. D. and Vale, R. D. (2005). Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* **121**, 937-50.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V. N., Hein, B., von Middendorff, C., Schonle, A. et al. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 1159-62.
- Espenel, C., Margeat, E., Dosset, P., Arduise, C., Le Grimellec, C., Royer, C. A., Boucheix, C., Rubinstein, E. and Milhiet, P. E. (2008). Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J Cell Biol* **182**, 765-76.
- Gomez-Mouton, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jimenez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Manes, S. and Martinez, A. C. (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9642-7.
- Gomez, C. Y. and Hope, T. J. (2006). Mobility of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag in living cells. *J Virol* **80**, 8796-806.
- Goswami, D., Gowrishankar, K., Bilgrami, S., Ghosh, S., Raghupathy, R., Chadda, R., Vishwakarma, R., Rao, M. and Mayor, S. (2008). Nanoclusters of GPI-anchored proteins are formed by cortical actin-driven activity. *Cell* **135**, 1085-97.
- Grigorov, B., Attuil-Audenis, V., Perugi, F., Nedelec, M., Watson, S., Pique, C., Darlix, J. L., Conjeaud, H. and Muriaux, D. (2009).

A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* **6**, 28.

Hammarstedt, M., Wallengren, K., Pedersen, K. W., Roos, N. and Garoff, H. (2000). Minimal exclusion of plasma membrane proteins during retroviral envelope formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7527-32.

Harding, A. S. and Hancock, J. F. (2008). Using plasma membrane nanoclusters to build better signaling circuits. *Trends Cell Biol* **18**, 364-71.

Hemler, M. E. (2001). Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* **155**, 1103-7.

Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 397-422.

Hemler, M. E. (2005). Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 801-11.

Holm, K., Weclawicz, K., Hewson, R. and Suomalainen, M. (2003). Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J Virol* **77**, 4805-17.

Hubner, W., Chen, P., Del Portillo, A., Liu, Y., Gordon, R. E. and Chen, B. K. (2007). Sequence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag localization and oligomerization monitored with live confocal imaging of a replication-competent, fluorescently tagged HIV-1. *J Virol* **81**, 12596-607.

Ivanchenko, S., Godinez, W. J., Lampe, M., Krausslich, H. G., Eils, R., Rohr, K., Brauchle, C., Muller, B. and Lamb, D. C. (2009). Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog* **5**, e1000652.

Jacobson, K., Mouritsen, O. G. and Anderson, R. G. (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* **9**, 7-14.

Jolly, C. and Sattentau, Q. J. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J Virol* **79**, 12088-94.

Jolly, C. and Sattentau, Q. J. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol* **81**, 7873-84.

Jouvenet, N., Bieniasz, P. D. and Simon, S. M. (2008). Imaging the biogenesis of individual HIV-1 virions in live cells. *Nature* **454**, 236-40.

Jouvenet, N., Neil, S. J., Bess, C., Johnson, M. C., Virgen, C. A., Simon, S. M. and Bieniasz, P. D. (2006). Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol* **4**, e435.

Kenworthy, A. K., Nichols, B. J., Remmert, C. L., Hendrix, G. M., Kumar, M., Zimmerberg, J. and Lippincott-Schwartz, J. (2004). Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol* **165**, 735-46.

Kovalenko, O. V., Yang, X., Kolesnikova, T. V. and Hemler, M. E. (2004). Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem J* **377**, 407-17.

Krementsov, D. N., Weng, J., Lambele, M., Roy, N. H. and Thali, M. (2009). Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology* **6**, 64.

Kusumi, A., Koyama-Honda, I. and Suzuki, K. (2004). Molecular dynamics and interactions for creation of stimulation-induced stabilized rafts from small unstable steady-state rafts. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **5**, 213-30.

Kusumi, A., Sako, Y. and Yamamoto, M. (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophysical Journal* **65**, 2021-40.

Larson, D. R., Johnson, M. C., Webb, W. W. and Vogt, V. M. (2005). Visualization of retrovirus budding with correlated light and electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15453-8.

Leung, K., Kim, J.-O., Ganesh, L., Kabat, J., Schwartz, O. and Nabel, G. J. (2008). HIV-1 assembly: viral glycoproteins segregate quantitatively to lipid rafts that associate individually with HIV-1 capsids and virions. *Cell host & microbe* **3**, 285-92.

Levy, S. and Shoham, T. (2005a). Protein-protein interactions in the tetraspanin web. *Physiology (Bethesda)* **20**, 218-24.

Levy, S. and Shoham, T. (2005b). The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* **5**, 136-48.

Lozahic, S., Christiansen, D., Manie, S., Gerlier, D., Billard, M., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2000). CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *European journal of immunology* **30**, 900-7.

- Manley, S., Gillette, J. M., Patterson, G. H., Shroff, H., Hess, H. F., Betzig, E. and Lippincott-Schwartz, J.** (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods* **5**, 155-7.
- Margeat, E., Kapanidis, A. N., Tinnfeld, P., Wang, Y., Mukhopadhyay, J., Ebricht, R. H. and Weiss, S.** (2006). Direct observation of abortive initiation and promoter escape within single immobilized transcription complexes. *Biophysical Journal* **90**, 1419-31.
- Mazurov, D., Heidecker, G. and Derse, D.** (2006). HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* **346**, 194-204.
- Mazurov, D., Heidecker, G. and Derse, D.** (2007). The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag protein. *J Biol Chem* **282**, 3896-903.
- Montefiori, D. C., Cornell, R. J., Zhou, J. Y., Zhou, J. T., Hirsch, V. M. and Johnson, P. R.** (1994). Complement control proteins, CD46, CD55, and CD59, as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection. *Virology* **205**, 82-92.
- Muller, B., Daecke, J., Fackler, O. T., Dittmar, M. T., Zentgraf, H. and Krausslich, H. G.** (2004). Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *J Virol* **78**, 10803-13.
- Nguyen, D. H. and Hildreth, J. E.** (2000). Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**, 3264-72.
- Nydegger, S., Foti, M., Derdowski, A., Spearman, P. and Thali, M.** (2003). HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**, 902-10.
- Nydegger, S., Khurana, S., Kremontsov, D. N., Foti, M. and Thali, M.** (2006). Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol* **173**, 795-807.
- Ono, A. and Freed, E. O.** (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13925-30.
- Ono, A. and Freed, E. O.** (2005). Role of lipid rafts in virus replication. *Adv Virus Res* **64**, 311-58.
- Pickl, W. F., Pimentel-Muinos, F. X. and Seed, B.** (2001). Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol* **75**, 7175-83.
- Pike, L. J.** (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of lipid research* **44**, 655-67.
- Pike, L. J.** (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* **47**, 1597-8.
- Pinaud, F., Michalet, X., Iyer, G., Margeat, E., Moore, H.-P. and Weiss, S.** (2009). Dynamic partitioning of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-rich microdomains imaged by single-quantum dot tracking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **10**, 691-712.
- Roper, K., Corbeil, D. and Huttner, W. B.** (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* **2**, 582-92.
- Ruiz-Mateos, E., Pelchen-Matthews, A., Deneka, M. and Marsh, M.** (2008). CD63 is not required for production of infectious human immunodeficiency virus type 1 in human macrophages. *Journal of virology* **82**, 4751-61.
- Sato, K., Aoki, J., Misawa, N., Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y. and Koyanagi, Y.** (2008). Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* **82**, 1021-33.
- Sieber, J. J., Willig, K. I., Kutzner, C., Gerding-Reimers, C., Harke, B., Donnert, G., Rammner, B., Eggeling, C., Hell, S. W., Grubmuller, H. et al.** (2007). Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science* **317**, 1072-6.
- Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J. F., Prenant, M., Belnoue, E., Renia, L., Hannoun, L., Eling, W., Levy, S., Boucheix, C. et al.** (2003). Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nature Medicine* **9**, 93-6.
- Snapp, E. L., Altan, N. and Lippincott-Schwartz, J.** (2003). Measuring protein mobility by photobleaching GFP chimeras in living cells. *Current Protocols in Cell Biology [Electronic Resource]* **Chapter 21**, Unit 21 1.
- Soumpasis, D. M.** (1983). Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal* **41**, 95-7.
- Sullivan, B. L., Knopoff, E. J., Saifuddin, M., Takefman, D. M., Saarloos, M. N., Sha, B. E. and Spear, G. T.** (1996). Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* **157**, 1791-8.
- Tham, T. N., Gouin, E., Rubinstein, E., Boucheix, C., Cossart, P. and Pizarro-Cerda, J.** (2009). The Tetraspanin Cd81 Is Required for Listeria Monocytogenes Invasion. *Infect Immun* **9**, 9.

Turville, S. G., Aravantinou, M., Stosel, H., Romani, N. and Robbiani, M. (2008). Resolution of de novo HIV production and trafficking in immature dendritic cells. *Nat Methods* **5**, 75-85.

Unternaehrer, J. J., Chow, A., Pypaert, M., Inaba, K. and Mellman, I. (2007). The tetraspanin CD9 mediates lateral association of MHC class II molecules on the dendritic cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 234-9.

Waheed, A. A. and Freed, E. O. (2009). Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus Res.*

Welsch, S., Keppler, O. T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J. and Krausslich, H. G. (2007). HIV-1 Buds Predominantly at the Plasma Membrane of Primary Human Macrophages. *PLoS Pathog* **3**, e36.

Weng, J., Kremontsov, D. N., Khurana, S., Roy, N. H. and Thali, M. (2009). Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in HIV-1 producing cells. *J Virol* **83**, 7467-74.

Yanez-Mo, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdes, M. and Sanchez-Madrid, F. (2009). Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends in Cell Biology* **19**, 434-46.

Figures and legends

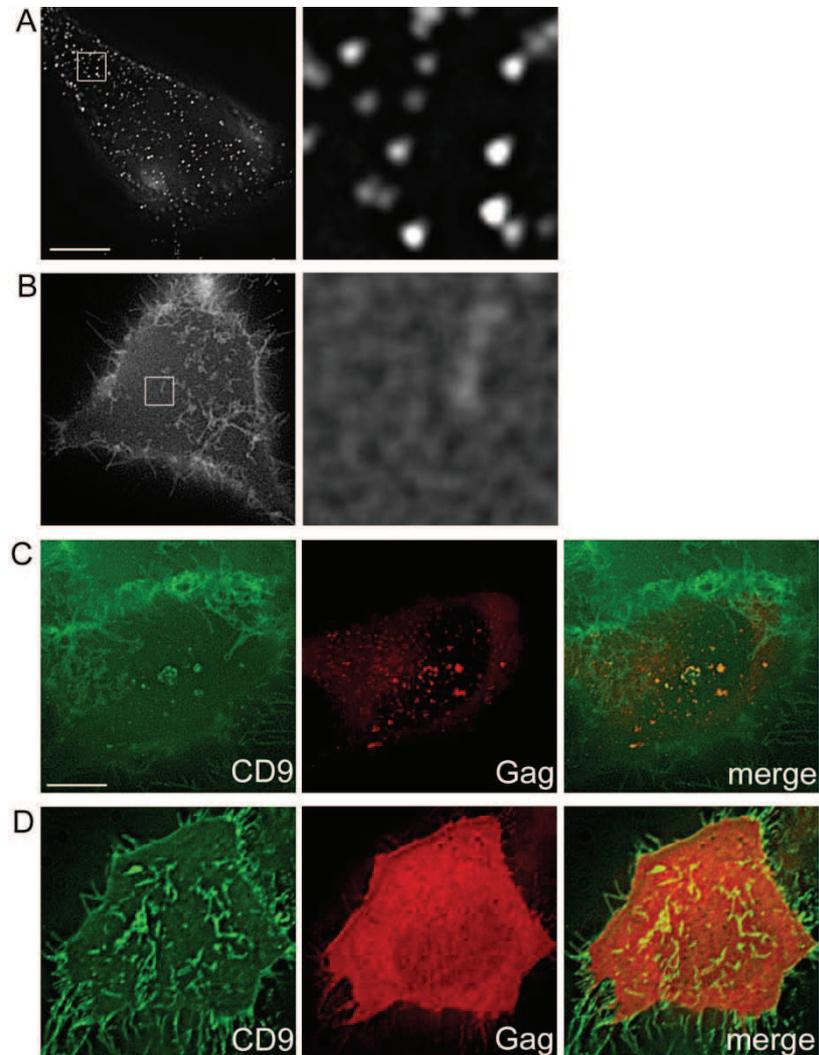


Figure 1. Clustering of PM CD9 by Gag in live cells.

Live HeLa cells were labeled on ice using full-length anti-CD9 antibody and full-length secondary (A) or Fab anti-CD9 and Fab secondary (B) then imaged at 37°C. (C) HeLa expressing NL4-3(MA-mRFP) were labeled with Fab anti-CD9 and Fab secondary on ice, then imaged at 37°C. (D) HeLa cells expressing Venus-fused monomeric Gag were labeled and imaged as in (C). Bottom optical Z-sections (i.e. cell-coverslip contact) are shown. Images in (A and B) second column represent a 10X magnification of the boxed region. Scale bar represents 10 μm.

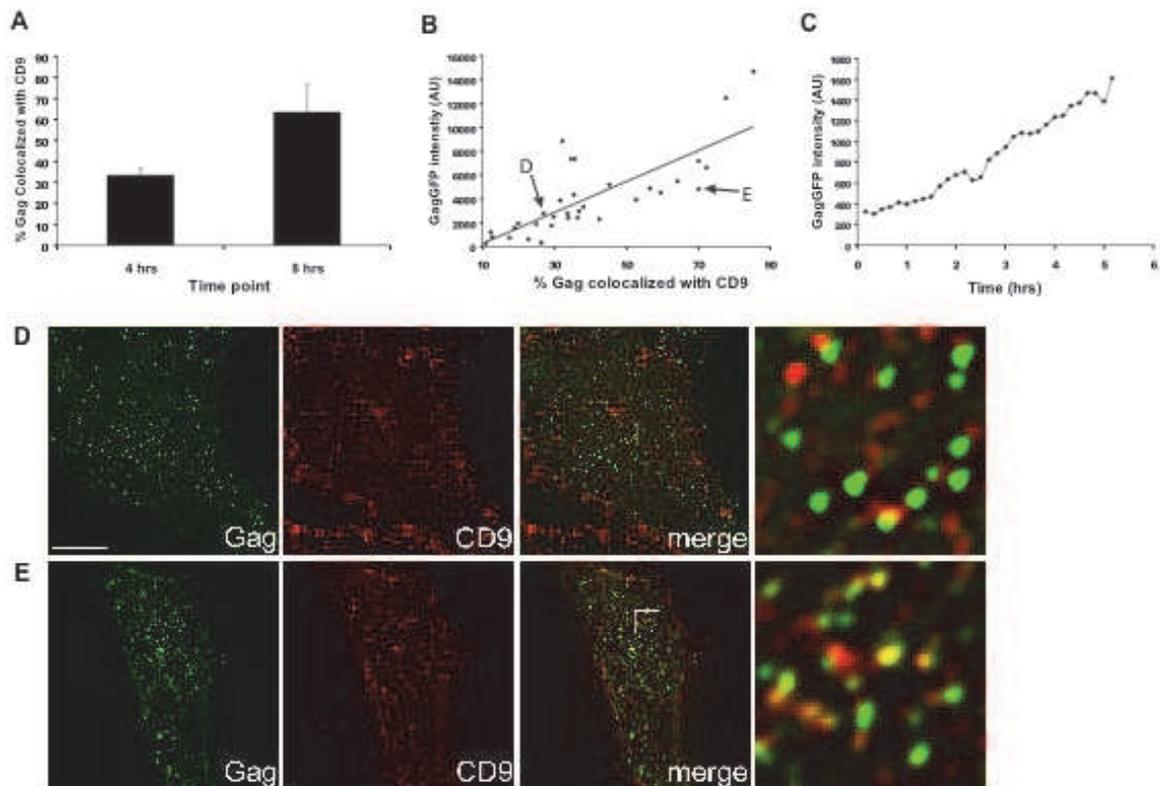


Figure 2. Gag-CD9 colocalization is increased at later time points and at higher Gag expression levels.

HeLa cells transfected with GagGFP were fixed at 4 or 8 hours post-transfection, then surface-labeled for CD9 and processed for colocalization analysis. (A) Average colocalization of Gag and CD9 at 4 versus 8 hours post-transfection (data represent the mean of 10 or more cells, error bars represent SEM) (see Materials and Methods). (B) Colocalization data for individual cells from 4, 8, and 16 hour time points were pooled and plotted as a function of mean Gag intensity. Each point represents a single cell – the cells displayed in D and E are indicated with arrows. A best fit line obtained using linear regression is displayed. (C) HeLa cells expressing GagGFP were imaged continuously for 5 hours at 37°C, one frame/10 minutes. The mean GFP intensity of a representative cell is displayed. Representative bottom sections of cells included for the analysis in (A), exhibiting low (26%, GFP intensity = 2755) and high (70%, GFP intensity = 4823) colocalization, are shown in (D) and (E), respectively. Gag intensity was scaled differently between (D) and (E), in order to enhance visualization of the weaker signals in (D). Images in right hand column represent 9.5X magnifications of the boxed area. Scale bar represents 10 μ m. AU – arbitrary units.

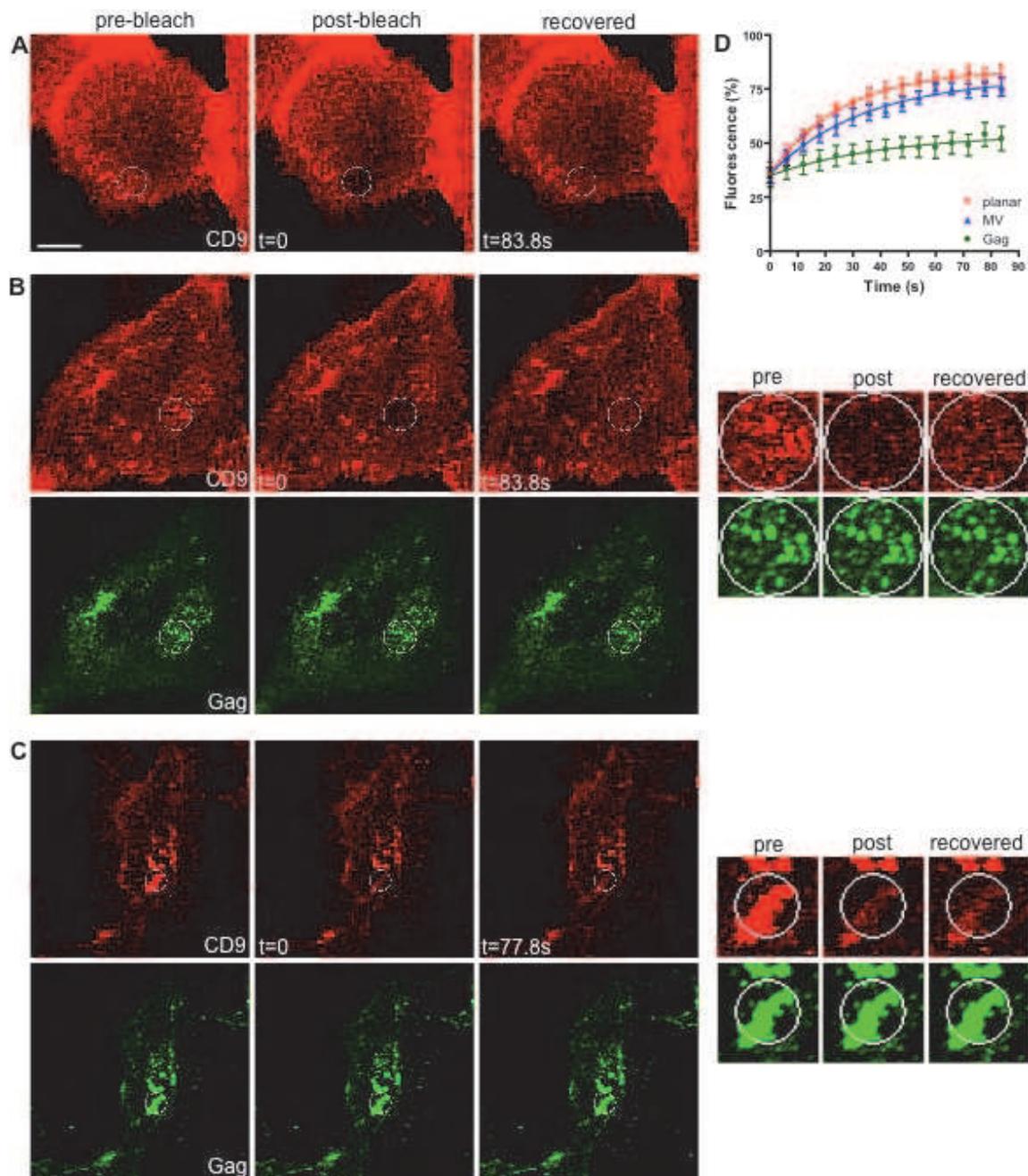


Figure 3. Gag expression alters the mobility of CD9.

Representative FRAP analyses of untransfected Vero cells (A) or Vero cells expressing GagGFP (B) and (C) and labeled for surface CD9 with Fab primary and secondary. The cell shown in (C) expresses a higher amount of Gag than the cell in (B). The bleach ROIs are indicated with a circle. Images in right column in (B) and (C) represent a 3X magnification of a region surrounding the bleach ROI. Scale bar represents 10 μm . (D) Average recovery curves for CD9 in the absence of Gag (at planar membranes, red, and at microvilli (MV), blue) or in the presence of Gag (green). Values indicate mean fractional fluorescence \pm S.E.M.

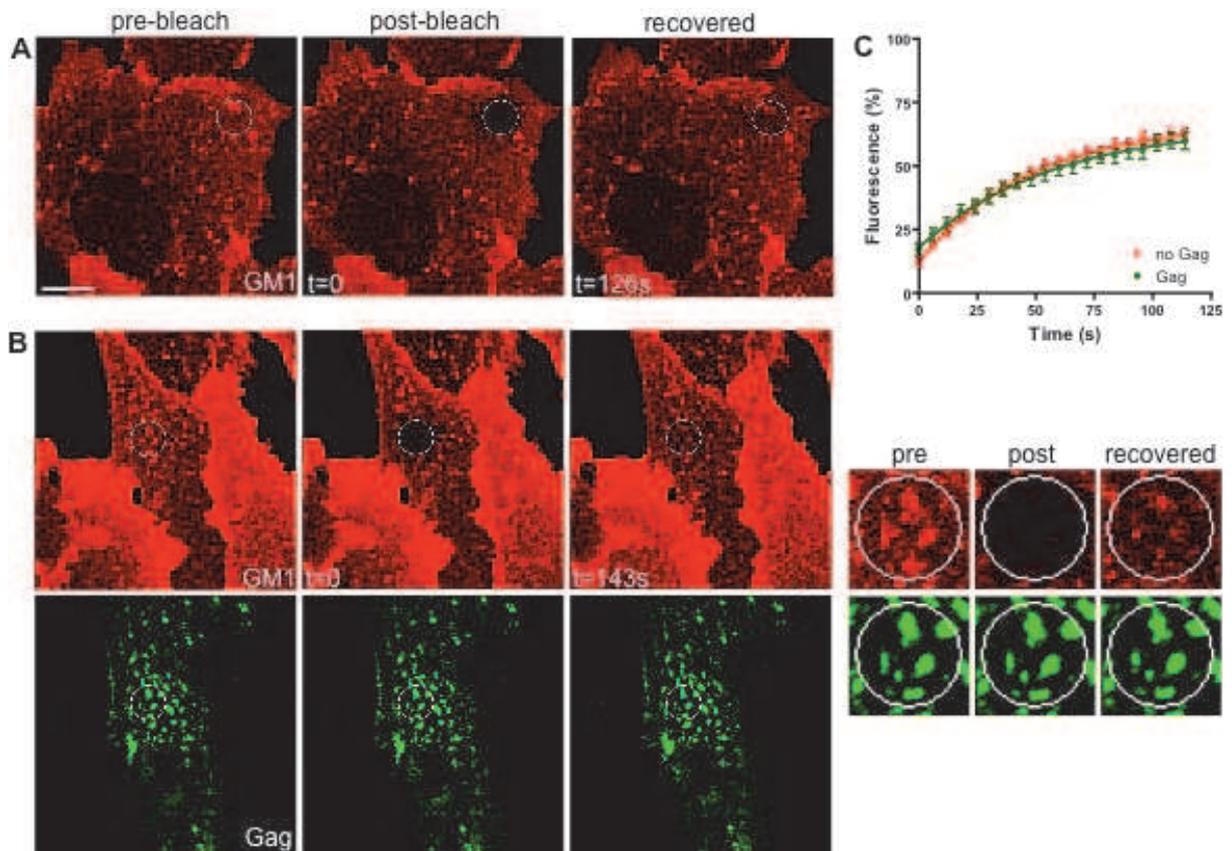


Figure 4. Mobility of GM1 is not altered by Gag.

Representative FRAP analyses of untransfected Vero cells (A) or Vero cells expressing GagGFP (B) and labeled for surface GM1 with CTxB-Alexa647. The bleach ROIs are indicated with a circle. Images in right column in (B) represent a 3X magnification of a region surrounding the bleach ROI. Scale bar represents 10 μ m. (C) Average recovery curves for GM1 in the absence (red), or in the presence of Gag (green). Values indicate mean fractional fluorescence \pm S.E.M.

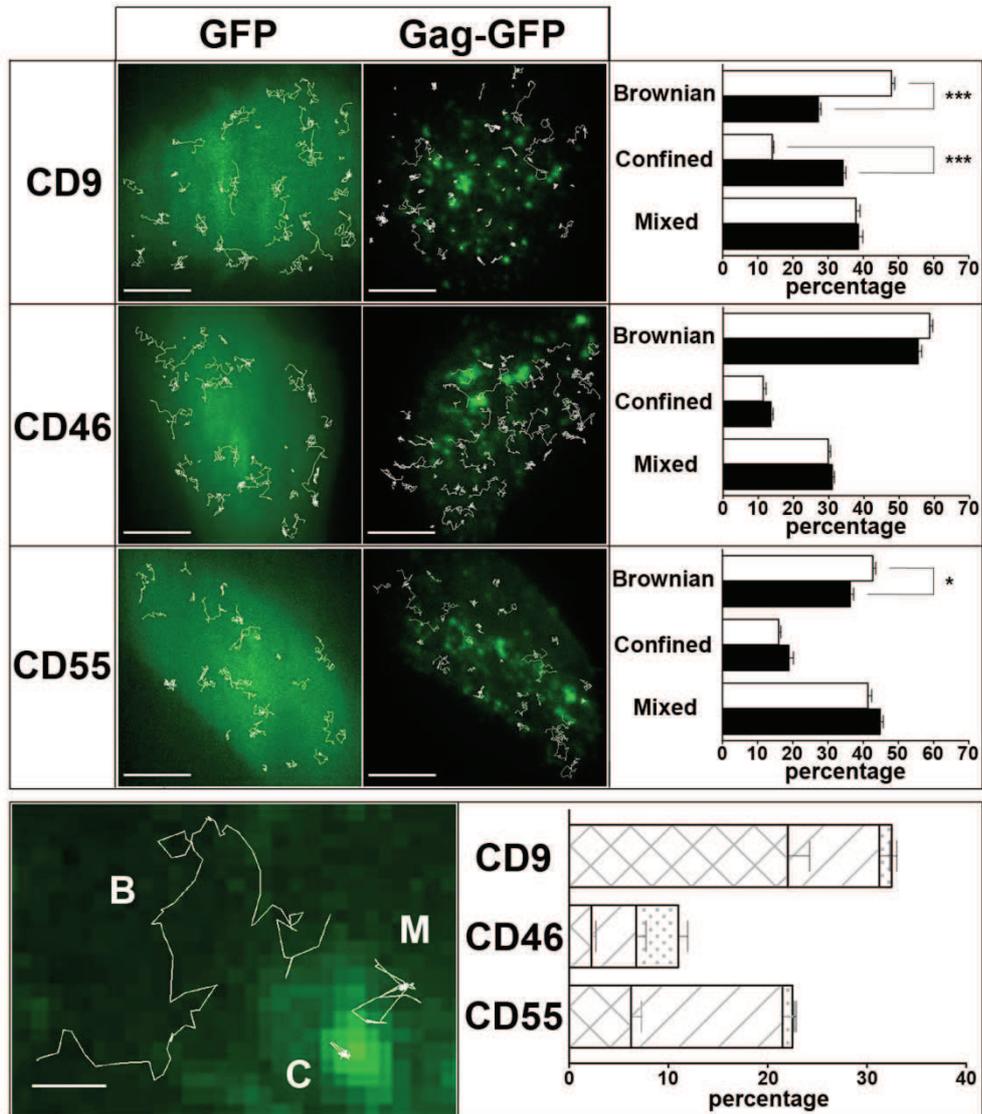


Figure 5. Single molecule analysis of CD9, CD55 and CD46 behavior in the presence or absence of Gag.

Upper panel: Micrographs on the left shows superimposition of GFP and GagGFP fluorescence signal with several representative single molecule trajectories (white lines) obtained after tracking Atto647N-conjugated Fab fragments of anti-CD9, anti-CD46, or anti CD55 antibodies in HeLa cells. Histograms on the right represent the percentage of each diffusion mode (Brownian, Mixed, and Confined) relative to the total number of trajectories for CD9, CD46, or CD55 for cells transfected with GFP (white bars) or with GagGFP (black bars). Error bars correspond to S.E.M.

*, **, and, *** respectively indicate a p values below 0.01, 0.001 and 0.0001 for comparison of the diffusion modes percentage in GagGFP-expressing cells versus GFP-expressing control cells for CD9, CD46, and CD55, as determined by the Mann-Whitney U test.

Lower panel: The micrograph on the left shows CD9 representative trajectories with Brownian (B), Mixed (M), or confined (C) behavior (white lines) superimposed with the GagGFP fluorescence ensemble labeling. Histograms on the right represent the percentage of trajectories that co-localized with Gag-enriched areas (see Materials and Methods) as well as the proportion of the different diffusion modes displayed at these Gag-enriched areas: confined (crosshatched bars), mixed (hatched bars) and Brownian (dotted bars).

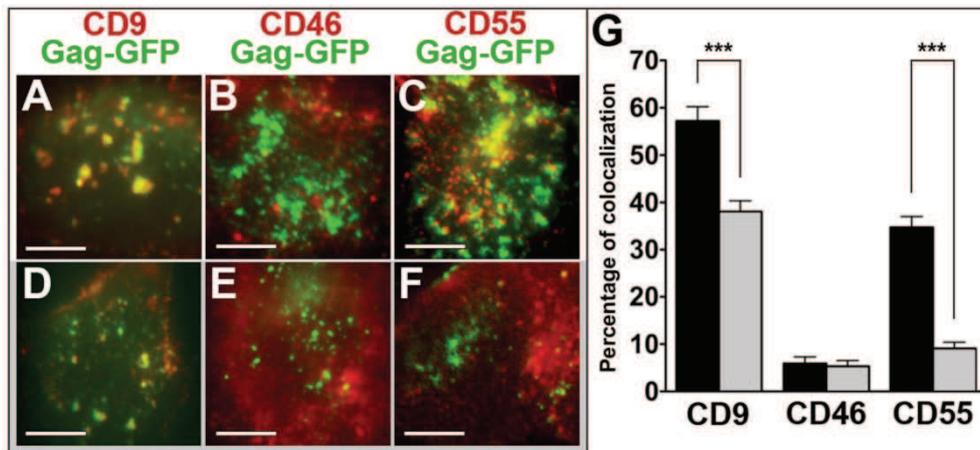


Figure 6. Influence of cholesterol on Gag-induced clustering of membrane components.

Co-localization fluorescence experiments between CD9, CD46 or CD55 (in red) with Gag-enriched areas (in green) in Gag-expressing HeLa cells treated (D, E, F) or not (A, B, C) with COase. Histograms (G) represent the percentage of colocalization between CD9, CD46 or CD55 with Gag-enriched areas (defined as the number of yellow pixels over the total number of yellow and green pixels) in HeLa cells treated (grey bars) or not (black bars) with COase. *** indicate a p values below 0.0001 for comparison of the percentage of colocalization in GagGFP-expressing cells treated with COase versus GagGFP-expressing control cells for CD9, CD46 and CD55, as determined by the Mann-Whitney U test.

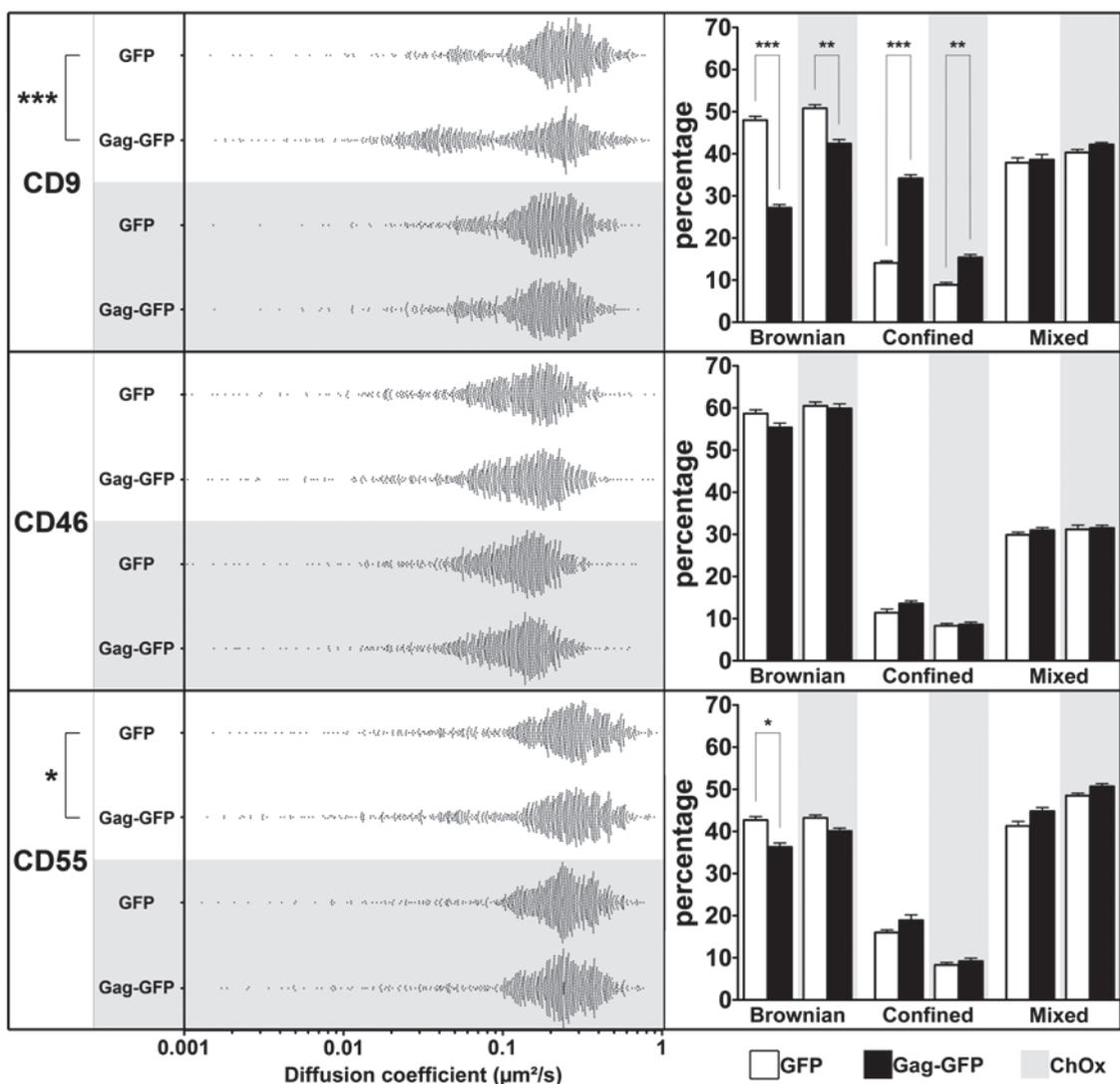


Figure 7. Influence of cholesterol on Gag-induced trapping of CD9, CD46, and CD55 at the single molecule level.

The left panels represent the distribution of all the apparent diffusion coefficients calculated from the MSD plot between the points 1 to 4 for CD9, CD46 and CD55. Each point represents one trajectory in GFP or GagGFP expressing cells. *, ** and *** respectively indicate a p values below 0.01, 0.001 and 0.0001 for comparison of the diffusion modes percentage in GagGFP-expressing cells versus GFP-expressing control cells for CD9, CD46 and CD55, as determined by the Mann-Whitney U test. The black arrowheads highlight the increase of the confined trajectories. The histograms on the right represent the percentage of each diffusion mode (Brownian, Mixed, and Confined) relative to the total number of trajectories for CD9, CD46, or CD55 for cells transfected with GFP (white bars) or with GagGFP (black bars), treated or not with COase (grey areas).

Table S1 – Summary of mobility measurements by FRAP.

condition	D ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	p	Mf (%)	p	n
CD9, no Gag, planar	0.213 \pm 0.04		76 \pm 5.0		7
CD9, no Gag, microvilli	0.144 \pm 0.03	0.17 *	77 \pm 5.2	0.86 *	9
CD9, + Gag, planar	0.137 \pm 0.01	0.03 *	30 \pm 4.0	2x10 ⁻⁶ *	12
GM1, no Gag	0.082 \pm 0.01		65 \pm 2.7		19
GM1, + Gag	0.077 \pm 0.01	0.62 #	62 \pm 3.6	0.47 #	16

Values for D and Mf represent the mean \pm SEM of the indicated number of cells (n), pooled from 3 independent experiments. p represents the p value for comparison versus the indicated condition, determined by a two-tailed homoscedastic student's t-test.

* vs. CD9, no Gag, planar.

vs. GM1, no Gag.

Table S2. Apparent diffusion coefficients and diffusion modes of CD9, CD46 and CD55

	ADC All	ADC B	ADC C	ADC M	% B	% C	% M
CD9 GFP	0.24 \pm 0.03	0.30 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01	0.22 \pm 0.02	48.0 \pm 0.9	14.1 \pm 0.5	37.9 \pm 1.1
CD9 Gag-GFP	0.17 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03	0.06 \pm 0.01	0.20 \pm 0.03	27.2 \pm 0.8	34.2 \pm 0.8	38.6 \pm 1.3
CD9 GFP COase	0.19 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	50.8 \pm 0.8	8.9 \pm 0.6	40.3 \pm 0.8
CD9 Gag-GFP COase	0.18 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	42.4 \pm 1.0	15.4 \pm 0.7	42.2 \pm 0.5
CD46 GFP	0.15 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	58.7 \pm 0.9	11.4 \pm 0.8	29.9 \pm 0.6
CD46 Gag-GFP	0.15 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	55.4 \pm 1.0	13.6 \pm 0.6	31.0 \pm 0.6
CD46 GFP COase	0.13 \pm 0.02	0.17 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	60.5 \pm 0.9	8.3 \pm 0.5	31.2 \pm 1.0
CD46 Gag-GFP COase	0.13 \pm 0.02	0.16 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	59.9 \pm 1.1	8.6 \pm 0.6	31.5 \pm 0.7
CD55 GFP	0.26 \pm 0.03	0.38 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.22 \pm 0.02	42.7 \pm 0.8	16.0 \pm 0.6	41.3 \pm 1.1
CD55 Gag-GFP	0.25 \pm 0.03	0.38 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.25 \pm 0.02	36.3 \pm 1.0	18.9 \pm 1.3	44.8 \pm 0.9
CD55 GFP COase	0.25 \pm 0.03	0.32 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	43.2 \pm 0.7	8.3 \pm 0.6	48.5 \pm 0.6
CD55 Gag-GFP COase	0.24 \pm 0.03	0.32 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	40.1 \pm 0.7	9.2 \pm 0.7	50.7 \pm 0.7

Apparent Diffusion Coefficient (ADC) ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) distribution and mean value \pm S.E.M. for CD9, CD46 and CD55 molecules at 100-ms acquisition time in HeLa cells transfected with GFP or GagGFP. B, Brownian; C, confined; M, mixed. The grey areas correspond to COase-treated cells.

I) 3. Résultats complémentaires

Les résultats présentés dans cet article sont focalisés sur la tétraspanine CD9, mais nous avons aussi étudié en parallèle l'influence de l'assemblage de pseudo particules du VIH sur la dynamique et la répartition membranaire de CD81.

Tout comme CD9 et CD55 (dans une moindre mesure), CD81 est colocalisé significativement avec les zones d'assemblage de Gag dans les cellules vivantes. Lors du traitement à la cholestérol oxydase, cette agrégation est partiellement inhibée pour les tétraspanines CD9 et CD81 et totalement abolie pour CD55, ce qui met en évidence l'influence relative du cholestérol dans ce phénomène (figure 66).

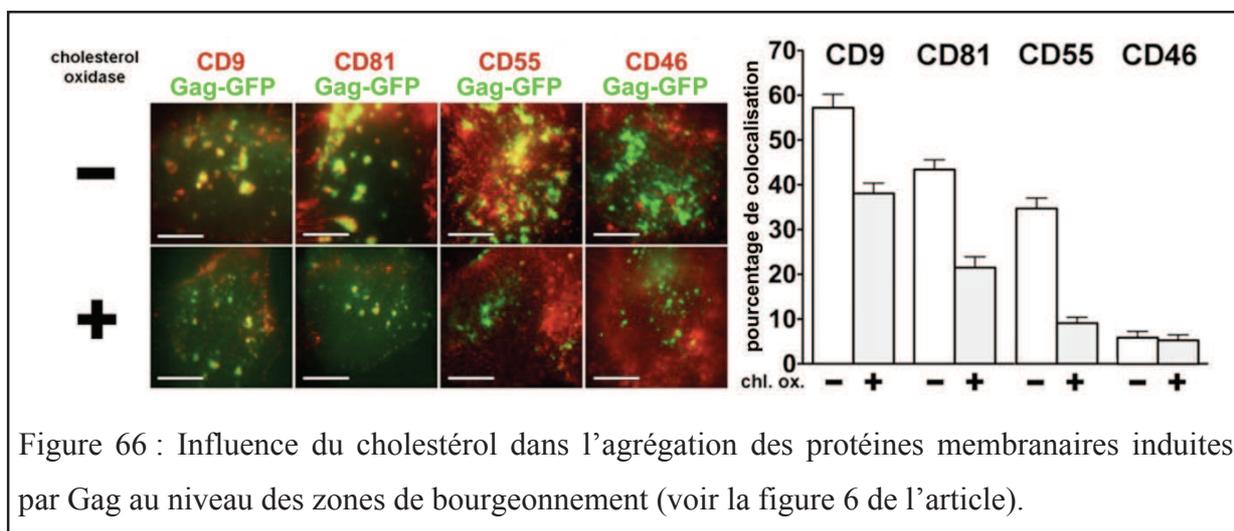


Figure 66 : Influence du cholestérol dans l'agrégation des protéines membranaires induites par Gag au niveau des zones de bourgeonnement (voir la figure 6 de l'article).

L'expression de Gag réduit de façon significative la dynamique de CD9, de CD55 (dans une proportion plus faible), mais aussi de CD81, avec une augmentation apparente du nombre de mouvements lents (figure 67).

Or ce ralentissement n'est plus observé lors du traitement à la cholestérol oxydase, ce qui illustre encore l'influence du cholestérol dans ce phénomène (figure 68).

De façon intéressante, cette baisse de mobilité observée pour CD9, CD81 (dans une moindre mesure) n'est pas due à une baisse du coefficient de diffusion moyen des trajectoires Browniennes confinées ou encore mixtes, mais à l'augmentation du nombre de confinements aux dépens de mouvements libres. Par contre, pour CD55, le pourcentage de confinement baisse à la fois au profit des mouvements Browniens et des mouvements mixtes (figure 69).

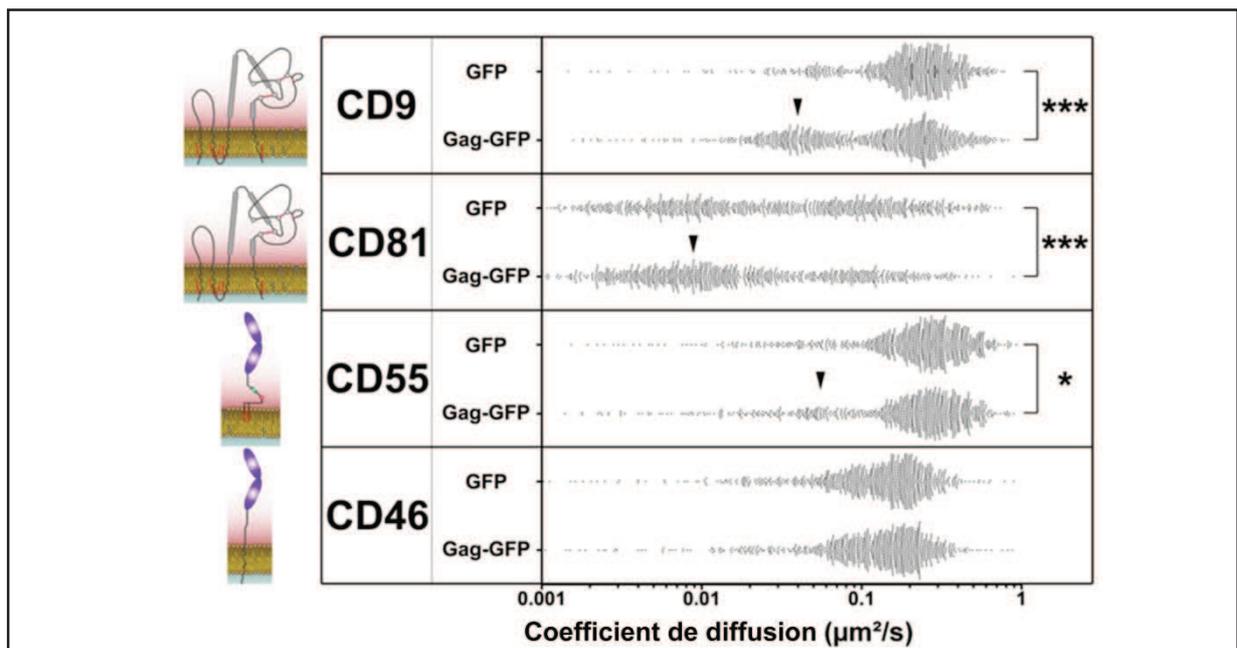


Figure 67 : Influence de l'expression de Gag sur la dynamique membranaire de CD9, CD81, CD55 et CD46. Les flèches indiquent les populations moins mobiles qui augmentent en présence de pseudo virus (voir la figure 7 de l'article). *** : $p < 0,001$; * : $0,01 < p < 0,1$.

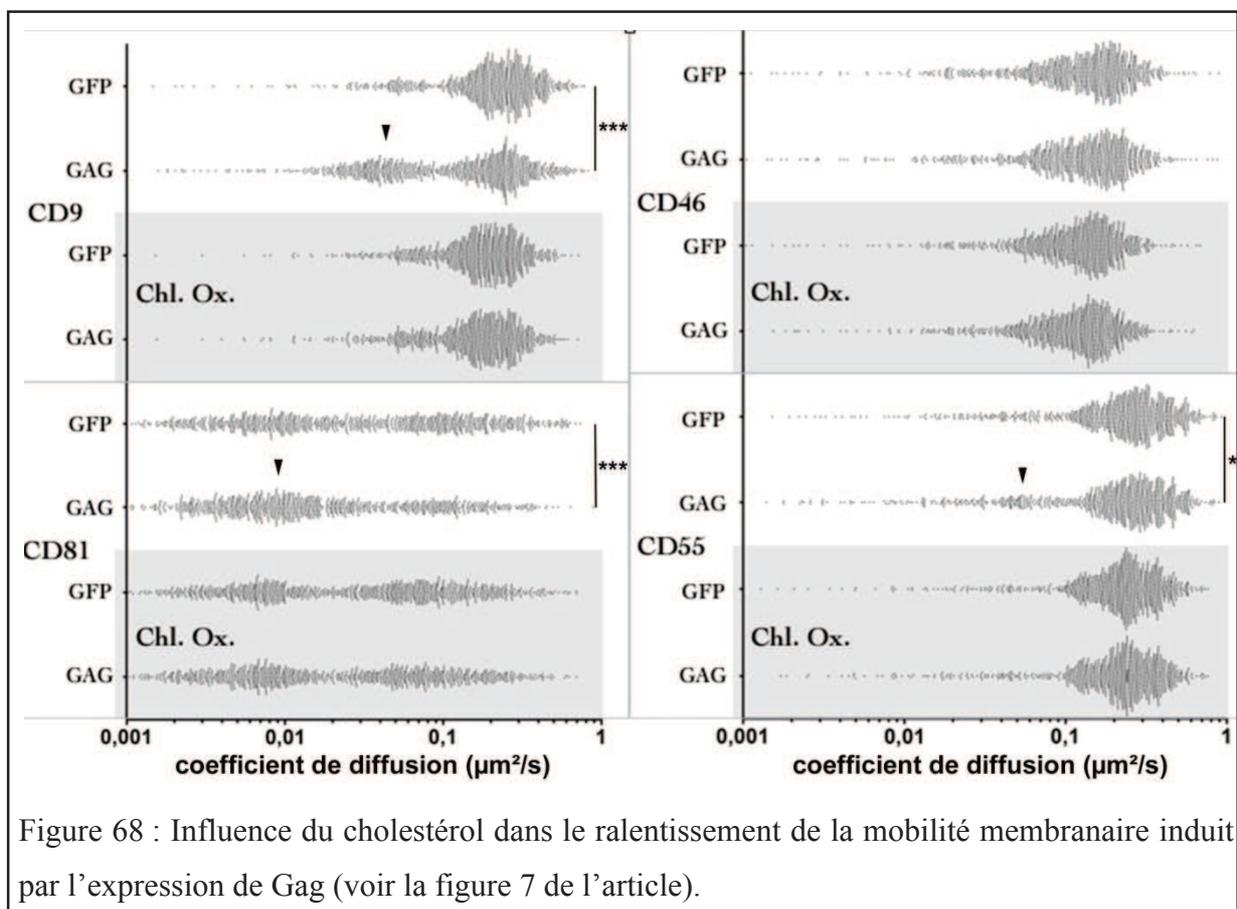
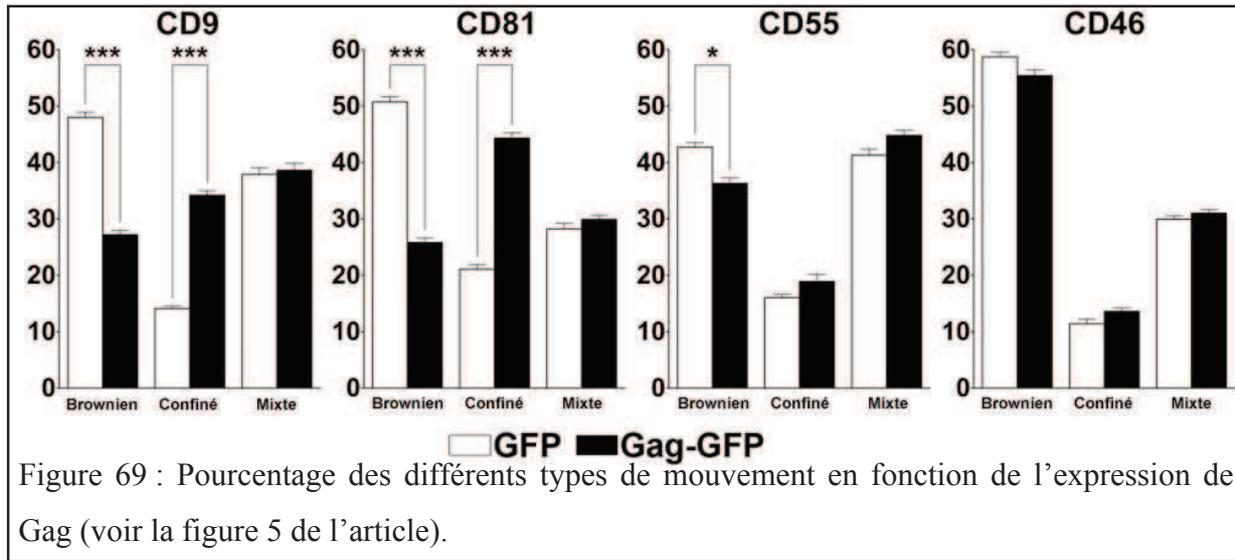
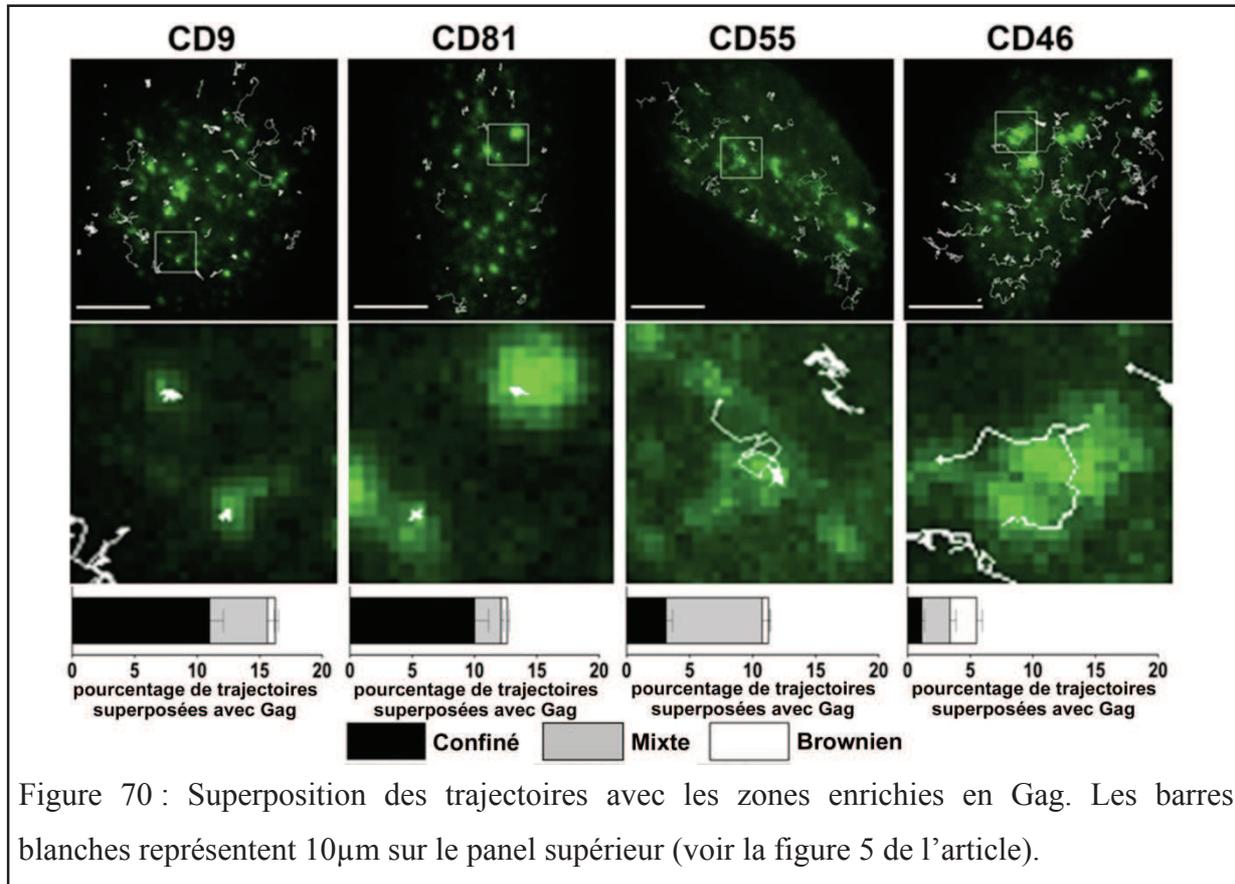


Figure 68 : Influence du cholestérol dans le ralentissement de la mobilité membranaire induit par l'expression de Gag (voir la figure 7 de l'article).



Enfin, nous avons montré que ce confinement induit par Gag correspondait à un recrutement spécifique de CD9, CD55, mais aussi de CD81 au niveau des zones d'assemblage et de bourgeonnement des pseudo particules virales. De plus, CD9 et CD81 y sont séquestrées de façon permanente alors que CD55 l'est de façon plutôt transitoire dans notre fenêtre d'observation (figure 70).



I) 4. Discussion

Lorsque nous avons entamé ce travail, différentes études avaient mis en avant la possibilité que les radeaux lipidiques et les domaines enrichis en tétraspanines constituaient des éléments des plateformes d'assemblage et de bourgeonnement du VIH^{419,420,421,215,216,430,431}. Cependant, aucune d'entre elles n'avait encore exploré les mécanismes de recrutement de ces différents éléments et en particulier les variations dans la dynamique membranaire induites par ces processus.

Nos résultats montrent que l'assemblage membranaire du VIH induit la formation de microdomaines qui s'enrichissent progressivement en éléments de rafts et en tétraspanines, par le recrutement spécifique de ces composants. Ils renforcent aussi l'idée que les protéines membranaires (ici Gag) peuvent être au cœur du mécanisme de formation de plateformes complexes par leur association spécifique à des partenaires protéiques et lipidiques^{404,432,433}.

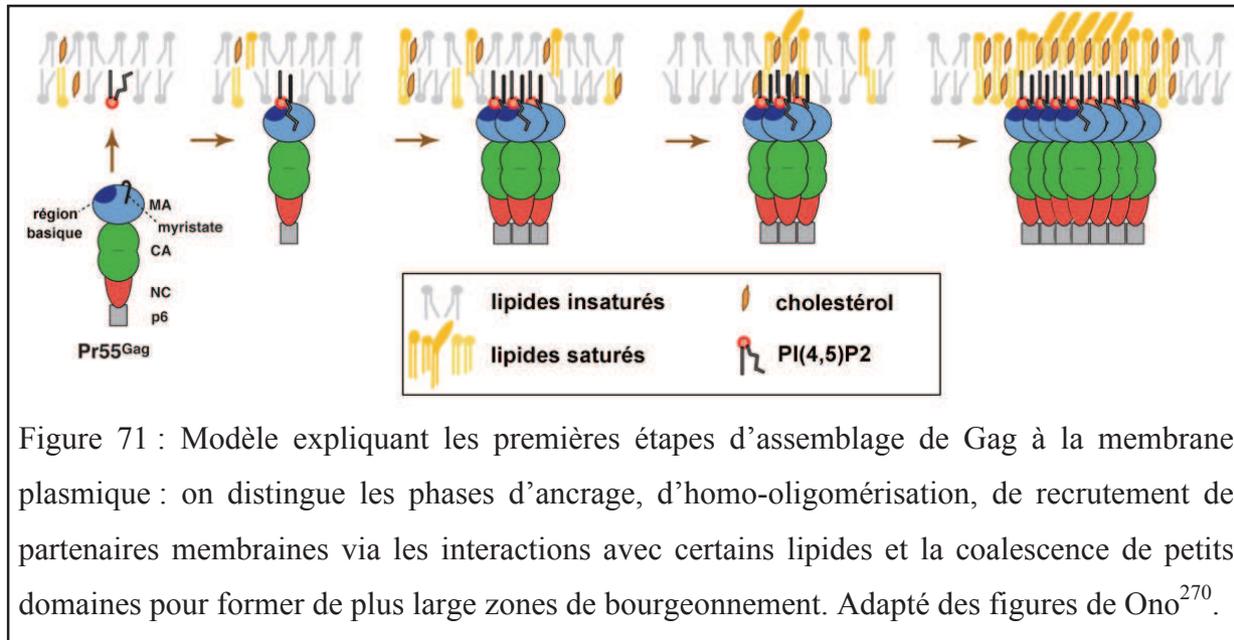
Le marquage en parallèle de Gag et des différentes protéines étudiées a permis de montrer sur cellules vivantes, l'apparition de structures membranaires plus larges pour CD9 et CD81 lorsque la polyprotéine virale est exprimée. Par ailleurs, nos collaborateurs ont montré que ce phénomène n'a pas lieu lorsqu'ils utilisent un mutant de Gag qui reste sous forme de monomères à la membrane. De plus, ils ont aussi révélé que le pourcentage de colocalisation entre les zones enrichies en CD9 et en Gag augmentaient au cours du temps. L'ensemble de ces résultats suggère que les protéines Gag ne sont pas adressées directement au niveau de larges plateformes membranaires préexistantes, mais plutôt que ce sont les zones d'assemblage de Gag qui recrutent progressivement les différents constituants de ces plateformes.

Pour vérifier cette hypothèse, nos collaborateurs ont tout d'abord mené des expériences de FRAP pour évaluer l'influence de l'expression de Gag sur la dynamique et la répartition membranaire de CD9 ou du GM1. De plus, en présence de Gag, ils ont observé d'une part une baisse de la dynamique de CD9 mais pas du GM1 et d'autre part une séquestration spécifique de cette tétraspanine au niveau des zones enrichies en Gag, ce qui n'est pas le cas pour le GM1. Il faut toutefois mentionner que les mesures de diffusion de GM1 ont été réalisées avec la chaîne B de la cholérotoxine fluorescente, cette protéine étant connue pour générer des pontages entre molécules de GM1. Les constantes de diffusion mesurées sont probablement sous-estimées et il est possible que cela masque un effet de Gag sur ce lipide.

De notre côté, nous avons observé le même type de résultat pour CD9 grâce au suivi de molécule unique. Il est d'ailleurs important de constater que les valeurs de coefficient de diffusion ou de fraction mobile sont similaires entre les données de nos collaborateurs en FRAP et nos mesures en molécules uniques. Nous avons observé un effet similaire de Gag sur le recrutement spécifique et durable de CD9 et de CD81 au niveau des bourgeonnements viraux, ce qui suggère que ces tétraspanines y sont séquestrées selon un mécanisme similaire. Par contre, CD55 y est confiné plutôt de façon transitoire, ce qui suppose que le processus est différent entre les éléments des rafts lipidiques et ceux des zones enrichies en tétraspanines. Bien qu'il ait été récemment établi que les tétraspanines CD81 et CD82 interagissent (directement ou non) avec Gag pour le VIH-1 et HTLV-1, il a été montré que cette association n'avait plus lieu lorsque la multimérisation de Gag était abolie^{430,434,435}. Par conséquent, il n'est pas concevable que l'assemblage des plateformes débute par la formation d'hétérodimères Gag-tétraspanine qui s'associeraient entre eux par des interactions tétraspanine-tétraspanine.

Pour trouver une explication alternative, nous avons cherché à établir quel pouvait être le rôle du cholestérol dans le recrutement de CD9, CD81 et CD55 au niveau des zones enrichies en Gag. De façon intéressante, le traitement avec la cholestérol oxydase diminue le nombre des larges plateformes au profit de microdomaines plus petits. De plus, dans ces conditions, la colocalisation de CD9 ou de CD81 avec les zones enrichies en Gag est partiellement réduite alors que pour CD55 elle est complètement abolie. Enfin, en présence de cholestérol oxydase, les modifications de dynamique et de répartition membranaire induites par l'expression Gag sont partiellement abrogées pour CD9 et CD81 et complètement pour CD55. L'ensemble de ces résultats suggère que le recrutement et la coalescence de domaines enrichis en cholestérol par Gag lors des premières étapes de son autoassemblage attire indirectement des tétraspanines, du fait de leur interaction avec le cholestérol notamment^{230,345}. L'homo et l'hétéro oligomérisation de CD9 et CD81 pourraient ensuite conduire à la formation de plateformes plus grandes et plus stables, où elles seraient donc séquestrées de façon durable (figure 71). Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi CD55, en tant que protéine à ancre GPI associée aux rafts lipidiques, serait aussi recruté seulement de façon transitoire au niveau de ces microdomaines, où il interagirait avec l'environnement lipidique mais pas avec ce réseau protéique. L'une des hypothèses qui a été évoquée pour expliquer quelle partie de Gag dirige le recrutement à la fois des rafts et des domaines enrichis en tétraspanines, repose sur la liaison entre le myristoyl en N-terminal de Gag et une chaîne saturée du PI(4,5)P2.

De plus, il a été montré que ces phénomènes de coalescence avaient lieu même lorsque la partie MA de Gag était remplacée par un motif de triple acylation ou un domaine de liaison lipidique hétérologue, ce qui suggère que l'adressage à la membrane et surtout l'interaction primaire avec certains lipides sont primordiaux dans ces processus^{436,437}.



Enfin, notons que dans nos conditions, la dynamique et la répartition membranaire de CD46 ne sont pas affectées par l'assemblage et le bourgeonnement des pseudo virus. De plus, les rares trajectoires qui sont superposées avec les zones enrichies en Gag ne sont pas particulièrement confinées, ce qui suggère que ces plateformes ne sont pas impénétrables pour d'autres molécules telles que CD46, mais qu'elles ne retiennent pas spécifiquement celles-ci. Ceci pourrait expliquer pourquoi dans certaines conditions, CD46 est retrouvé à des taux faibles (de façon non spécifique ou dépendante de l'expression supplémentaire des protéines d'enveloppe) dans la membrane virale^{417,438,439,440}.

II) Analyse en molécule unique de l'influence du cytosquelette sur la dynamique et la répartition membranaire des tétraspanines CD9 et CD81

II) 1. Approches expérimentales et travaux préliminaires

II) 1. 1. Conditions expérimentales pour l'étude de chimères CD9/CD81

Afin de déterminer si une ou plusieurs parties de CD9 ou de CD81 sont impliquées dans une régulation éventuelle par le cytosquelette ou d'autres paramètres cellulaires, nous avons utilisé des chimères de ces protéines. Grâce à notre collaboration avec le groupe d'Eric Rubinstein, différentes constructions ont été mises à notre disposition comme CD9xCD81, CD81x9, CD81LEL9 et CD9LEL81 (figure 72).

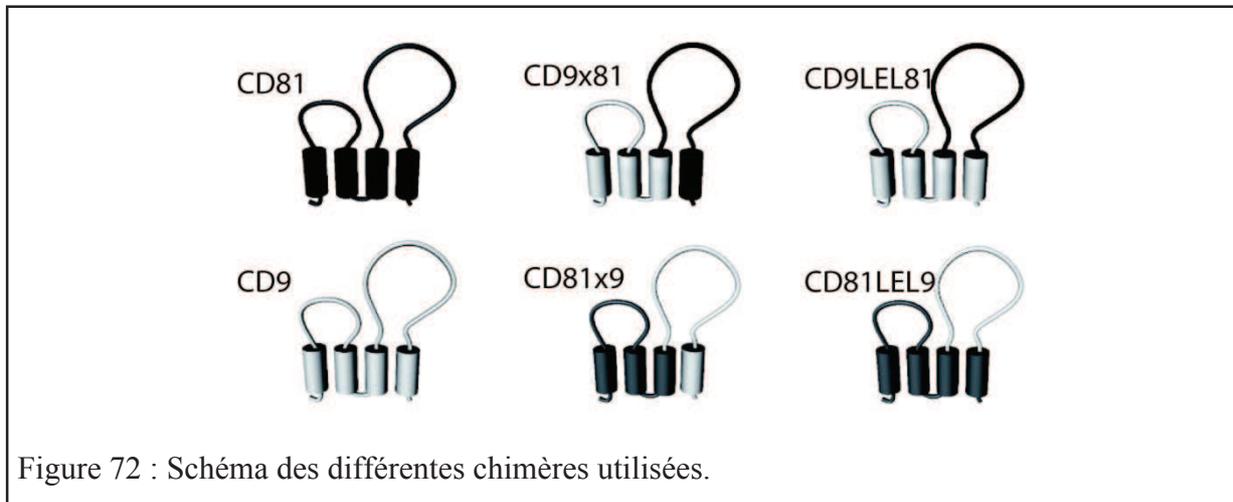


Figure 72 : Schéma des différentes chimères utilisées.

Nos anticorps dirigés contre les tétraspanines se lient à la boucle extracellulaire 2, si bien qu'il suffit a priori de transfecter les cellules avec ces constructions et d'utiliser un anti-CD9 pour les chimères CD81x9 et CD81LEL9 et un anti-CD81 pour les chimères CD9x81 et CD9LEL81. Afin d'éviter que les protéines endogènes soient reconnues en parallèle, ce qui compliquerait considérablement l'analyse des résultats, nous avons donc choisi d'exprimer ces protéines humaines dans des cellules d'une autre espèce.

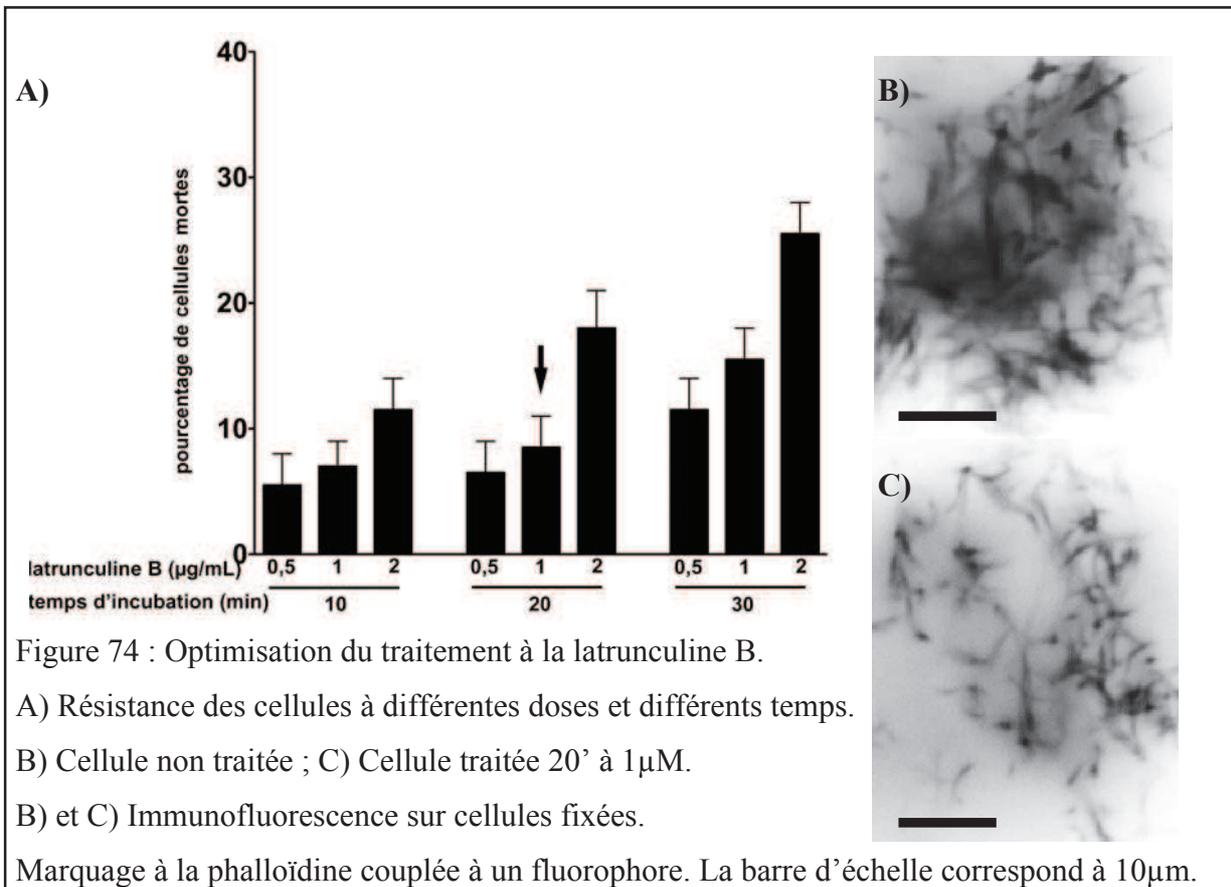
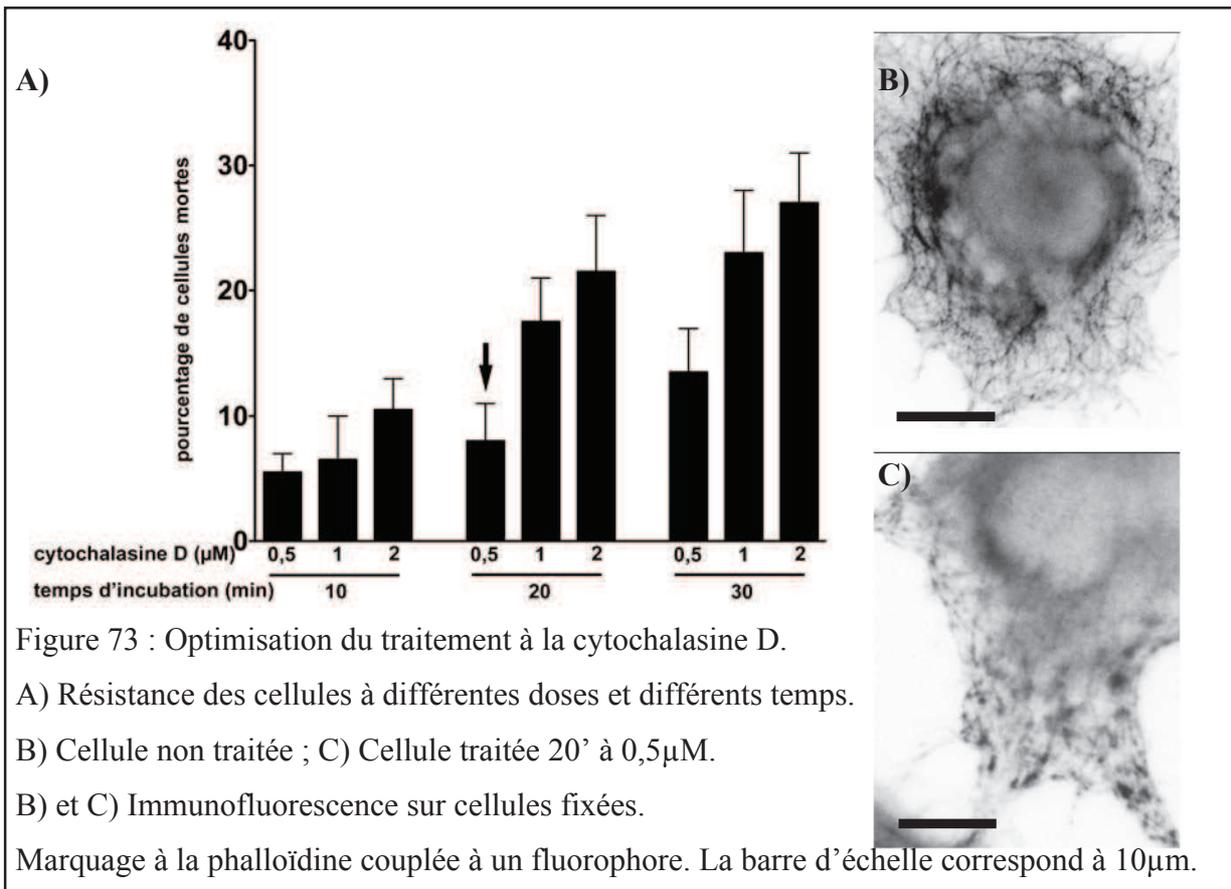
Notre choix s'est porté sur les CHO (Chinese Hamster Ovary), qui à la manière des cellules HeLa, résistent particulièrement bien à l'illumination laser, notamment lorsqu'elles sont déposées sur un substrat de fibronectine^{441,442}. Bien que les CHO expriment CD9 et CD81, nous avons pu tout d'abord contrôler que nos anticorps ne les détectaient pas. Ainsi, il a été possible de suivre spécifiquement les CD9, CD81 ou leurs chimères après transfection et expression des formes humaines dans ces cellules.

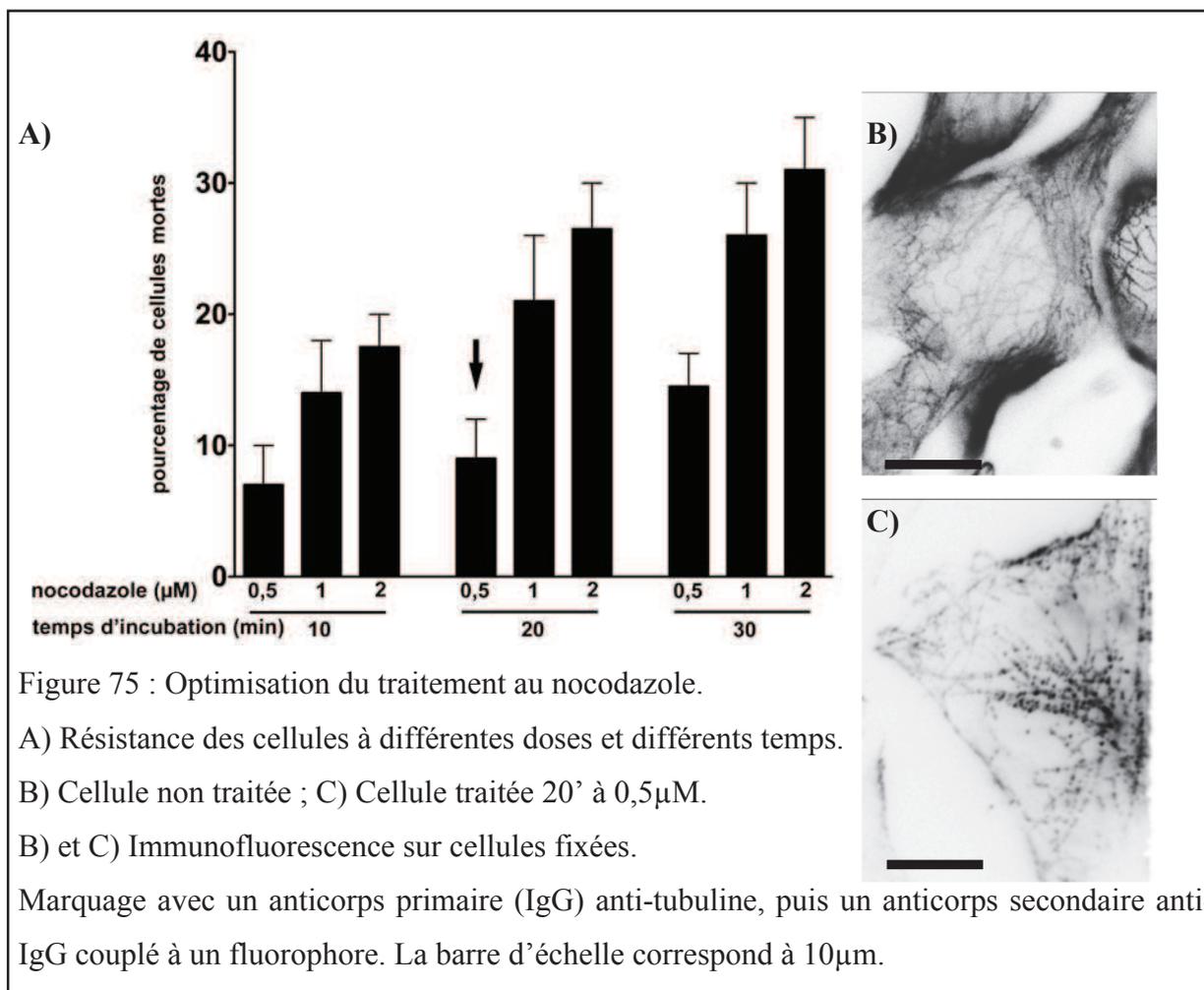
II) 1. 2. Désorganisation du cytosquelette et des liens supposés avec CD9 et CD81

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, le réseau cortical d'actine serait susceptible de former des microdomaines selon le modèle *fence picket* de Kusumi⁸⁵. De plus, il a été montré que la tétraspanine CD81 et indirectement la tétraspanine CD9 pouvaient s'associer aux protéines homologues de l'eitrine, qui lient la membrane plasmique au cytosquelette d'actine^{91,443}. Par ailleurs, il est de plus en plus évident que les réseaux d'actine et de microtubules sont interdépendants, si bien qu'il est intéressant d'évaluer l'effet de la désorganisation de l'un ou l'autre de ces éléments du cytosquelette^{444,445,446}.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord utilisé la cytochalasine D, une drogue qui désorganise le réseau d'actine, notamment par l'inhibition de son interaction avec la coffiline⁴⁴⁷. Nous avons aussi testé en parallèle, l'influence de la latrunculine B, qui bloque directement l'interaction entre les monomères d'actine et donc leur polymérisation en filaments⁴⁴⁸. Par ailleurs, afin de déstabiliser les microtubules, nous avons traité les cellules avec du nocodazole, qui interfère entre les monomères de tubuline, ce qui conduit à la dépolymérisation du réseau⁴⁴⁹. Il était cependant important d'ajuster la concentration utilisée afin d'effectuer une désorganisation ménagée de l'un ou l'autre des éléments du cytosquelette. En effet, nous avons pu vérifier qu'un traitement trop long ou trop concentré induisait un arrondissement voire la mort des cellules, traduisant des modifications plus profondes du fonctionnement cellulaire. C'est pourquoi nous avons choisi des conditions dans lesquelles les cellules étaient encore parfaitement adhérentes et où l'organisation du cytosquelette n'était que partiellement altérée. Ainsi, pour la cytochalasine D, une incubation de 20 minutes à 0,5µM est suffisante pour obtenir une désorganisation ménagée du cytosquelette de quasiment toutes les cellules, en ne détruisant pas plus de 10% d'entre elles (figure 73). Par contre, pour la latrunculine, nous avons dû doubler la dose afin qu'après 20 minutes d'incubation, l'ensemble des cellules présentent une altération partielle de leur réseau d'actine sans pour autant dégrader plus de 10% de ces cellules (figure 74). Enfin, concernant le nocodazole, toutes les cellules ou presque sont touchées par une dépolymérisation partielle des microtubules sans que 10% d'entre elles ne meurent lorsqu'un traitement de 20 minutes à 0,5µM est effectué (figures 75).

L'ensemble des expériences d'optimisation présentées ici a été réalisé en parallèle sur les cellules CHO et HeLa. Sachant que nous avons obtenu des résultats similaires dans ces deux lignées cellulaires, nous avons choisi de ne présenter ici que les figures sur les souches HeLa.





Par ailleurs, afin de détailler les mécanismes par lesquels la dynamique et la répartition des tétraspanins CD9 et CD81 pourraient être régulées par le cytosquelette via les protéines homologues de l'eitrine et/ou les partenaires primaires EWI-2 et EWI-F, nous avons utilisé d'une part des dominants négatifs de l'eitrine ou de la moésine et d'autre part des siRNA dirigés contre EWI-2 ou EWI-F.

Bruno Beaumelle (CPBS, Montpellier), nous a procuré des plasmides exprimant une forme tronquée de l'eitrine ou de la moésine. Ces protéines sont alors capables d'interagir avec la membrane plasmique mais pas avec l'actine ce qui en fait des dominants négatifs pour évaluer l'importance de l'association entre l'actine et les tétraspanines via les ERM. Par ailleurs, Eric Rubinstein nous a fourni des siRNA dirigés contre CD9, CD81, EWI-2 ou EWI-F, ce qui nous a permis de contrôler l'importance de l'une ou l'autre de ces protéines dans les processus étudiés.

Nous avons pu contrôler l'expression de ces différentes protéines en Western blot et en immunofluorescence afin d'optimiser les quantités de plasmide ou de siRNA à transférer.

II) 2. Article n°2

Il est important de noter que l'article qui suit est une ébauche de publication qui n'a pas encore été examinée par nos différents collaborateurs. Par conséquent, bien que le message général et les informations principales de ce papier ne devraient que peu changer, le choix et la présentation des résultats ainsi que de la discussion sont susceptibles de subir un certain nombre de modifications. L'examen de ce manuscrit et les débats à venir durant la soutenance de la thèse seront donc des étapes particulièrement utiles pour améliorer la pertinence et la qualité de cette publication.

Membrane dynamics and partitioning of CD9 and CD81 are differentially regulated by the actin network

Patrice Rassam^{1,2}, Laurent Fernandez, Markus Thali, Patrice Dosset^{1,2, ¶}, Eric Rubinstein^{3,4}
and Pierre-Emmanuel Milhiet^{1,2,*}

¹ Inserm, Unité 1054, Montpellier, France

² Université de Montpellier, CNRS, UMR 5048, Centre de Biochimie Structurale,
Montpellier, France

³ Inserm, U602, Villejuif, France

⁴ Université Paris 11, Institut André Lwoff, Villejuif, France

* To whom correspondence should be addressed: pem@cbs.cnrs.fr, Centre de Biochimie Structurale, 29, rue de Navacelles, 34090, Montpellier, France: Phone: (33) 4 67 41 79 17; Fax: (33) 4 67 41 79 13.

Key words: CD9, CD81, single molecule tracking, tetraspanin, membrane, microdomain, membrane diffusion, cytoskeleton.

ABSTRACT

Tetraspanins are transmembrane proteins forming a network of interactions at the plasma membrane of eukaryotic cells and often presented as membrane organizers. This network, composed of tetraspanins and of non-tetraspanin partners, is very dynamic, e.g. the tetraspanin CD9 can freely diffuse within the membrane but also be confined in tetraspanin-enriched areas.

Using single molecule tracking experiments, this study shows that CD81 is also a molecule that can freely diffuse within the membrane but is more confined and less dynamic than CD9, even if the two proteins are often co-localized and share similar partners like EWI-2 and CD9P-1. We also demonstrated that this differential behavior between the 2 proteins is mainly due to a preferential interaction of CD81 with the cytoskeleton that restricts its diffusion at the plasma membrane. This interaction is mediated by the C-terminal moiety of CD81 through its interaction with ezrin/moesin/radexin proteins and also implicates EWI-2 and CD9P-1. This study also reveals that this interaction with the cytoskeleton is in part responsible of the recruitment of CD81 and CD9 observed during the assembly of the viral Gag protein.

INTRODUCTION

Tetraspanins are transmembrane proteins that form a large family characterized by structural determinants such as four membrane spanning hydrophobic domains, delineating 2 extracellular loops (Huang et al., 2005). The first loop (EC1) is smaller than the second one (EC2) and both are poorly conserved among tetraspanins. However EC2 contains invariant residues, which include the ubiquitous CCG and PXSC motifs, and forms a partially conserved fold among tetraspanins (Seigneuret et al., 2001). Transmembrane domains contain the majority of the conserved residues that have been proposed to be involved in their packing^{450,451}. Tetraspanins are implicated in many cellular functions, most of them involving membrane remodeling such as adhesion strengthening, cell migration, differentiation and fusion (reviewed in (Hemler, 2003)), and also appears as cell trafficking regulators (Berditchevski and Odintsova, 2007). They are associated to different diseases such as cancer (Boucheix et al., 2001; Hemler, 2008) or retinal degeneration (Xu et al., 2004) and are especially involved in infectious diseases such as malaria, listeriosis and virus infection (reviewed in (Cocquerel et al., 2006; Van Spriel and Figdor, 2009; Thali, 2010; Meredith et al., 2012)). The tetraspanin CD81 has been shown to be a key protein in hepatitis C virus (HCV) infection through its binding to the E2 viral protein (Pileri et al., 1998) and membrane areas enriched in CD9, CD81 and CD63 have been suggested to serve as gateways for type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1)(Nydegger, 2006) and to regulate HIV-1 virus-cell and cell-to-cell fusion, budding and cell transmission (Sato et al., 2008; Grigorov et al., 2009; Weng et al., 2009).

Tetraspanins have the singular ability to form a network of protein-protein interaction within membranes, the so-called tetraspanin web that describes the homo- or hetero-multimerization of tetraspanins but also interaction of tetraspanins with non tetraspanin partners. This network has been first characterized by co-immuno-precipitation experiments showing different levels of interaction depending on the detergent properties used for solubilization. Tetraspanin assemblies can be identified with non-ionic detergents such as Brij97 or CHAPS but tetraspanin-tetraspanin interaction can be ruptured using digitonin, highlighting the presence of stable association of tetraspanin with non-tetraspanin proteins named primary partners.

Among them, two transmembrane proteins belonging to a subfamily of immunoglobulin proteins, EWI-2 (Stipp et al., 2001a; Charrin et al., 2003) and EWI-F also named CD9P-1 and FPRP (Charrin et al., 2001; Claas et al., 2005), have been identified as molecular partners of both CD9 and CD81. Their physiological relevance was demonstrated in the infectious context where EWI-2 and CD9P-1 are able to modulate HCV and Plasmodium infection, respectively (Charrin et al., 2009b; Montpellier et al., 2011). Interestingly, these two molecules have been proposed as linkers between the tetraspanin web and the actin network through their direct association with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins involved in connecting plasma membrane to the cortical cytoskeleton (Sala-Valdes, 2006).

Similarly to raft proteins, tetraspanin assemblies have the ability to partition into low-density fractions of sucrose gradient corresponding to detergent-resistant membranes (DRMs) (reviewed in Hemler, 2005; Levy and Shoham, 2005; Charrin et al., 2009), and consequently, it has been postulated that tetraspanin assemblies could form microdomains within membranes named tetraspanin-enriched microdomain or TEM (Claas et al., 2001; Berditchevski et al., 2002). TEMs can be defined as membrane assemblies enriched in tetraspanins and their partners but also in sphingolipids and cholesterol, a property shared with raft microdomains. However, it is important to mention that TEMs and rafts are different entities since Triton X-100, which preserves raft, disrupts TEMs. In addition, proteomic analysis of raft microdomains has not identified tetraspanins (reviewed in (Le Naour et al., 2006). More recently, the membrane dynamics of tetraspanins has been investigated in using biophysical techniques such as single molecule tracking (SMT) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS)(Barreiro et al., 2008; Espenel et al., 2008). These studies have shown that tetraspanins are dynamic molecules that can diffuse into the plasma membrane, at least CD9, CD81 and CD151. They could also be confined, permanently or transiently, in specific areas often enriched in tetraspanins and their partners such as endothelial adhesive platforms. SMT experiments clearly indicated that tetraspanins could form stable platform in permanent exchange with the rest of the membrane, at least in epithelial and endothelial cell lines.

In the context of HIV-1 infection, we further analyzed CD9 membrane dynamics in HeLa cells and demonstrated that Gag assembly could induce a specific recruitment of CD9 at budding sites, highlighting the emerging concept that viral components, instead of clustering at preexisting microdomains, can direct the formation of membrane assemblies such as TEMs (Krementsov et al., 2010). Moreover this observation also confirmed the dynamics of the tetraspanin web in another cell type.

In this paper we analyzed the membrane behavior of CD9 and CD81 in different cell lines and demonstrated that the 2 tetraspanins CD9 and CD81, despite important homology and membrane partnership, have different membrane behavior at the plasma membrane. CD81 appeared less dynamics and more confined than CD9 and this difference was mainly explained by a differential interaction with the underlying actin cytoskeleton. Functional relevance of this difference was also explored in the context of Gag assembly.

RESULTS

CD9 and CD81 membrane dynamics in different cell lines

In our previous papers, we had demonstrated that CD9 is a very dynamic molecule in both PC3 prostate cancer cells as well as in the epithelial cell line HeLa with a similar apparent diffusion coefficient (ADC) of about $0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (see Figure 1C and (Espenel et al., 2008; Krementsov et al., 2010)). In addition, in both cells lines, 3 different modes of diffusion were observed, namely Brownian (B), confined (C) or mixed (M), a combination of Brownian and confined segments within a trajectory also named transient confinement. In this work, we first analyzed CD81 membrane behavior as compared to that of CD9 using fluorescence single molecule tracking based on protein labeling with fluorescent Fab fragments of specific monoclonal antibodies (see details in the Materials and Methods section). In HeLa cells we measured a significant difference in dynamics between CD9 and CD81, the former diffusing slower with an ADC of $0.08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ as compared CD9 ADC of $0.23 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Fig. 1C). The slower diffusion can even be observed by eye as shown in Movie 1 for PC3 cells in the supplemental materials section.

In addition, the percentage of each diffusion modes in HeLa cells is clearly different between the 2 tetraspanins with a higher percentage of pure confinement for CD81 (23% versus 16%) that can be observed on the 2 snapshots in Figure 1 (compare A and B). A similar difference between CD9 and CD81 in diffusion was also observed for the fibroblastic cell line CHO (Chinese Hamster Ovary) transfected with plasmids coding human CD9 or CD81 (our antibodies are not able to recognize the endogenous molecules). However it is worthy to mention that CD9 and CD81 behaviors depend on the cell type. Both CD9 and CD81 ADCs are smaller in CHO cells as compared to HeLa and PC3 cells ($0.08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ versus 0.23 and $0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ versus 0.08 , respectively)(Fig. 1C). In addition, the percentage of each motion modes depends on the cell type, e.g. the percentage of Brownian trajectories is higher in HeLa cells as compared to CHO cells, mainly at the expense of confined trajectories.

Influence of cytoskeleton on tetraspanin dynamics

Because the C-terminal cytoplasmic tail of some tetraspanins was proposed to associate directly with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins (Sala-Valdes, 2006) that are involved in membrane-cytoskeleton association, we first analyzed the role of the cytoskeleton in the membrane behavior of both CD9 and CD81 in HeLa cells, which constitutively express both tetraspanins, and in CHO cells. To do so, cells were treated with cytochalasin D, a drug that disrupts actin microfilaments, or with nocodazole known to impair microtubules polymerization.

HeLa cells treatment with cytochalasin D largely modified CD81 membrane behavior with a significant difference in the distribution of ADC values of 500 trajectories for each condition (scatter plot in Fig. 2A). The mean value of CD81 apparent diffusion coefficient was increased from $0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$ to $0.11 \mu\text{m}^2/\text{s}$ that can be in part explained by a decrease of the percentage of pure confined trajectories from 21.1% to 12.4% at the expense of both Brownian trajectories that increased from 53.8% to 58.6% and mixed trajectories that increased from 25.1% to 29.2%. The scatter plot highlights a new Brownian population with a high ADC (black arrowhead) that can be superimposed with the main population of CD9 trajectories. A closer look to the scatter plot indicated that Brownian trajectories were mainly affected (Fig. S1) whereas the profile of confined and mixed trajectories was unchanged (data not shown). These results clearly indicated that the actin network was involved in the dynamics of CD81. Interestingly the size of confinement areas was not modified as compared to control cells (data not shown).

We then expressed in HeLa cells a C-terminal truncated form of ezrin (1-130) that is able to bind to co-receptors at the plasma membrane, but cannot interact with F-actin (Marion et al., 2011). Under these conditions, CD81 membrane behavior was similar to that observed in cytochalasin D-treated cells strongly suggesting that the actin cytoskeleton is responsible for CD81 confinement through ERM proteins. This assumption is also supported by HeLa cells transfection with a N-terminal-truncated form of GFP-fusion moesin (Amieva et al., 1999) that also modified CD81 dynamics by decreasing the number of confinements (data not shown). Similar experiments were also performed with CD9 and no modification of its dynamics was observed with an ADC mean value of $0.22 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for all the conditions and no significant difference in the percentage of the different motion modes (Fig. 2A).

As expected, no effects after actin depletion or expression of a dominant negative ezrin protein were observed in HeLa cells for CD46, a protein excluded from TEMs and raft microdomains and that we previously used as a negative control (Espenel et al., 2008). Single molecule experiments with HeLa cells were completed with ensemble labeling in order to determine the percentage of co-localization of CD9 and CD81 labeled with fluorescent antibodies as compared to GFP-fusion ezrin (figure 2B). As early observed in HeLa cells (Nydegger, 2006), patchy fluorescence corresponding to CD9- and CD81-enriched areas was observed. The percentage of co-localization between ezrin and tetraspanins, normalized with the number of pixels containing tetraspanin signal (see Materials and Methods), was estimated to 23% for CD9 and to 39 % for CD81. This percentage increased to 56% when simultaneous labeling of CD9 and CD81 was performed indicating that CD9 and CD81 are only partially co-localized within tetraspanin-enriched areas (TEAs). Assuming that confined areas correspond to TEAs, these results supports the assumption that part of the tetraspanin assemblies, especially those containing CD9, are not linked to the cytoskeleton. This point will be further discussed later. Finally the influence of the actin cytoskeleton upon CD81 dynamics was also investigated in CHO cells. As shown in Fig.1, CD9 and CD81 dynamics are different between HeLa and CHO cells. However, it is noteworthy to mention that CD81 dynamics was specifically altered (as compared to CD9) when CHO cells were treated with cytochalasin D (Fig. S2). Even at a lower extent, the number of CD81 confined trajectories was decreased from 50.2 to 39.6 %. This lower decrease as compared to HeLa cells could be due by the higher percentage of pure confined trajectories in CHO cells (compare ADC values of figures 2 and 3 for WT).

As mentioned above, importance of the microfilaments upon tetraspanin dynamics was also investigated using nocodazole. Under these conditions, we have also observed a decrease of confined trajectories at the expense of both Brownian and mixed trajectories. However a similar effect was observed with CD9 but also with CD46 that is not linked to the tetraspanin web and is classically used as a control (Espenel et al., 2008; Hogue et al., 2011)(data not shown). Taken together our results suggest that nocodazole effect was not specific for tetraspanin and probably correspond to a general perturbation of the plasma membrane organization by this drug.

Influence of primary partners on CD9 and CD81 dynamics

EWI-2 and CD9P-1 (also named EWI-F or FPRP) are two members of a novel subfamily of Ig proteins, identified as primary partners of both CD9 and CD81 (Charrin et al., 2001, 2003; Stipp et al., 2001a; Claas et al., 2005). In addition these proteins have been proposed to link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ERM proteins (Sala-Valdes, 2006). To determine whether these proteins are involved in the dynamics of CD9 and CD81, we down regulated their expression in HeLa cells using siRNA transfection and performed single molecule tracking of both CD81 and CD9. EWI-2 and CD9P-1 silencing was controlled by western blotting and showed an almost complete loss of expression without any effects on tubulin β expression used as a control (Fig. 3A). EWI-2 depletion from the plasma membrane induced a slight but significant effect on CD81 dynamics. The percentage of CD81 confined trajectories was decreased from 21.1 to 17.6 mainly at the expense of mixed trajectories (Fig. 3B). A similar but slightly higher decrease of confined trajectories, from 21.1% to 15.2 %, was observed when CD9P-1 was silenced suggesting that EWI-2 and CD9P-1 probably behave in a comparable manner within the tetraspanin web. These decreases were however less important as compared to cytochalasin D treatment suggesting CD81 confinement areas, that depend on cytoskeleton integrity, do not necessarily contain EWI-2 protein, and/or only part of CD81 molecules are linked to cytoskeleton through their association with EWI-2. Whereas cytochalasin D effect was specific for CD81, depletion of EWI-2 and CD9P-1 also modified the dynamics of CD9.

A decrease of the percentage of confined trajectories from 15.6% to 12.3% and 9.8% was respectively observed for EWI-2 and CD9P-1. This effect, even at a lesser extent, compared well with the one observed after cytochalasin D treatment (Fig. 2A) and also supports the assumption that part of the tetraspanin assemblies, especially those containing CD9, are not linked to the cytoskeleton under native conditions. Fortunately, the influence of EWI-2 and CD9P-1 depletion was specific since no effect was observed with CD46 (Fig. 3B). It is important to mention that no significant difference was observed in terms of distribution of ADC in the scatter plots for the different conditions (data not shown), highlighting the fact that EWI-2 and CD9P-1 depletion mainly affected CD9 and CD81 partitioning rather than their diffusion properties within the membrane.

In order to further understand the relationship of EWI-2 and CD9P-1 with the TEAs, co-localization experiments of these 2 proteins with CD9 and CD81 were performed (Fig. S3). As expected, patchy fluorescence corresponding to TEAs was observed for CD9 and CD81 and they partially co-localized with both EWI-2 and CD9P-1 (the percentage of co-localization was 18% and 21% with CD9 and 32% and 38% with CD81 for EWI and CD9P-1, respectively). The fact that the percentage of co-localization with CD9 and/or CD81 was higher for CD9P-1 as compared to EWI-2 is difficult to interpret since this value depends on the number of proteins expressed at the plasma membrane. However, as previously described (Charrin et al., 2001) and taken into account that we could not observe any difference in terms of fluorescence labeling or western blotting signals between CD9 and CD81 in HeLa cells, our results clearly indicate that EWI-2 and CD9P-1 better co-localized with CD81 than with CD9. In addition, the fact that the percentage of co-localization increased when the 2 tetraspanins are simultaneously labeled indicated that CD81 and CD9 associated to EWI-2 and CD9P-1 are not necessarily within the same domains.

Molecular determinants involved in CD9 and CD81 dynamics

In order to confirm the influence of the C-terminal part of CD81 in its dynamics, we took advantages from different CD9/CD81 chimeric proteins expressed in CHO cells (Figure 4). We first analyzed a chimeric CD9/CD81 protein mainly composed of CD9 with the C-terminal part of CD81. The limit between the two fragments was located after the third transmembrane domains (residue 118/119 in the CD9 amino acid sequence)(see Fig. 4 for details of the constructs named CD9x81 and Lagaudriere-Gesbert et al., 1997).

In order to better visualize the difference in membrane dynamics in SMT experiments, we chose to display ADC values of trajectories in a scatter plot where one dot corresponds to the ADC value of one trajectory and to show the percentage of each detected diffusion modes using a pie chart. This representation strengthened the difference observed between CD9 and CD81 where a larger population of fast or slow diffusing molecules can be easily observed for CD9 and CD81, respectively (see white arrowheads in Fig. 4). The number of confined trajectories (black sector in the pie chart) is larger for CD81 whereas the number of Brownian trajectories is similar for both molecules (white sector). This chart also indicated that CD81 is less transiently confined (mixed trajectories, grey sector) than CD9.

The diameter of confinement was also determined for both purely or transiently confined molecules and, as already observed for PC3 cells (Espenel et al., 2008), the diameter of confinement in mixed trajectories (273 nm) was larger than the one observed in pure confinement (216 nm) for CD9 but not for CD81 (Table S1). However, the diameter of confinement of CD81 molecules was smaller than CD9 suggesting that CD81 partitioning is probably different or differentially regulated than CD9. Only a slight difference in the time of confinement for mixed trajectories of CD9 and CD81 was observed (data not shown). Interestingly, the chimeric protein CD9x81 displayed a membrane behavior similar to CD81 in terms of distribution of the ADC values of trajectories, the percentage of the different motion modes, as well as the diameter of confinement (Fig. 4 and Table S1). These results demonstrated that major molecular determinants located in the C terminal part are involved in the slower dynamics of CD81. Because the LEL of tetraspanins have been shown to be involved in several tetraspanin functions, we also evaluated the membrane behavior of a CD81 chimeric protein where the loop has been exchanged by the corresponding domain of CD9 (named CD81LEL9). As shown in Figure 4, CD81LEL9 have exactly the same distribution of ADC values and the same percentage of the different motion modes as compared to WT CD81 proteins. Similarly, dynamics and partitioning of the CD9 chimeric protein CD9LEL81 was similar to CD9 (data not shown). These results clearly demonstrated that the LEL is not involved in the CD81 membrane dynamics and partitioning.

Functional insights of the differential dynamics of CD9 and CD81

In order to gain functional insights of CD9 and CD81 differential dynamics, we took advantage of our recent work on HIV-1 Assembly (Krementsov et al., 2010). In this paper, we demonstrated that multimerization of the viral component Gag at the plasma membrane specifically recruited CD9 molecules at viral exit sites, forming new platforms in which the tetraspanin was confined (see also Figure 5 showing the increase of confinement of CD9 from 15% to 37% in Gag-expressing versus control HeLa cells). More recently, we also observed a similar partitioning of CD81 within Gag-enriched areas and that partially co-localized with CD9 (Figure S4). As already observed with CD9, CD81 dynamics was largely modified during Gag assembly, mainly characterized by an increase of the confined trajectories from 21% to 44% mainly at the detriment of Brownian trajectories (Fig. 5).

This increase was logically associated to a decrease of the ADC mean value from 0.08 to 0.05 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. In agreement with the experiments presented above and with a paper describing the disruption of tetraspanin-enriched microdomains/HIV-1 platforms by actin depolymerization in Jurkat cells ⁴⁵², we investigated the CD9/CD81 differential membrane behavior in Gag-expressing HeLa cells in the ERMs context. Expression of the C-terminal truncated form of ezrin almost restored the CD81 dynamics indicating that ERMs proteins and actin cytoskeleton are involved in the lateral recruitment of CD9 and CD81 during Gag assembly (the ADC mean value was 0.08 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ and the percentage of confined trajectories 21%). Surprisingly, in regards to the fact that expression of the ezrin mutant did not modify CD9 membrane behavior in WT HeLa cells (Fig. 3), CD9 dynamics in Gag-expressing cells was altered in a similar manner as compared to CD81. The percentage of confined trajectories was almost restored (21 instead of 15%) and non-significantly different from that measured in control cells (Fig.5). As expected, CD46 dynamics was not affected in cells expressing Gag, transfected or not with the plasmid coding for the ezrin mutant. Taken together, these results indicated that CD9 and CD81 recruitment to the Gag assembly sites at the plasma membrane is mediated by the cytoskeleton and probably through molecular mechanisms different from those involved under physiological conditions.

Taken into account that CD9 and CD81 are often co-localized and considered as preferential partners within the tetraspanin web, one explanation for the membrane behavior observed in the Gag assembly context could be that CD81 influence CD9 dynamics through their interaction. To test this hypothesis, siRNA experiments of CD81 or CD81 were performed in WT or Gag-expressing cells. siRNA efficiency was controlled by western blot (Fig. S5) and CD9 or CD81 was decreased by at least 90 % as compared to WT cells. Under physiological conditions, no modification of the dynamics of one tetraspanin was modified by depletion of the other at the plasma membrane, suggesting that their partnership is quite limited in terms of diffusing molecules (data not shown). However, similar experiments in Gag-expressing cells led to opposite results. When CD9 molecules were depleted, CD81 membrane behavior was significantly different from control Gag-expressing cells and CD81 lateral segregation was impaired as demonstrated by the decrease of confined trajectories from 44% to 31% of the total trajectories. Similarly, CD81 depletion largely modified CD9 confinement from 37% to 27%. However, the percentage of confinements was always higher than the one observed in control HeLa cells suggesting that other mechanisms apart from CD9-CD81 interactions are required for their partition to Gag assembly sites. As expected, no effects of CD9 and CD81 depletion were observed on CD46 membrane partition.

DISCUSSION

One of the key features of tetraspanins is their ability to form a network of protein-protein interactions involving tetraspanins but also other non-tetraspanin membrane partners. Thus they are often considered as membrane scaffolders, creating membrane platforms. In the light of recent single molecule experiments, it now appears that these platforms, even stable in shape and in position, permanently exchange with the rest of the membrane tetraspanin molecules, probably associated with other membrane proteins. Our results demonstrate that the dynamic behavior of the tetraspanins CD9 and CD81 is finely regulated at different levels, in order to control cellular processes and infection progression in coordination with the different elements of the tetraspanin web.

Even if CD9 and CD81 have 64% homology and shared primary partners like EWI-2 (Stipp et al., 2001a; Charrin et al., 2003), CD9P-1 (Charrin et al., 2001; Stipp et al., 2001b) and Claudin-1 (Kovalenko et al., 2007; Harris et al., 2008), we here demonstrated that their membrane behavior is very different both in terms of diffusion and partition in HeLa and CHO cells. The decrease of ADC mean value was mainly explained by a larger percentage of confined trajectories for CD81 as compared to CD9 that could correspond to a preferential association with TEAs (we previously showed in PC3 cells that confinement overlapped TEAs (Espenel et al., 2008)) or, alternatively, by a differential interaction of CD9 and CD81 with TEAs of different composition in tetraspanins and primary partners, and links with the actin network. The different experiments provided in this paper clearly favor the second hypothesis.

Thanks to different CD9/CD81 chimeric proteins, we demonstrated that the replacement of the half C-terminal moiety of CD9 by the corresponding CD81 sequence lead to a membrane behavior that is close to CD81 in terms of confinement and also in terms of diffusion coefficient, indicating that CD81 is more constrained than CD9. This higher constraint is partially explained by the preferential interaction of CD81 with the actin network through ERM proteins. Therefore cytochalasin D treatment and expression of inactive ezrin and moesin increased CD81 dynamics and a new Brownian population of molecules with diffusion properties close to CD9 appeared. CD81 interaction with the actin network most probably occurs through its C-terminal cytoplasmic domains that has been shown to be directly associated with EWI-2 and CD9P-1, two primary partners associated to ERMs proteins (Sala-Valdes, 2006). CD81 LEL was not involved in its behavior although it has been proposed to be involved in the interaction with EWI-2 (Montpellier et al., 2011).

The preferential interaction of CD81 with the actin cytoskeleton is also supported by CD9/CD81 co-localization experiments (Fig. S6). Indeed we observed an increase of CD9/CD81 co-localization when the ezrin mutant was expressed as a consequence of the disappearance of CD81-enriched areas that did not contain any CD9 proteins. In addition, we also demonstrated that CD81 was more co-localized with EWI-2 and CD9P-1, both associated to ERMs, than CD9 (Fig. S3).

The hypothesis that CD9/CD81 discrepancies in dynamics and partitioning are due to their differential interaction with TEAs of different composition is also supported by the partial co-localization (~ 40%) of the two tetraspanins in HeLa cells (Fig. S6) and by the size of CD81 confinement zones, especially in transient confinements, that is smaller than that of CD9 (Table S1). As mentioned above, proteins displaying a Brownian behavior were diffusing slower in the case of CD81 than CD9. Different explanations can be proposed to explain such difference. First, it could be the result of an underestimation of the apparent diffusion coefficient measured in this study using a 100 ms acquisition time if CD81 proteins preferentially interact with the cytoskeleton and the duration of this interaction is far smaller than our temporal resolution. It can be related to the hop diffusion model observed by Kusumi's group that described the diffusion of molecules between compartment boundaries based on actin-skeleton fences and anchored-transmembrane protein pickets (Kusumi et al., 2005). In this model, the time of confinement is in the few ms range that cannot be recorded with a classical EM-CCD camera. Another explanation is the presence of higher ordered lipids in the vicinity of CD81 as compared to CD9. It is tempting to speculate that this difference in lipid order could originate from cholesterol, a component of the tetraspanin web that is known to modify membrane fluidity but, to our knowledge, no published data support this hypothesis. The last explanation is that CD81 and CD9 free diffusion measured at plasma membrane corresponds to the Brownian motion of clusters of molecules that could be larger for CD81 than for CD9. In the case of CD81, these nanoclusters could contain more partners like EWI-2 or CD9P-1 or other membrane partners that needs to be identified. This hypothesis is supported by the Saffman-Delbrück theory that relates the diffusion coefficient to the diameter of the diffusing object (Saffman and Delbruck, 1975) and parallels the differential partitioning of CD81 and CD9 in different types of TEAs described above. In addition, the propensity of CD81 to form dimers (Shoham et al., 2006; Charrin et al., 2009a) could favor the formation of larger nanoclusters, particularly in ERM-associated platforms.

Different tetraspanins can then have different membrane behaviors in the same cell and our results also demonstrate that dynamics and partitioning of a given tetraspanin depends on the cell type. CD9 ADC and partitioning is in the same range in HeLa and PC3 cells, 2 cancer epithelial cell lines, whereas its diffusion is much more constrained within the plasma membrane of fibroblastic CHO Cells. As previously discussed, it is therefore tempting to speculate that this different behavior is due to a different micro- or nano-environment that includes lipid membrane composition, especially the phospholipids/cholesterol ratio, anchoring to the cytoskeleton, as well as partnership with other proteins into the plasma membrane, e.g. the expression of tetraspanins and primary partners vary from one cell to another and could influence stability of TEAs. More recently, we demonstrated that CD81 dynamics is different in polarized and non-polarized HepG2 epithelial cells (Harris et al, 2012), an observation in good agreement with the specific targeting of membrane components at the apical membrane of epithelial cells that has been addressed in the context of raft microdomains (Brown and Rose, 1992).

The biological relevance of this differential dynamics observed in HeLa cells was addressed in the context of Gag multimerization at the plasma membrane and formation of viral-like particles mimicking the budding of HIV-1 virus. Previous experiments have demonstrated that cholesterol is a key component for Gag assembly (Ono and Freed, 2001) and that Gag multimers needed to interact with F-actin for efficient virion production (Rey et al., 1996). The former observation led to the idea that Gag was assembled through its association with raft microdomains but it is now clear that it is the assembly of Gag proteins that laterally recruit raft proteins but also tetraspanins (reviewed in Ono, 2010; Thali, 2011) and many other membrane components. Cholesterol dependence of the dynamics of both tetraspanins and raft proteins at the single molecule level (Suzuki et al., 2007; Espenel et al., 2008) suggests that these proteins are in a cholesterol-enriched environment that could facilitate their recruitment by the myristoyl moiety of Gag at its assembly site. This recruitment led to the formation of large and membrane platforms enriched in Gag, CD9 and CD81 (Fig. S4 and Krementsov et al., 2010) and probably raft proteins. It has even been shown that these TEMs and rafts could coalesce (Krementsov et al., 2010; Hogue et al., 2011). It is noteworthy to mention that microdomains are often identified to areas enriched in raft proteins and/or tetraspanins but this description does not take into account a lot of proteins diffusing within the plasma membrane, probably as nanoclusters. The results presented here show that CD9 and CD81 recruitment at budding sites depends on actin cytoskeleton through ERM proteins.

They are in good agreement with the modification and both dynamics and partition of CD81 in WT cells upon remodeling of the actin cytoskeleton. More surprising is the decrease of CD9 recruitment at Gag assembly sites since we observed that CD9 membrane behavior was not sensitized to actin remodeling (Fig. 3). This result suggests that CD9 microenvironment in Gag-enriched areas is different from that classical ERM platforms in WT cells and it is tempting to speculate that recruitment of CD9 and CD81 due to Gag assembly increase the interaction of the two tetraspanins. As a consequence, dynamics of CD9 is modified due its interaction to CD81, linked to the cytoskeleton through ERM proteins. This higher interaction between CD9 and CD81 during Gag assembly is also supported by SiRNA experiments. Therefore, the confinement of CD9 or CD81 that is related to their lateral recruitment was largely decreased by depletion of one of the two tetraspanins. Alternatively, it is possible that Gag assembly recruits primary partners of CD9 and CD81 proteins such as EWI-2 and/or CD9P-1 that are linked to ERM proteins. This interpretation is supported by a recent publication describing the importance of EWI-2 association with α -actinin in the regulation of immune synapses in T cells (Gordón-Alonso et al., 2012). Taken together, our results highlights that CD9 and CD81 lateral segregation is differentially regulated in infected cells, compared to native conditions.

In conclusion, this study strengthens the fact that dynamics and partitioning of tetraspanins are finely regulated. This regulation is a multi-parameter process including protein-protein and protein-lipid interaction as well as protein-cytoskeleton interaction. Single molecule experiments suggest that tetraspanin diffuse as nanoclusters that can interact with each other and can laterally segregated to form TEA or to associate with preformed enriched areas. These clusters could include a few tetraspanins associated with primary partners. Different composition of these clusters has probably a large influence on tetraspanin functions and depends of several parameters that remain to be further explored.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies. Fab fragments or full length mAbs raised against CD81 (TS81), CD9 (SYB-1), CD46 (11C5), EW12 (8A12) or CD9P-1 (1F11) were labeled with Atto647N or Cy3B as previously described (Espenel et al., 2008). Peroxidase conjugated goat anti-mouse antibodies were from Jackson ImmunoResearch.

Plasmids and construction of chimeric CD9/CD81 tetraspanins

The CD9/CD81 chimeras were constructed by a PCR-based method. In CD9x81 chimera, the amino acid (aa) sequence coding the third transmembrane domain, LEL and the C-terminal cytoplasmic tail of CD9 (aa 87-113) was replaced by those of CD81. In CD81LELCD9 chimera, the aa sequence coding the LEL (aa 204-236) was replaced by the corresponding sequence of CD9. Cloning details and oligonucleotide sequences are available upon request. In SiRNA experiments, HeLa cells plated onto six-well plates were transfected with RNA oligonucleotides from Ambion specific for the inactivation of CD9 (identification no. 10309), and CD81 (identification no. 14407) and a negative control (catalog no. AM4631).

Cell lines and transfection. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cell transfections were performed using FuGene (Roche) for plasmids and Interferine® for siRNA experiments.

Single Molecule Tracking experiments. SMT experiments were carried out as previously described (Espenel et al., 2008). Briefly, cells plated on collagen-1 (HeLa) or fibronectin (CHO) were incubated in red phenol-free DMEM at 37°C for 10 min with Atto647N- or Cy3b-labeled Fab fragments of mAbs raised against CD81 (TS81), CD9 (SYB-1) or CD46 (11C5). For single molecule experiments, one probe per molecule was achieved. Ensemble labeling was performed with full antibody. A homemade objective-type TIRF setup allowing multicolor single-molecule imaging and equipped with a Plan Fluor 100×/1.45 NA objective (Zeiss, Le Peck, France Brattleboro, VT) was used. All the experiments were performed with a 100ms integration time. For some experiments, to achieve a better specificity in the detection of the two fluorescent signals, alternating-laser excitation (ALEX) was performed using an acousto-optical tunable filter and controller (AOTF; AA Optoelectronics) (Kapanidis et al., 2005).

All the movies were analyzed using a homemade software (named 'PaTrack') implemented in visual C++. Trajectories were constructed using the individual diffraction limited signal of each molecule. The center of each fluorescence peak was determined with subpixel resolution by fitting a two-dimensional elliptical Gaussian function. The two-dimensional trajectories of single molecules were constructed frame per frame. Only trajectories containing at least 40 points were retained. Diffusion coefficient values were determined from a linear fit to the MSD (mean square displacement)- τ plots between the first and the fourth points (D_{1-4}) according to the equation $MSD(t) = 4Dt$. The determination of the motional modes was performed using a homemade algorithm based on a neural network that has been trained using synthetic trajectories to detect pure Brownian, confined and directed motion modes (Dosset, manuscript in preparation). Thanks to a sliding window, the trajectory is analyzed and the different modes can be confidently detected within a trajectory for segments larger than 10 frames. Once the motion mode identified, the different segments are analysed by plotting the MSD versus time lag. The MSD curve was linearly fitted (Brownian) or adjusted with a quadratic curve ($4Dt + v^2t^2$) (directed diffusion) or exponential curve $L^2/3(1-\exp(-12Dt/L^2))$ (confined diffusion), where L is the side of a square domain, the confinement diameter being related to L by $d_{conf} = (2/\sqrt{3})L$ (Qian, 1991). The apparent diffusion coefficient values were determined from a linear fit between the first and fourth points (D_{1-4}). The algorithm has been tested with simulated trajectories displaying pure Brownian, confined or directed behavior or a combination of this 3 modes and successfully applied to a set of single molecule experiments previously recorded for tetraspanins diffusing into plasma membrane.

Colocalization analyses

Colocalization analyses were carried out using the CoLocalizer Pro software. Briefly, images representing a single optical Z-section of cells were converted to tiffs and imported into CoLocalizer Pro software. Background corrections were applied and the total number of pixels overlapping between the two different channels was calculated. Colocalized pixels were divided by the total number of pixels for a given channel (as indicated in the legends of figure) yielding to a percentage of colocalization. At least 10 cells per condition were analyzed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Guillaume Olivier and Emmanuel Margeat for their technical help. P.R. was a recipient of the French Ministry of Research and is now an ANRS fellow.

REFERENCES

- Amieva, M.R., Litman, P., Huang, L., Ichimaru, E., and Furthmayr, H. (1999). Disruption of dynamic cell surface architecture of NIH3T3 fibroblasts by the N-terminal domains of moesin and ezrin: in vivo imaging with GFP fusion proteins. *J. Cell. Sci.* *112 (Pt 1)*, 111–125.
- Barreiro, O., Zamai, M., Yanez-Mo, M., Tejera, E., Lopez-Romero, P., Monk, P.N., Gratton, E., Caiolfa, V.R., and Sanchez-Madrid, F. (2008). Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of Cell Biology* *183*, 527–542.
- Berditchevski, F., and Odintsova, E. (2007). Tetraspanins as Regulators of Protein Trafficking. *Traffic* *8*, 89–96.
- Berditchevski, F., Odintsova, E., Sawada, S., and Gilbert, E. (2002). Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem* *277*, 36991–37000.
- Boucheix, C., Duc, G.H., Jasmin, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins and malignancy. *Expert Reviews in Molecular Medicine* *2001*, 1–17.
- Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* *68*, 533–544.
- Charrin, S., Le Naour, F., Labas, V., Billard, M., Le Caer, J.P., Emile, J.F., Petit, M.A., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003). EW1-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* *373*, 409–421.
- Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S.M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem* *276*, 14329–14337.
- Charrin, S., Le Naour, F., Silvie, O., Milhiet, P.-E., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2009a). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J* *420*, 133–154.
- Charrin, S., Yalaoui, S., Bartosch, B., Cocquerel, L., Franetich, J.F., Boucheix, C., Mazier, D., Rubinstein, E., and Silvie, O. (2009b). The Ig domain protein CD9P-1 down-regulates CD81 ability to support Plasmodium yoelii infection. *J Biol Chem* *284*, 31572–31578.
- Chen, C., Jin, J., Rubin, M., Huang, L., Sturgeon, T., Weixel, K.M., Stolz, D.B., Watkins, S.C., Bamburg, J.R., Weisz, O.A., et al. (2007). Association of gag multimers with filamentous actin during equine infectious anemia virus assembly. *Curr. HIV Res.* *5*, 315–323.
- Claas, C., Stipp, C.S., and Hemler, M.E. (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 7974–7984.
- Claas, C., Wahl, J., Orlicky, D.J., Karaduman, H., Schönöler, M., Kempf, T., and Zöller, M. (2005). The tetraspanin D6.1A and its molecular partners on rat carcinoma cells. *Biochem. J.* *389*, 99–110.
- Cocquerel, L., Voisset, C., and Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* *87*, 1075–1084.
- Espenel, C., Margeat, E., Dosset, P., Arduise, C., Le Grimellec, C., Royer, C.A., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Milhiet, P.E. (2008). Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J Cell Biol* *182*, 765–776.
- Gordón-Alonso, M., Sala-Valdés, M., Rocha-Perugini, V., Pérez-Hernández, D., López-Martín, S., Ursa, A., Alvarez, S., Kolesnikova, T.V., Vázquez, J., Sánchez-Madrid, F., et al. (2012). EW1-2 association with α -actinin regulates T cell immune synapses and HIV viral infection. *J. Immunol.* *189*, 689–700.
- Grigorov, B., Attuil-Audenis, V., Perugi, F., Nedelec, M., Watson, S., Pique, C., Darlix, J.-L., Conjeaud, H., and Muriaux, D. (2009). A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* *6*, 28.
- Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., et al. (2008). CD81 and Claudin 1 Coreceptor Association: Role in Hepatitis C Virus Entry. *J. Virol.* *82*, 5007–5020.
- Hemler, M.E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* *19*, 397–422.
- Hemler, M.E. (2008). Targeting of tetraspanin proteins — potential benefits and strategies. *Nat Rev Drug Discov* *7*, 747–758.
- Hogue, I.B., Grover, J.R., Soheilian, F., Nagashima, K., and Ono, A. (2011). Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J. Virol.* *85*, 9749–9766.
- Huang, S.F., Yuan, S.C., Dong, M.L., Su, J., Yu, C.L., Shen, Y., Xie, X.J., Yu, Y.H., Yu, X.S., Chen, S.W., et al. (2005). The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics* *86*, 674–684.
- Jolly, C., and Sattentau, Q.J. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J. Virol.* *81*, 7873–7884.
- Kovalenko, O.V., Metcalf, D.G., DeGrado, W.F., and Hemler, M.E. (2005). Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Struct Biol* *5*, 11.
- Kovalenko, O.V., Yang, X.H., and Hemler, M.E. (2007). A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Mol. Cell Proteomics* *6*, 1855–1867.

- Krementsov, D.N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N.H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P.E., and Thali, M. (2010). HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic* *11*, 1401–1414.
- Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R.S., Kondo, J., and Fujiwara, T. (2005). Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: High-Speed Single-Molecule Tracking of Membrane Molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* *34*, 351–378.
- Lagaudriere-Gesbert, C., Le Naour, F., Lebel-Binay, S., Billard, M., Lemichez, E., Boquet, P., Boucheix, C., Conjeaud, H., and Rubinstein, E. (1997). Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: Only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cellular Immunology* *182*, 105–112.
- Marion, S., Hoffmann, E., Holzer, D., Le Clairche, C., Martin, M., Sachse, M., Ganeva, I., Mangeat, P., and Griffiths, G. (2011). Ezrin promotes actin assembly at the phagosome membrane and regulates phago-lysosomal fusion. *Traffic* *12*, 421–437.
- Meredith, L.W., Wilson, G.K., Fletcher, N.F., and McKeating, J.A. (2012). Hepatitis C virus entry: beyond receptors. *Rev. Med. Virol.* *22*, 182–193.
- Montpellier, C., Tews, B.A., Poitrimole, J., Rocha-Perugini, V., D'Arienzo, V., Potel, J., Zhang, X.A., Rubinstein, E., Dubuisson, J., and Cocquerel, L. (2011). Interacting regions of CD81 and two of its partners, EWI-2 and EWI-2wint, and their effect on hepatitis C virus infection. *The Journal of Biological Chemistry* *286*, 13954–13965.
- Le Naour, F., Andre, M., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2006). Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics* *6*, 6447–6454.
- Nydegger, S. (2006). Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *The Journal of Cell Biology* *173*, 795–807.
- Ono, A. (2010). Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* *102*, 335–350.
- Ono, A., and Freed, E.O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 13925–13930.
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science (New York, NY)* *282*, 938–941.
- Saffman, P.G., and Delbruck, M. (1975). Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *72*, 3111–3113.
- Sala-Valdes, M. (2006). EWI-2 and EWI-F Link the Tetraspanin Web to the Actin Cytoskeleton through Their Direct Association with Ezrin-Radixin-Moesin Proteins. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 19665–19675.
- Sato, K., Aoki, J., Misawa, N., Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y., and Koyanagi, Y. (2008). Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* *82*, 1021–1033.
- Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C., and Conjeaud, H. (2001). Structure of the tetraspanin main extracellular domain - A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 40055–40064.
- Seigneuret, M., and Garnier-Suillerot, A. (2003). A structural model for the open conformation of the mdr1 P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure. *J Biol Chem* *278*, 30115–30124.
- Shoham, T., Rajapaksa, R., Kuo, C.-C., Haimovich, J., and Levy, S. (2006). Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 1373–1385.
- Van Spriel, A.B., and Figdor, C.G. (2009). The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes and Infection* *1–7*.
- Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V., and Hemler, M.E. (2001a). EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem* *276*, 40545–54.
- Stipp, C.S., Orlicky, D., and Hemler, M.E. (2001b). FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 4853–4862.
- Suzuki, K.G., Fujiwara, T.K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., and Kusumi, A. (2007). GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and Galpha for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1. *J Cell Biol* *177*, 717–730.
- Thali, M. (2010). The Roles of Tetraspanins in HIV-1 Replication. *Curr Top Microbiol Immunol* *339*, 85–102.
- Thali, M. (2011). Tetraspanin functions during HIV-1 and influenza virus replication. *Biochemical Society Transactions* *39*, 529–531.
- Weng, J., Kremmentsov, D.N., Khurana, S., Roy, N.H., and Thali, M. (2009). Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in human immunodeficiency virus type 1-producing cells. *J Virol* *83*, 7467–7474.
- Xu, H., Lee, S.-J., Suzuki, E., Dugan, K.D., Stoddard, A., Li, H.-S., Chodosh, L.A., and Montell, C. (2004). A lysosomal tetraspanin associated with retinal degeneration identified via a genome-wide screen. *EMBO J.* *23*, 811–822.
- Yang, X.H., Mirchev, R., Deng, X., Yacono, P., Yang, H.L., Golan, D.E., and Hemler, M.E. (2012). CD151 restricts the $\alpha 6$ integrin diffusion mode. *J. Cell. Sci.* *125*, 1478–1487.

FIGURES

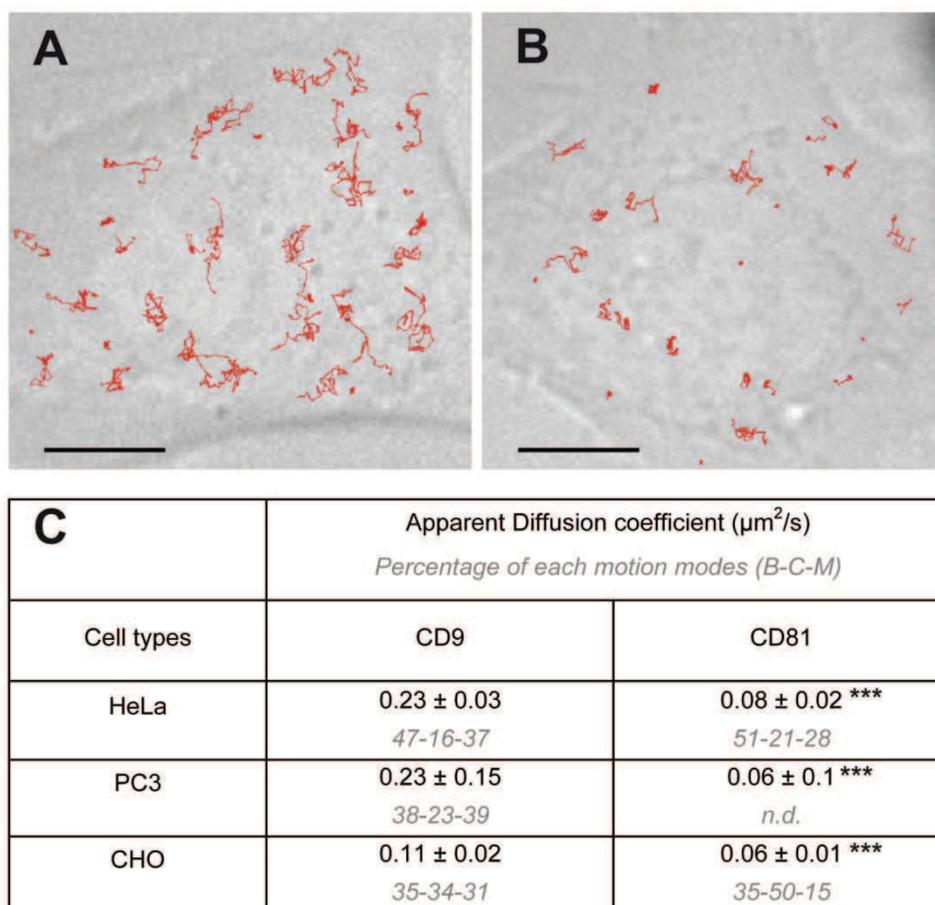


Figure 1 – Differential dynamics of CD9 and CD81

A and B) DIC micrograph of HeLa cells superimposed with several representative single molecule trajectories (red lines) obtained after tracking Atto647N-conjugated Fab fragments of anti- CD9 (A) or anti-CD81 (B) individual molecules. Bar represents 10 μm .

C) Table of apparent diffusion coefficient and motion modes (grey) in HeLa, PC3 and CHO cells (B, Brownian; C, confined; M, mixed). *** indicates a p values below 0.001 for comparison of the apparent diffusion coefficient for CD81 as compared to CD9 in each cell type as determined by the Mann-Whitney U test.

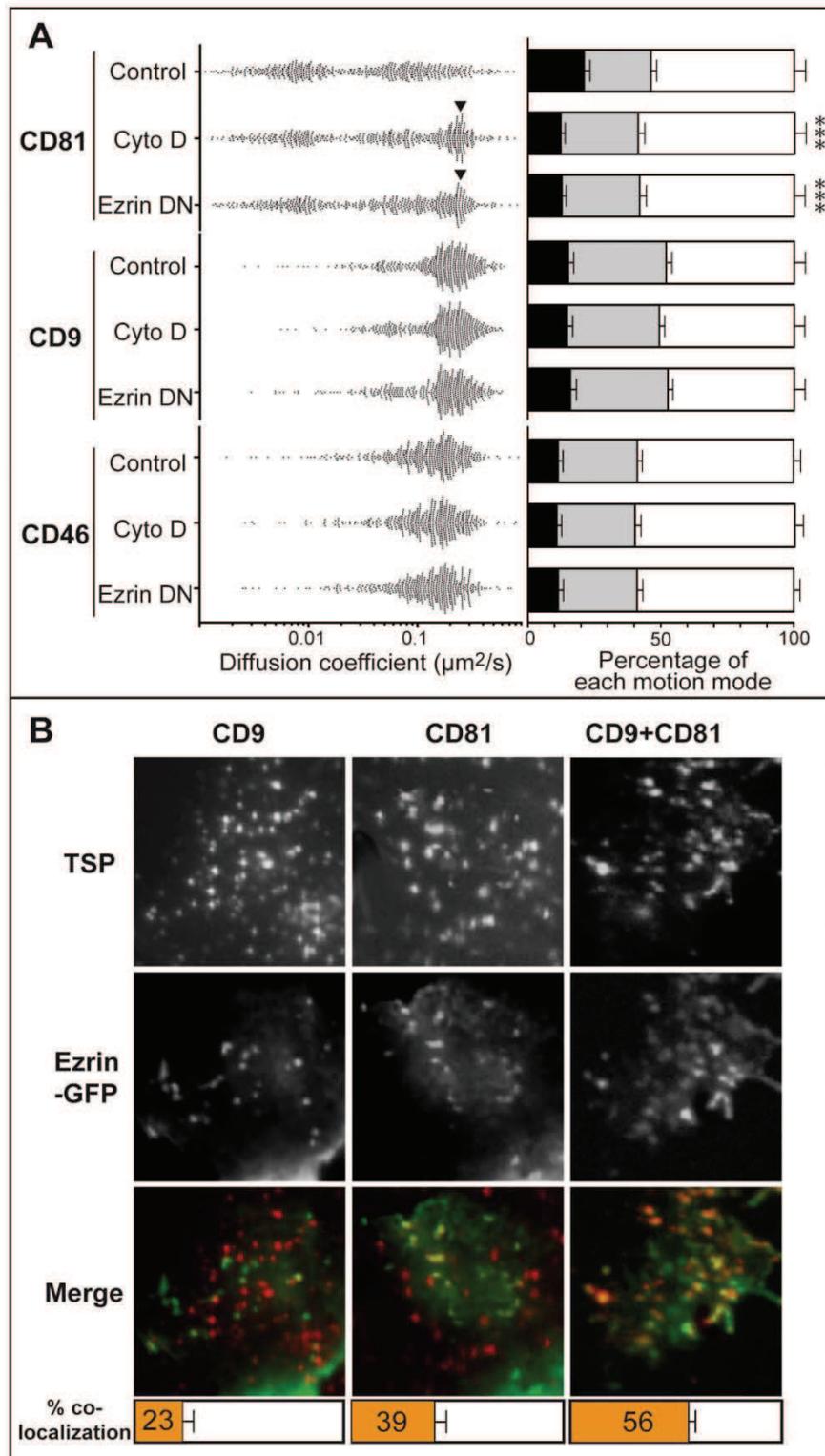


Figure 2 – Influence of cytoskeleton on CD9, CD81 and CD46 membrane behavior in HeLa cells

Figure 2 – Influence of cytoskeleton on CD9, CD81 and CD46 membrane behavior in HeLa cells

A) Single molecule analysis of CD81, CD9 and CD46. The left panel represents scatter plots of the apparent diffusion of 500 trajectories for each protein in control cells, in cells treated with cytochalasin D (Cyto D) or in cells expressing a mutated and inactive form of ezrin (ezrin-DN). The black arrowhead indicates a new population of CD81 trajectories appearing after actin remodeling. In the right panel are shown histograms representing the percentage of each diffusion mode (Brownian in white, Mixed in grey, and Confined in black) relative to the total number of trajectories for each protein. Error bars correspond to S.E.M. *** indicate a p values below 0.001 for comparison of the diffusion modes percentage in Cyto D or Ezrin DN cells versus control cells as determined by the Mann-Whitney U test.

B) Co-localization of tetraspanins (TSP) with GFP-tagged ezrin . The first row of 25 μm micrographs represents labeling of TSP (CD9, CD81 or the 2 proteins simultaneously labeled) with Atto647N-conjugated Fab fragments of anti- CD81, anti-CD9 or anti-CD46. The percentage of co-localization mentioned in the orange box in the histogram is defined as the number of yellow pixels over the total number of yellow and red pixels.

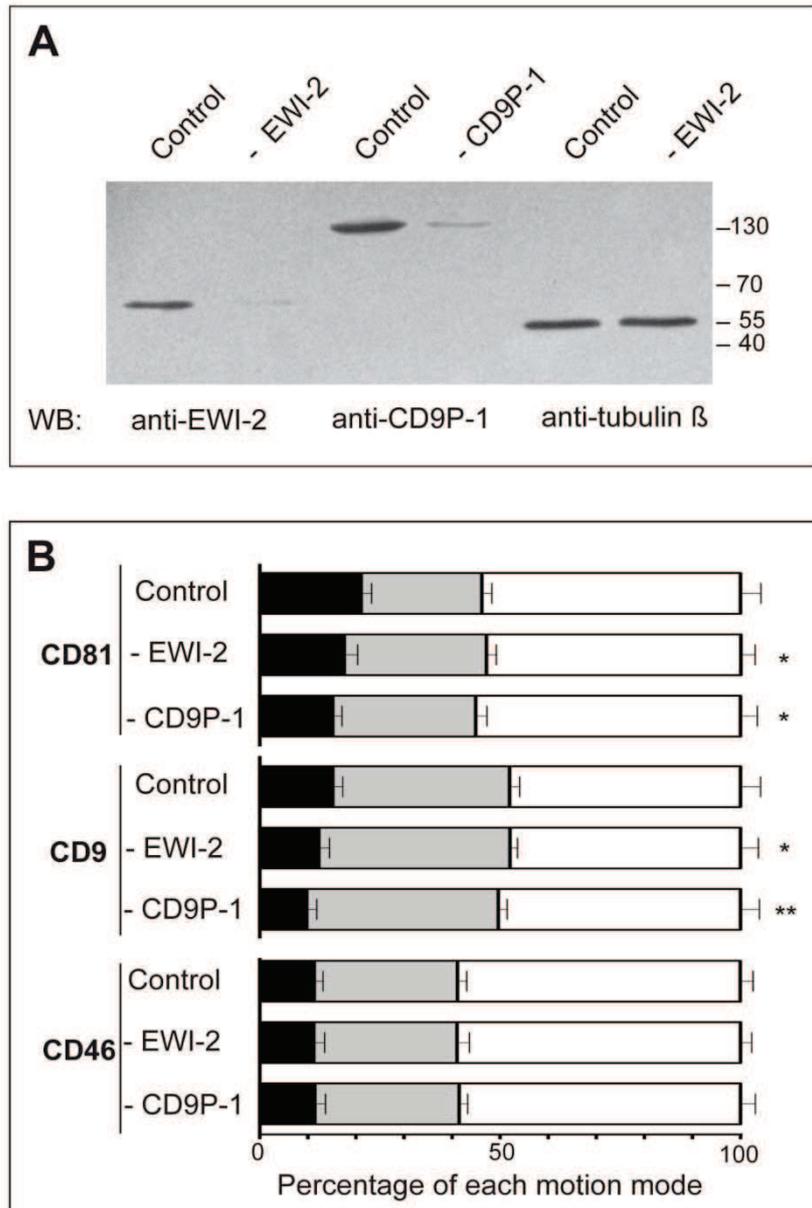


Figure 3 – Depletion of EWI2 or CD9P-1 in HeLa cells using siRNA experiments

A) Western blot analysis of EWI-2, CD9P-1 or tubulin β (used as a control) in control HeLa cells or cells depleted of the molecule by siRNA transfection. The MW markers are indicated on the right.

B) Histograms represent the percentage of each diffusion mode (Brownian in white, Mixed in grey, and Confined in black) relative to the total number of trajectories for each protein. Error bars correspond to S.E.M. *, **, and, *** respectively indicate a p values below 0.1, 0.01 and 0.001 for comparison of the diffusion modes percentage in cells transfected with si RNA versus control cells as determined by the Mann-Whitney U test.

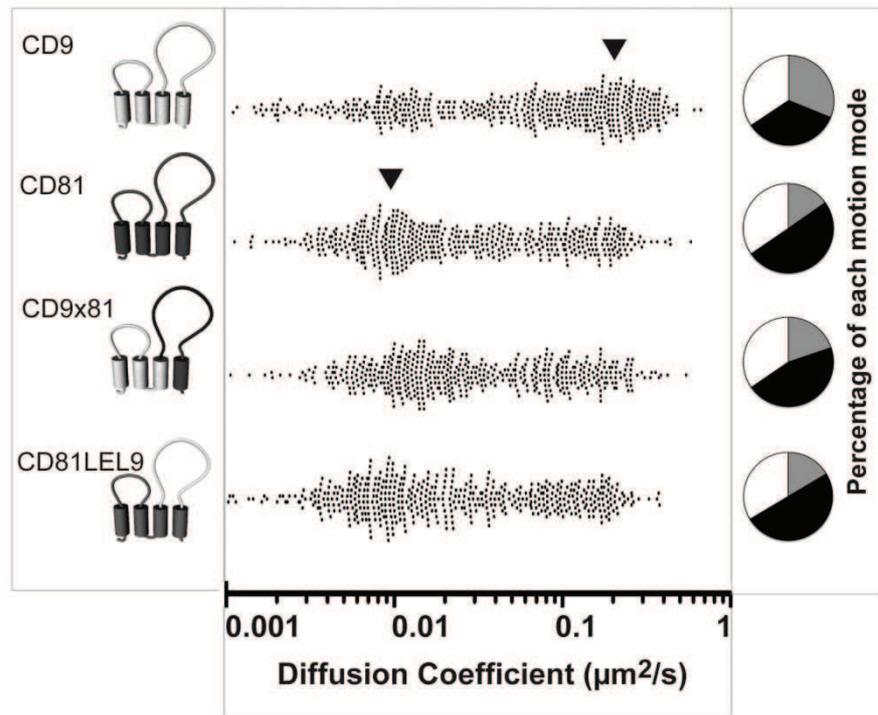


Figure 4 – Membrane behavior of WT CD9 and CD81 and CD9/CD81 chimeric proteins in CHO cells

Reciprocal CD9/CD81 chimeric proteins are schematized in the left panel. CD9 is in grey and CD81 in black. Cylinders represent transmembrane domains. The middle panel shows the scatter plot of the apparent diffusion of 500 trajectories for each protein. The black arrowhead indicates the main population for CD9 and CD81. The right panel shows the percentage of the three main diffusions modes of each protein relative to the total number of trajectories (black, confined; white, Brownian; grey, mixed).

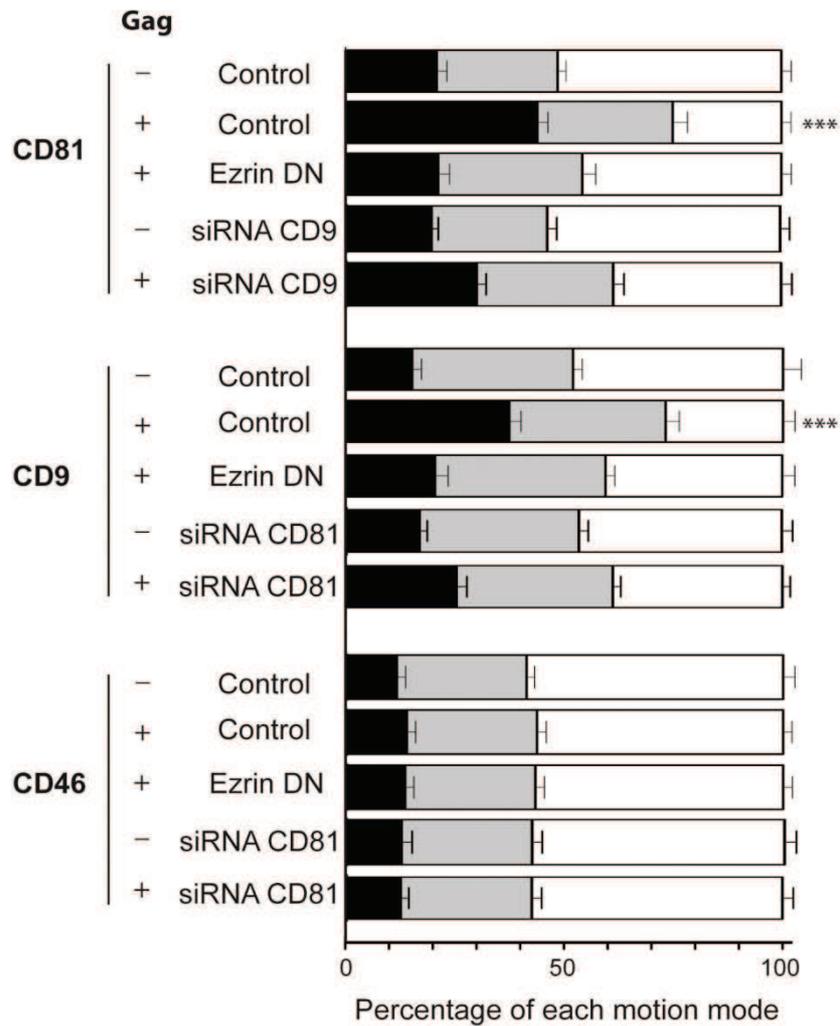


Figure 5 – Membrane behavior of CD81, CD81 and CD46 in the context of Gag assembly

Cells, expressing or not Gag, were transfected with a cDNA coding an inactive form of ezrin or with siRNA directed against CD81 or CD9. Histograms represent the percentage of each diffusion mode (Brownian in white, Mixed in grey, and Confined in black) relative to the total number of trajectories for each protein. Error bars correspond to S.E.M. *, **, and, *** respectively indicate a p values below 0.1, 0.01 and 0.001 for comparison of the diffusion modes percentage in cells transfected with si RNA versus control cells as determined by the Mann-Whitney U test.

Supplemental Materials

Movie S1 – Differential dynamic behavior of CD9 and CD81 in PC3 cells

CD9 (left) or CD81 (right) were labeled with Atto-647N-conjugated Fab fragments (recorded at 100ms/frame) in PC3 cells. The difference in membrane dynamics can be easily observed. The two movies are 2.5 times accelerated. The pixel size corresponds to 160 nm.

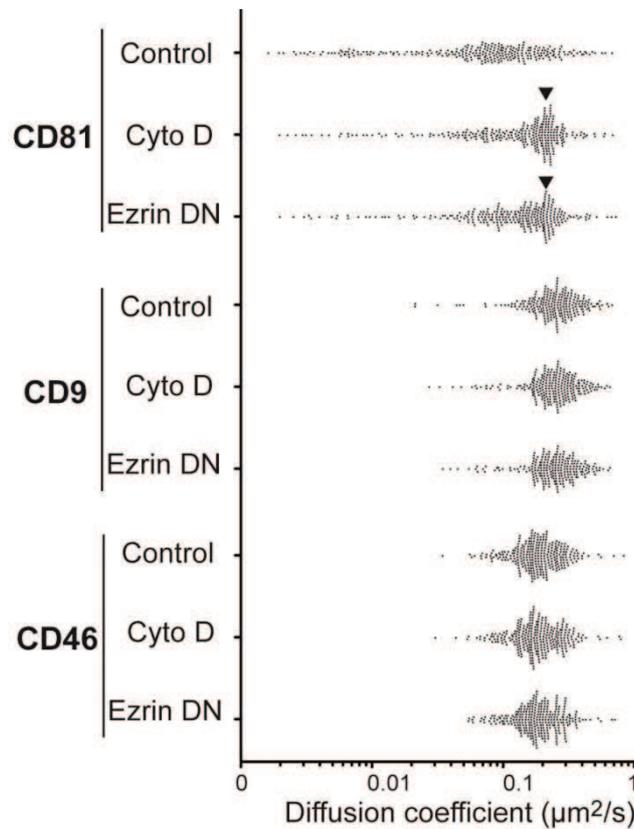


Figure S1 – Influence of cytoskeleton on CD9, CD81 and CD46 membrane behavior in HeLa cells

Scatter plots of the apparent diffusion of Brownian trajectories for each protein in control cells, in cells treated with cytochalasin D (Cyto D) or in cells expressing a mutated and inactive form of ezrin (ezrin-DN). The black arrowhead indicates a new population of CD81 Brownian trajectories appearing after actin remodeling.

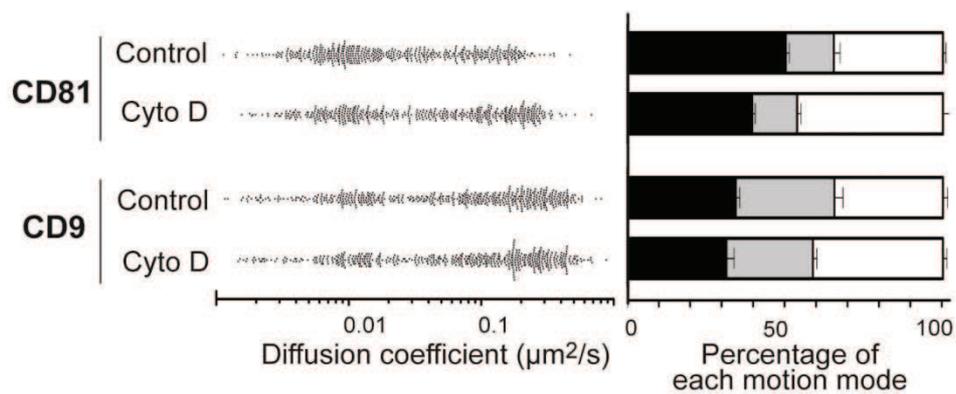


Figure S2 – Influence of cytoskeleton on CD81 and CD9 membrane behavior in CHO cells

Single molecule analysis of CD81 and CD9. The left panel represents scatter plots of the apparent diffusion of 500 trajectories for each protein in control cells or in cells treated with cytochalasin D (Cyto D). In the right panel are shown histograms representing the percentage of each diffusion mode (Brownian in white, Mixed in grey, and Confined in black) relative to the total number of trajectories for each protein. Error bars correspond to S.E.M.

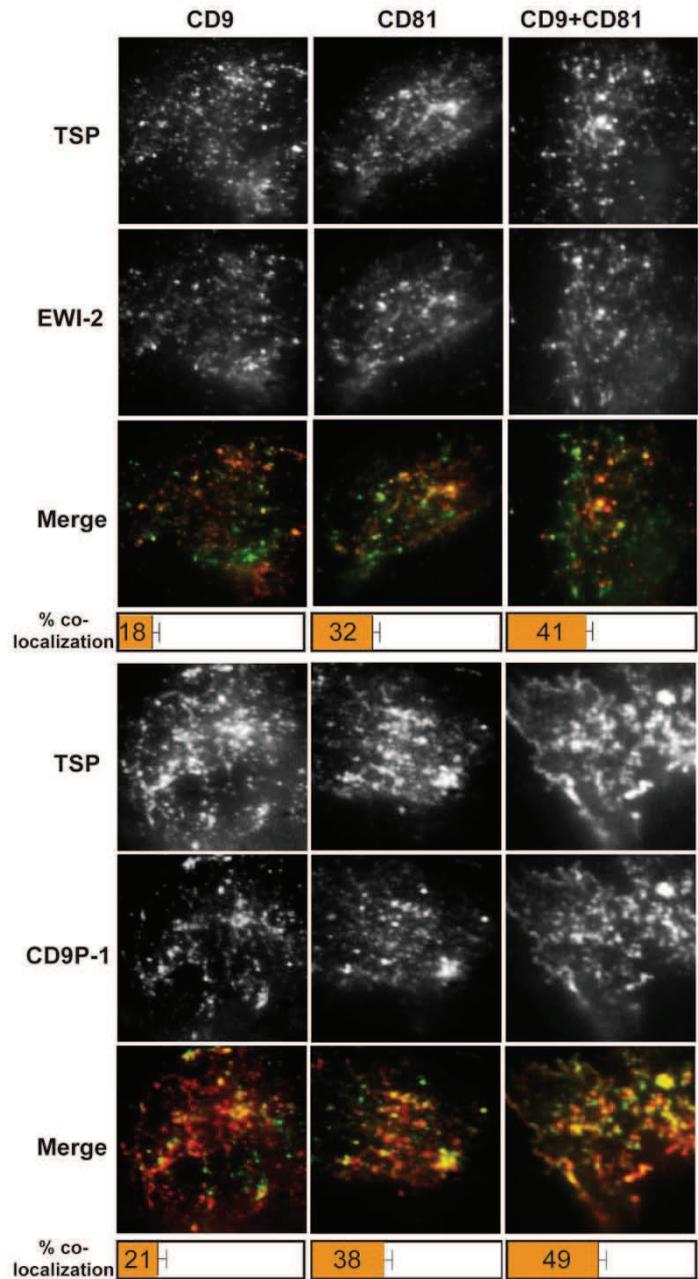


Figure S3 – Co-localization of the tetraspanins CD9 and CD81 with EWI-2 or CD9P-1 using ensemble labeling of HeLa cells

Co-localization of tetraspanins (TSP) with EWI-2 (upper panel) or CD9P-1 (lower panel). The first row of 25 μm micrographs represents labeling of TSP (CD9, CD81 or the 2 proteins simultaneously labeled) with Atto647N-conjugated Fab fragments of anti- CD81 or anti-CD9. The second row represents EWI-2 or CD9P-1 labeled Cy3b-labeled Fab fragments. The third row corresponds to the merge image. The percentage of co-localization mentioned in the orange box in the histogram is defined as the number of yellow pixels over the total number of yellow and red pixels.

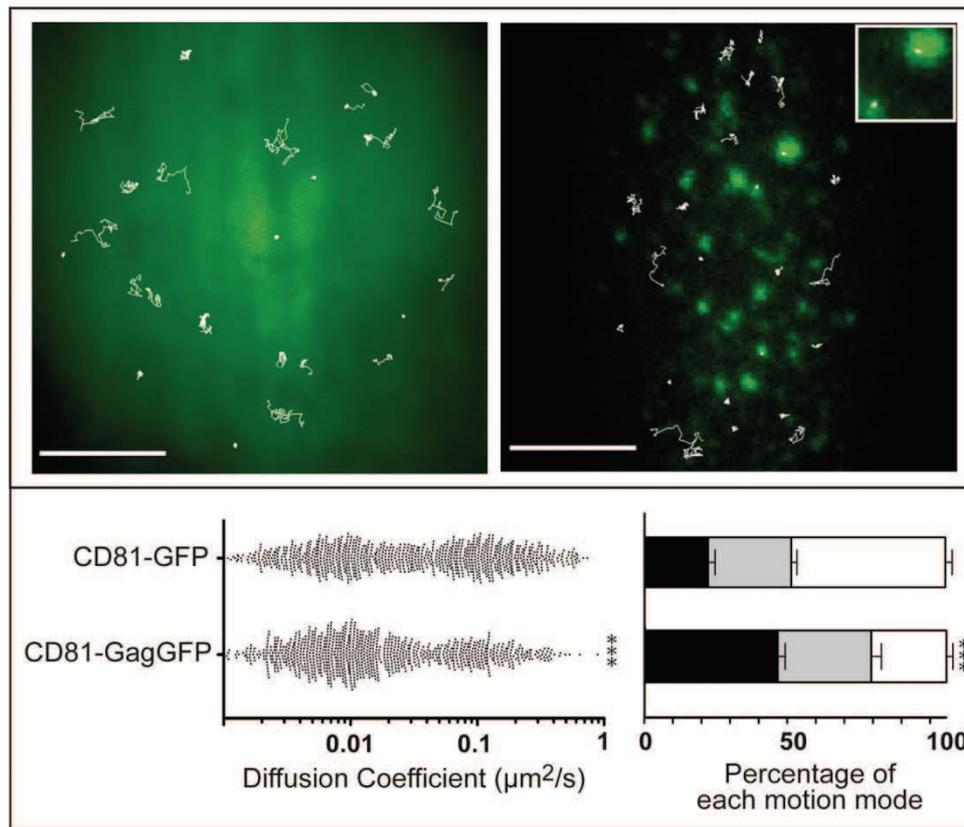


Figure S4 - Single molecule analysis of CD81 behavior in the presence or absence of Gag.

Upper panel: micrographs shows superimposition of GFP (left) and Gag-GFP (right) fluorescence signal with several representative single molecule trajectories (white lines) obtained after tracking Atto647N-conjugated Fab fragments of anti-CD81 antibodies in HeLa cells. Inset in the right micrograph corresponds to a zoom where confinement can be observed. Scale bar represents 10 μm .

Lower panel: scatter plots of the apparent diffusion of 500 trajectories for CD81 in control cells or in cells expressing Gag-GFP and histograms representing the percentage of each diffusion mode (Brownian in white, Mixed in grey, and Confined in black) relative to the total number of trajectories for each protein. Error bars correspond to S.E.M. *** indicate a p values below 0.001 for comparison of the CD81 apparent diffusion coefficient or of the diffusion modes percentage in GagGFP-expressing cells versus GFP-expressing control cells as determined by the Mann-Whitney U test.

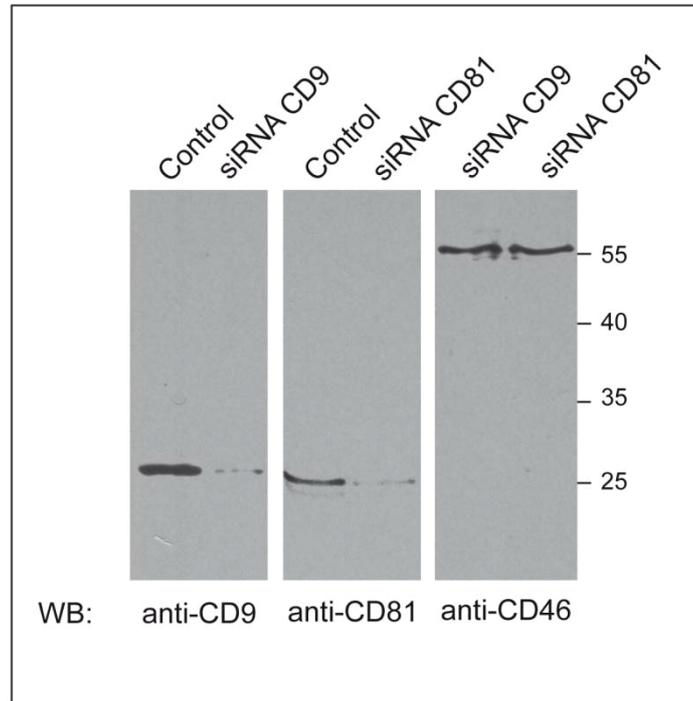


Figure S5 – Western blot analysis of CD9 and CD81 expression in HeLa cells in siRNA experiments

Western blot analysis of CD9, CD81 or CD46 (as a control) in control HeLa cells or cells depleted of CD9 or CD81 by siRNA transfection. The MW markers are indicated on the right.

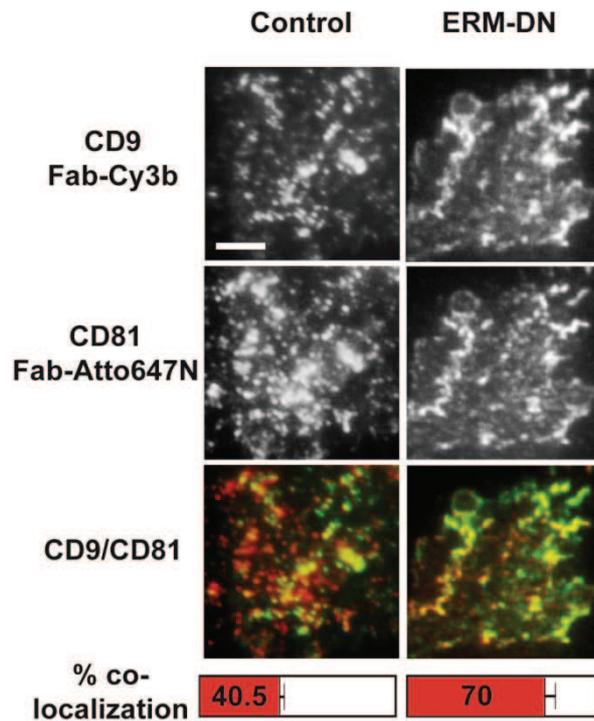


Figure S6 – CD9/CD81 co-localization in HeLa cells

Co-localization of CD9 and CD81 in control (left panel) or in cells expressing an inactive mutant of ezrin (right panel). The first row of 25 μm micrographs represents labeling of CD9 labeled Cy3b-labeled Fab fragments. The second row represents labeling of CD81 labeled with Atto647N-conjugated Fab fragments. The third row corresponds to the merge image. The percentage of co-localization mentioned in the orange box in the histogram is defined as the number of yellow pixels over the total number of yellow and red pixels.

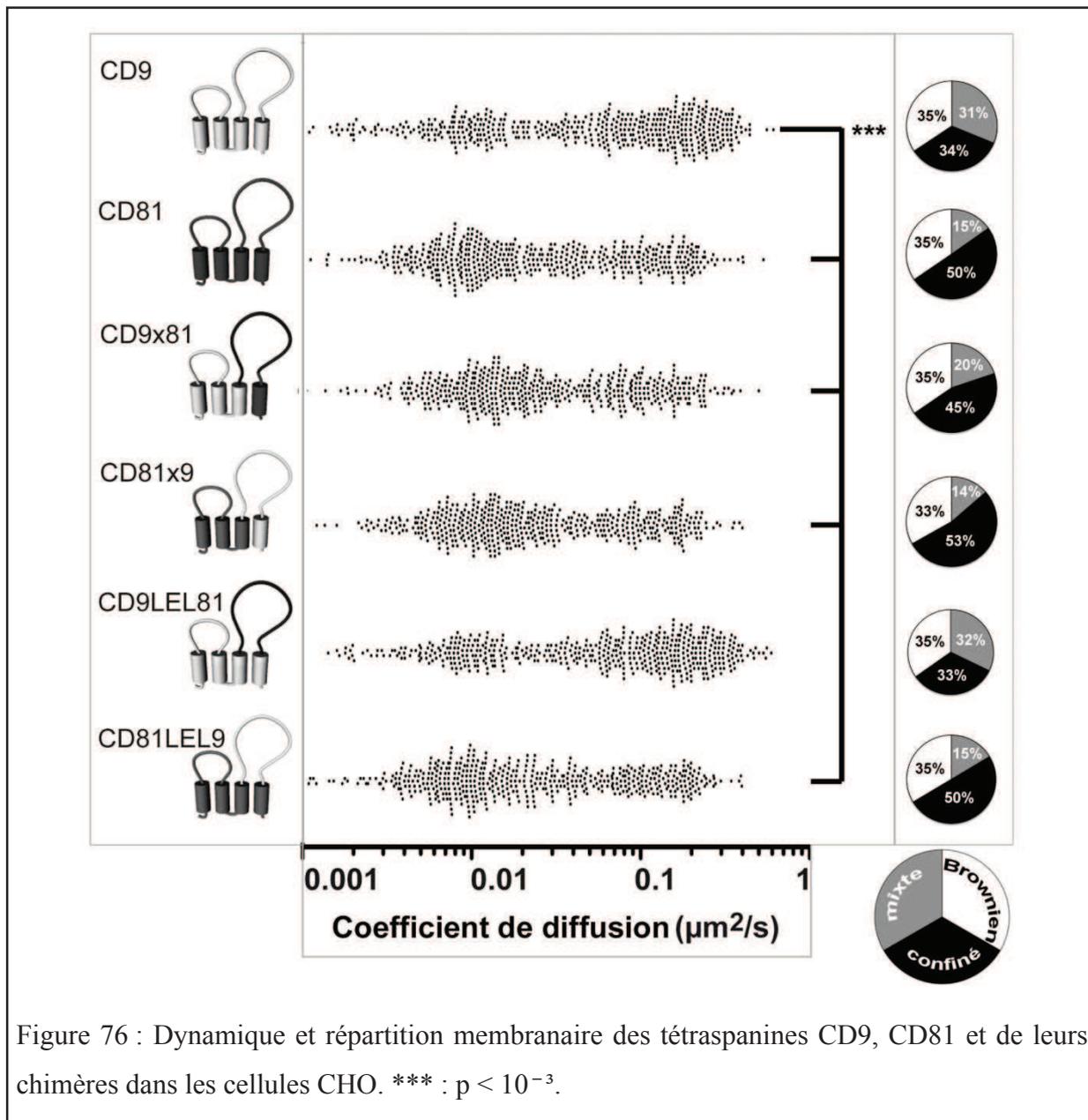
Tetraspanin	Ø confinement area		
	CD9	CD81	CD9x81
Pure confinement	216 \pm 68	195 \pm 48	200 \pm 47
Transient confinement	273 \pm 89	214 \pm 47	227 \pm 60

Table S1 – Diameter of confinement areas in WT and chimeric proteins

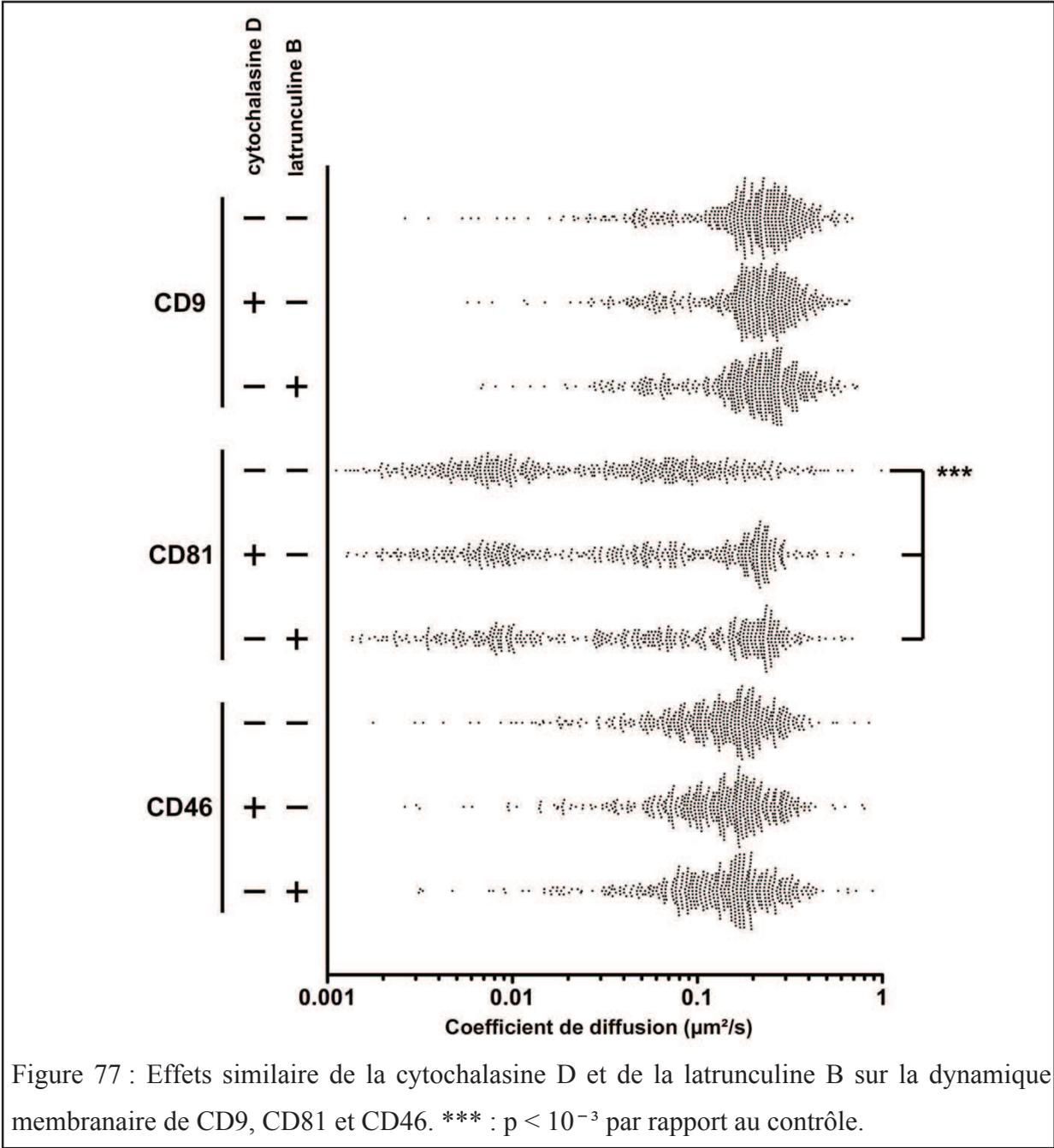
The table indicates the diameter of confinement for pure confined and transiently-confined (also named mixed) trajectories in CHO cells for CD9, CD81 or the reciprocal chimeric proteins. Mean values \pm s.e.m. are indicated.

II) 3. Résultats complémentaires

Comme nous l'avons décrit dans cet article, CD81 est plus confiné et présente une dynamique membranaire plus lente que CD9. En utilisant différentes chimères de ces tétraspanines, nous avons montré l'implication dans la faible mobilité de CD81 de son quatrième domaine transmembranaire et/ou de sa partie C-terminale cytoplasmique et non de la large boucle extracellulaire. De façon surprenante, nous révélons ici qu'il existe aussi des éléments suffisants pour produire le même comportement membranaire dans la portion N-terminale (entre les acides aminés 1 et 118) de CD81 (figure 76).



Dans le but de vérifier si les données que nous avons obtenues avec le traitement à la cytochalasine D étaient effectivement liées à la désorganisation du cytosquelette d'actine, nous avons utilisé en parallèle un traitement à la latrunculine B, qui produit des résultats similaires (figure 77).



Afin de contrôler que les résultats apportés par l'utilisation du dominant négatif de l'eitrine étaient effectivement consécutifs à une rupture de liens entre l'actine et la membrane plasmique via les protéines ERM, nous avons également testé l'effet d'un dominant négatif de la moésine. De façon intéressante, les données obtenues sont similaires, ce qui suggère d'une part que ce processus est spécifique des protéines homologues de l'eitrine et d'autre part que l'action de ces protéines est coopérative (figure 78).

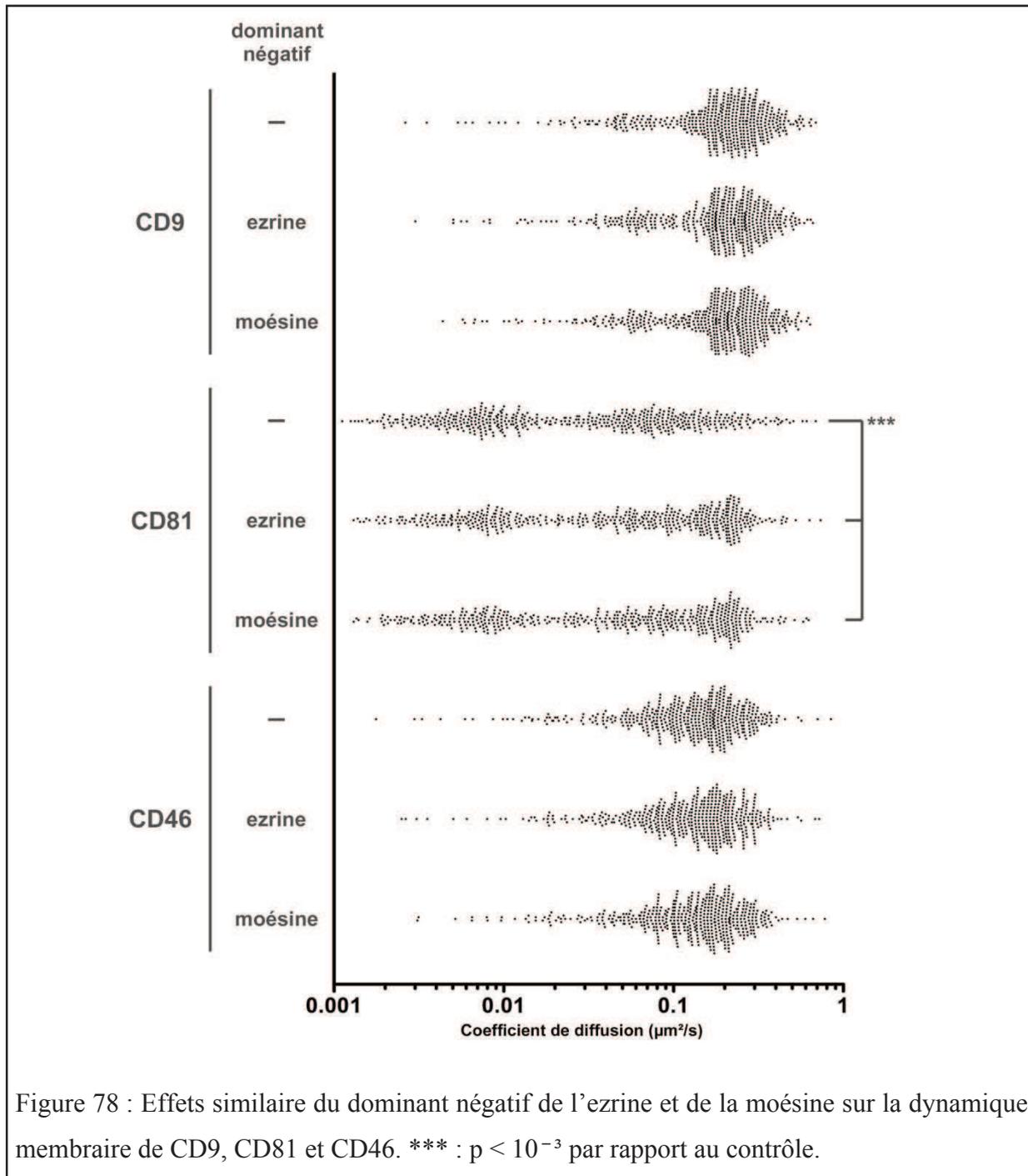


Figure 78 : Effets similaires du dominant négatif de l'eitrine et de la moésine sur la dynamique membranaire de CD9, CD81 et CD46. *** : $p < 10^{-3}$ par rapport au contrôle.

Nous avons aussi voulu évaluer l'effet de la déstabilisation du réseau de microtubule sur la dynamique de ces protéines à la membrane plasmique (figure 79). Nos résultats suggèrent que même à de faibles concentrations en nocodazole (0,5 μ M), la mobilité de CD9, CD81, mais aussi de CD46 sont modifiées.

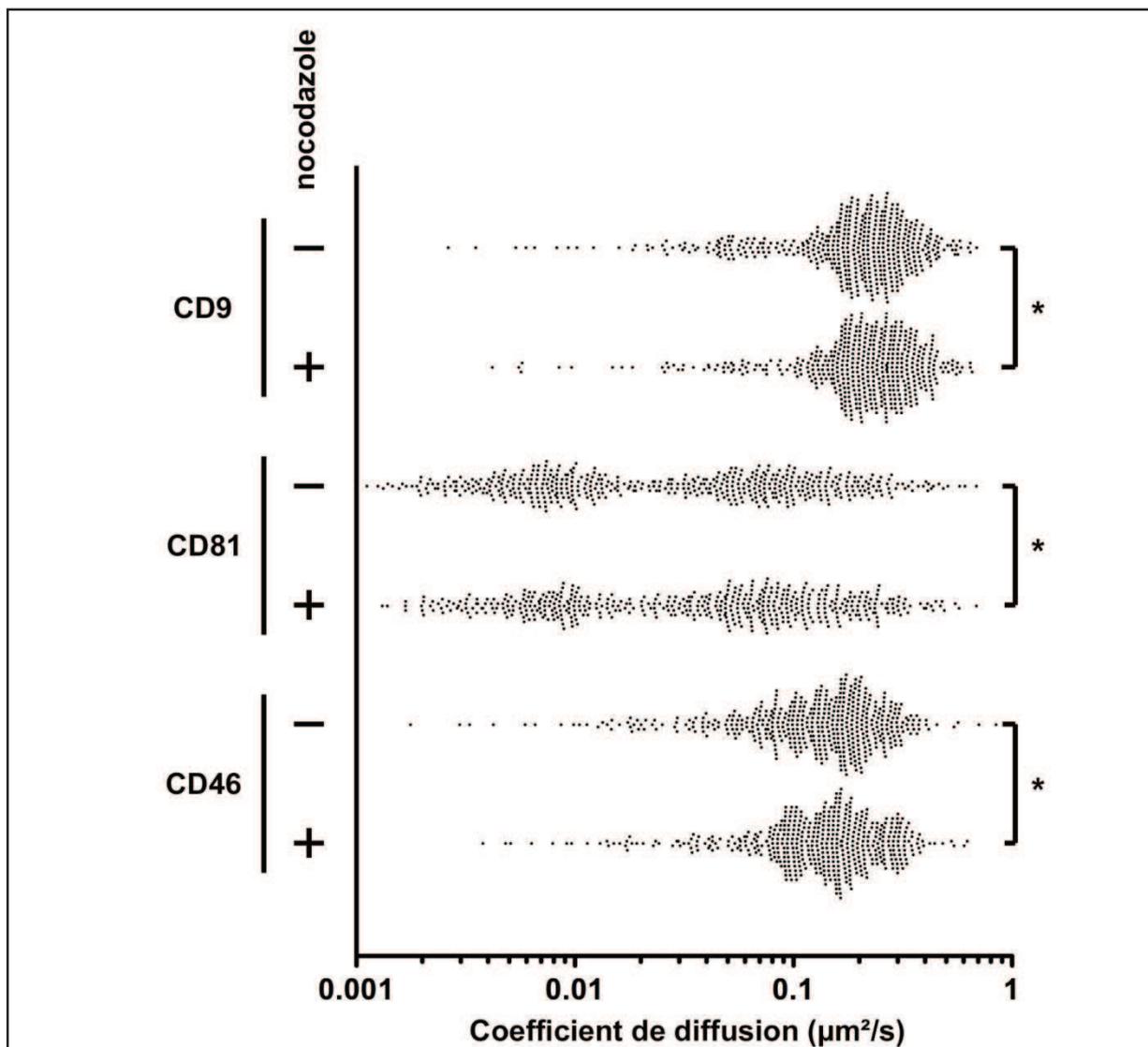


Figure 79 : Effet non spécifique du nocodazole sur la dynamique membranaire de CD9, CD81 et CD46. * : $10^{-2} < p < 10^{-1}$ par rapport au contrôle.

Une analyse plus fine des résultats révèle une diminution générale du nombre de mouvements confinés, sans pour autant modifier la distribution des coefficients de diffusion au sein des zones de confinement (figure 80).

Ces données mettent en lumière d'une part le rôle (probablement indirect) des microtubules dans l'architecture de la cellule et confirment d'autre part le fait qu'au sein des zones enrichies en tétraspanines, la mobilité des protéines n'est pas influencée par le cytosquelette.

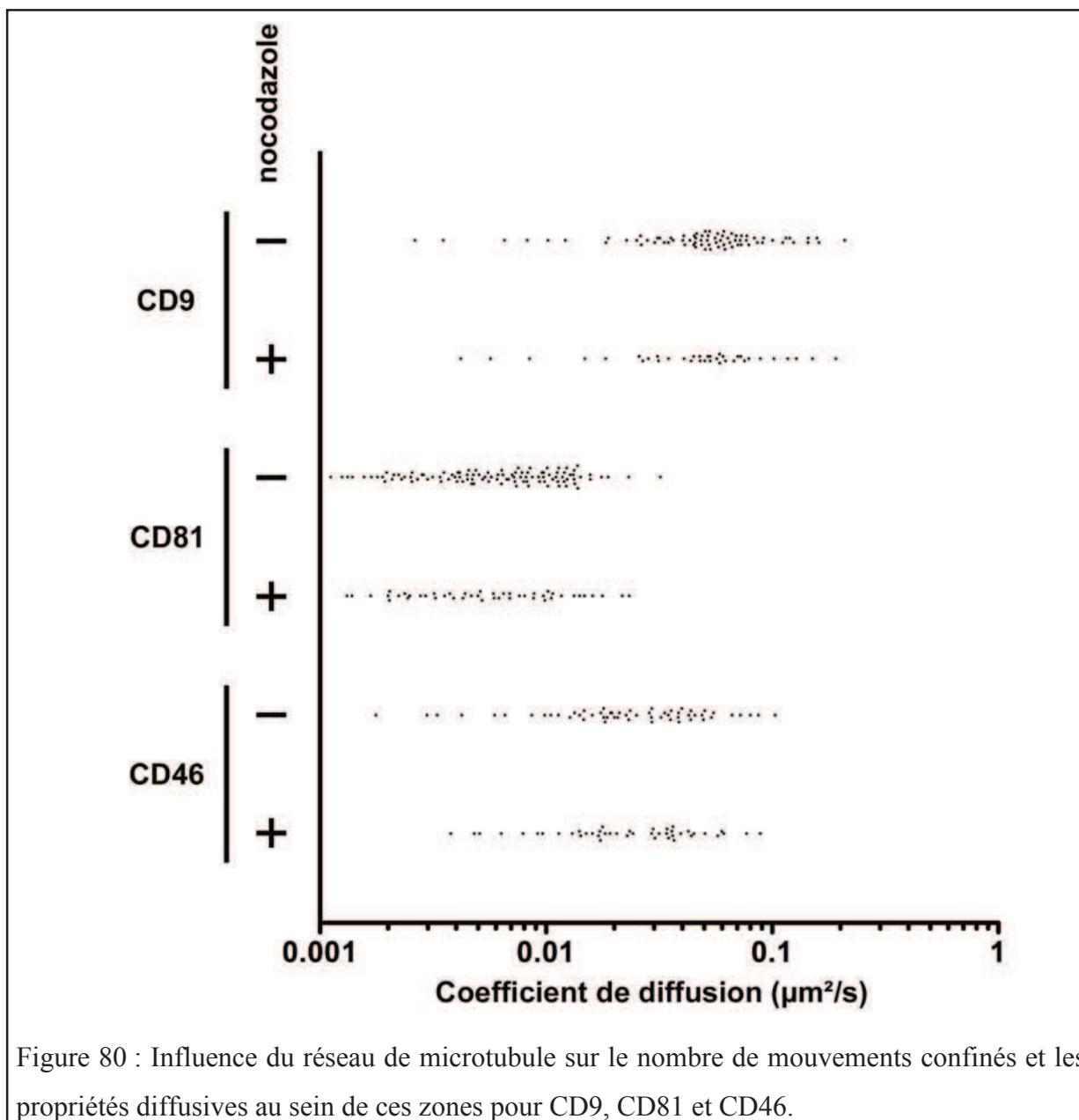
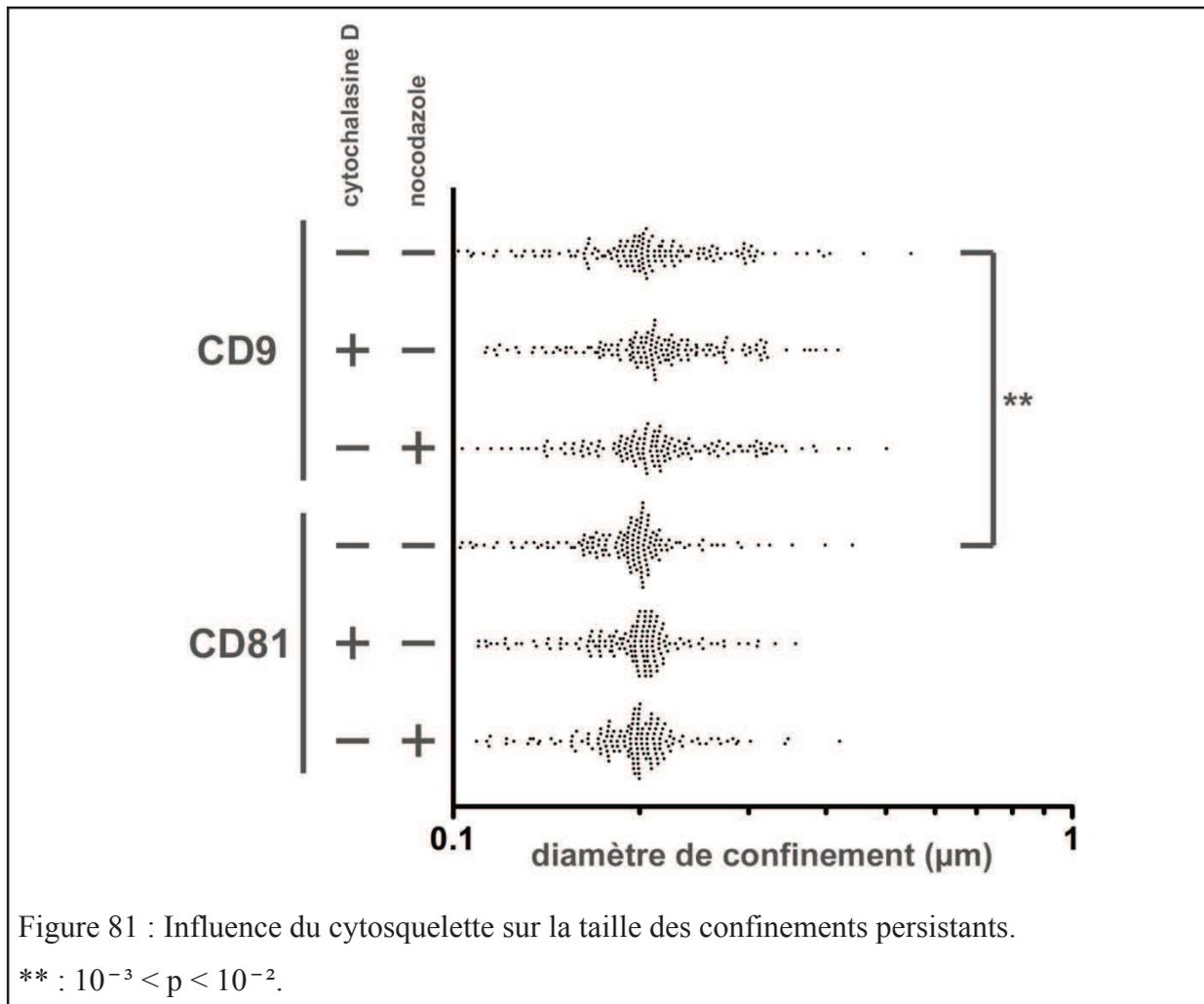
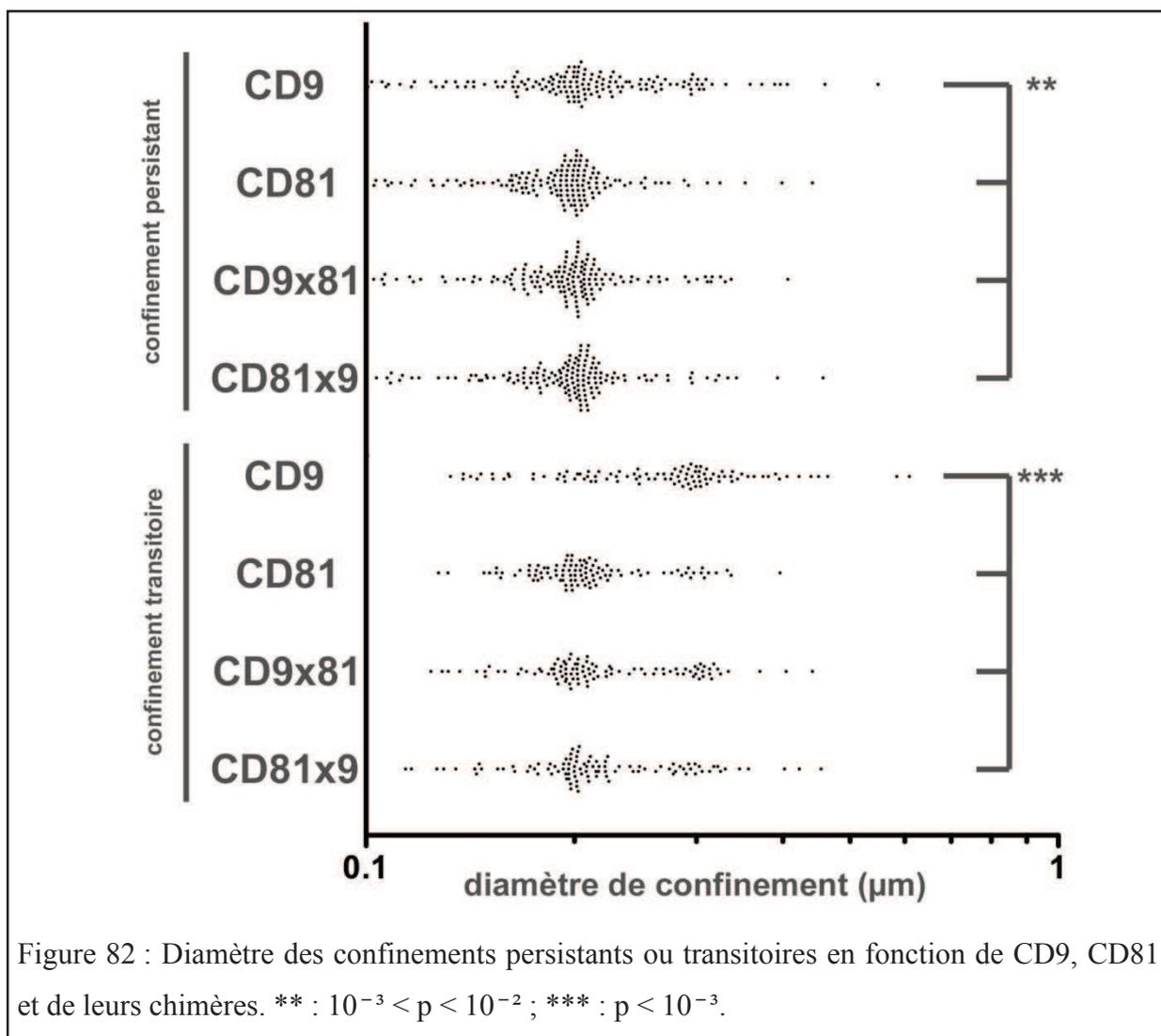


Figure 80 : Influence du réseau de microtubule sur le nombre de mouvements confinés et les propriétés diffusives au sein de ces zones pour CD9, CD81 et CD46.

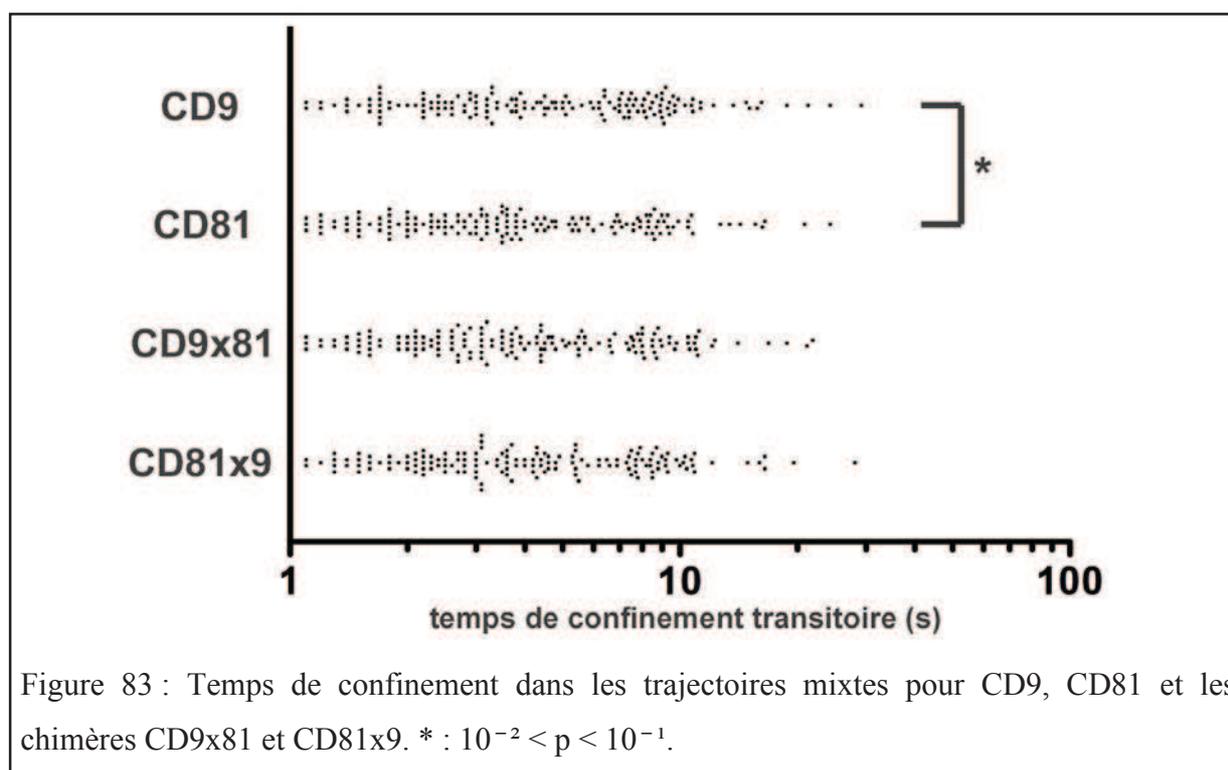
Par ailleurs, nous avons aussi évalué l'influence du traitement à la cytochalasine D ou au nocodazole sur le diamètre de résidence des trajectoires qui sont confinées durant tout le temps d'observation (figure 81). Nos résultats montrent tout d'abord que la dimension de ces régions n'est affectée ni par le réseau d'actine, ni par les microtubules. De plus, nos données mettent en évidence une différence significative entre la distribution des diamètres de confinement de CD9 et de CD81. D'une part ces expériences confirment l'indépendance des zones enrichies en tétraspanines vis-à-vis du cytosquelette et d'autre part elles renforcent l'idée selon laquelle les tétraspanines CD9 et CD81 ne sont pas séquestrées de la même façon au niveau de ces plateformes.



Nous nous sommes ensuite employés à vérifier si les dimensions des confinements persistants (trajectoires confinées durant toute l'analyse) ou transitoires (portions confinées des trajectoires mixtes) étaient similaires ou non. Parallèlement, afin de déterminer si l'une ou l'autre des parties de CD81 était responsable de cette séquestration plus restreinte en terme de surface par rapport à CD9, nous avons calculé le diamètre de confinement des chimères CD9x81 et CD81x9 (figure 82). Tout d'abord, nos résultats montrent que les confinements transitoires sont sensiblement moins restreints dans l'espace que les confinements permanents, en particulier pour CD9. Le même type d'observation avait été fait dans les cellules PC3²³². Nos données confirment que les chimères CD9x81 et CD81x9 se comportent de façon similaire à CD81 (et non à CD9) au niveau de ces confinements. Enfin, ces travaux suggèrent qu'il existe des zones de confinement de différentes tailles, en corrélation avec la nature des constituants et de leur temps de résidence.



Pour confirmer la précédente hypothèse, nous avons aussi extrait le temps de confinement pour chaque trajectoire mixte en fonction de la tétraspanine étudiée (figure 83). Bien que la distribution de ces temps soit assez large et mérite un échantillonnage plus important, il semble que le temps de confinement transitoire de CD9 soit sensiblement plus important que celui de CD81.



Dans l'optique d'éclaircir les mécanismes qui régissent la mobilité et la compartimentation différentielle des tétraspanines CD9 et CD81 à la membrane plasmique, nous avons choisi d'étudier la dynamique et la répartition membranaire de CD82, une tétraspanine qui partage certaines propriétés communes avec CD9 et/ou avec CD81. Tout d'abord, CD82 (ou KAI1) est un gène suppresseur de tumeur, tout comme CD9¹⁵⁶. En effet, CD82 régule négativement la mobilité cellulaire mais participe positivement à la polarisation des cellules, l'induction de l'apoptose et de la sénescence en réponse à certains stimuli⁴⁵³. Par ailleurs, cette tétraspanine est capable de former des zones enrichies à la membrane plasmique et intervient dans l'activation de l'EGFR²³¹. De façon remarquable, l'expression de CD9 dans les CHO conduit à l'association de CD82 avec EWI-F, partenaire primaire de CD9 et CD81¹²³. De plus, CD82 est aussi retrouvé dans l'enveloppe du VIH-1. Enfin, dans le cas particulier de l'activation des lymphocytes T, CD82 serait impliqué en coordination avec le réarrangement du cytosquelette d'actine^{454,455}.

Nos résultats font apparaître une répartition intermédiaire des coefficients de diffusion de CD82 par rapport à CD9 et CD81. D'ailleurs, le pourcentage de trajectoires totalement confinées est équivalent entre CD82 et CD81 alors que le pourcentage de confinements transitoires est similaire entre CD82 et CD9 (figure 84).

L'analyse détaillée de la distribution des différents types de trajectoires confirme la différence significative de la mobilité de CD82 par rapport à CD9 et CD81, quel que soit le type de mouvement. Cependant la moyenne des coefficients de diffusion de CD82 est plus proche de celle de CD9 que de CD81, pour tous les modes de diffusion (figure 85). L'ensemble de ces résultats suggère d'une part que la dynamique et la répartition membranaire de chacune de ces tétraspanines sont régulées par un certain nombre de mécanismes distincts et d'autre part que CD81 présente effectivement un comportement particulièrement lent par rapport aux autres tétraspanines étudiées.

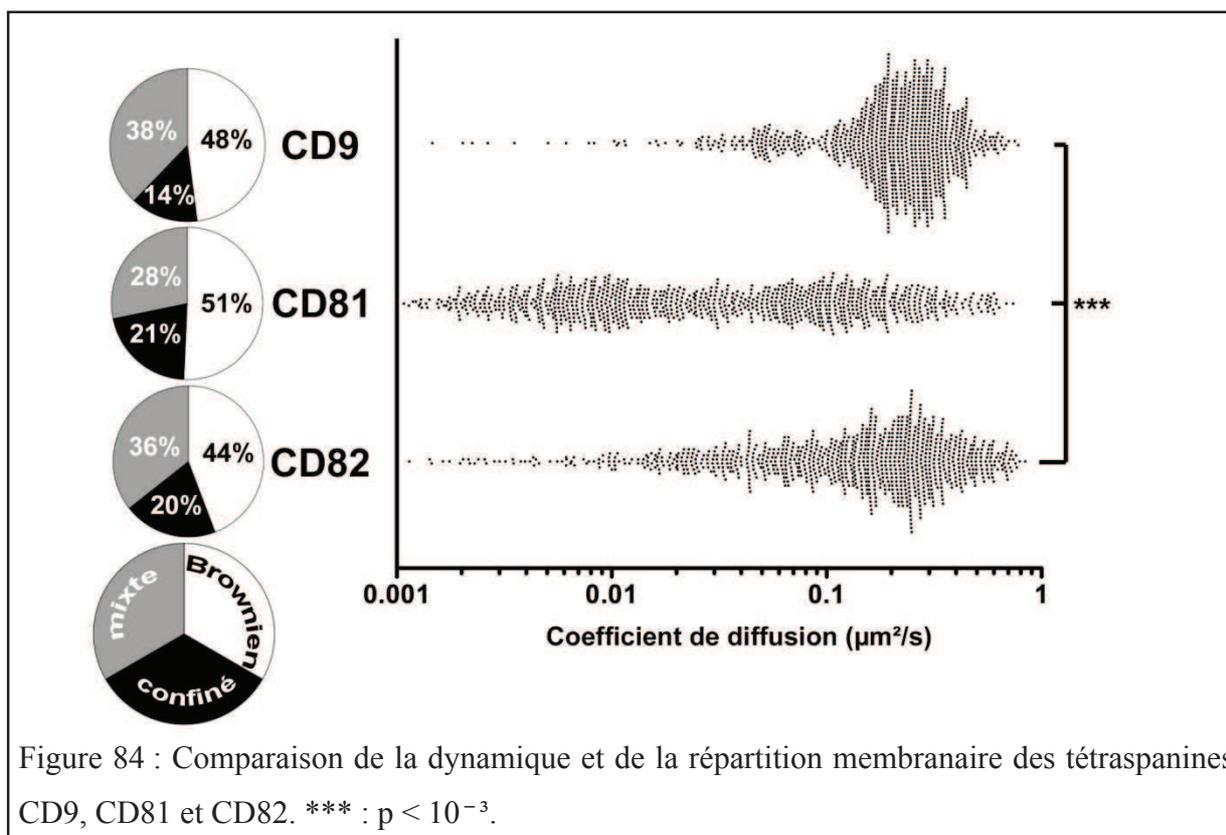


Figure 84 : Comparaison de la dynamique et de la répartition membranaire des tétraspanines CD9, CD81 et CD82. *** : $p < 10^{-3}$.

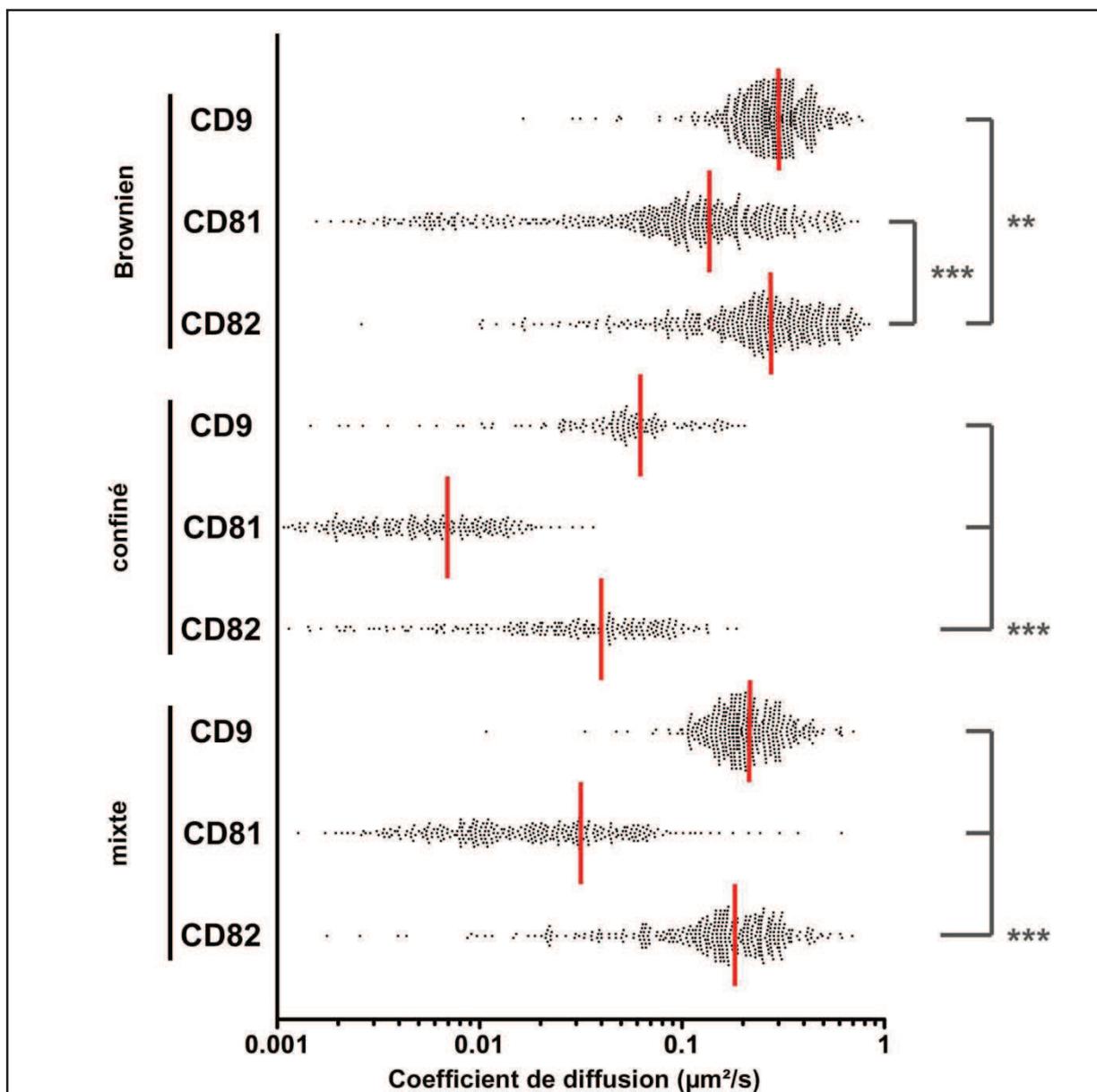


Figure 85 : Comparaison de la distribution des coefficients de diffusion de CD9, CD81 et CD82 en fonction du type de trajectoire. ** : $10^{-3} < p < 10^{-2}$; *** : $p < 10^{-3}$.

Les valeurs moyennes indiquées en rouge sont reportées dans le tableau suivant.

Mouvement	CD9	CD81	CD82
Brownien	0,30 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,15 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,29 $\mu\text{m}^2/\text{s}$
Confiné	0,06 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,01 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,04 $\mu\text{m}^2/\text{s}$
Mixte	0,22 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,03 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	0,18 $\mu\text{m}^2/\text{s}$

Plusieurs études ont mis en avant l'importance de la température dans l'organisation de la membrane plasmique et en particulier dans la dynamique et la répartition membranaire des protéines^{456,457,390}. Nos résultats montrent que la dynamique membranaire de CD9, CD81 et CD46 (dans une moindre mesure) est globalement restreinte lorsque la température est réduite de 37°C à 22°C (figure 86). En effet, l'augmentation du pourcentage de confinement est plus importante pour CD9 et CD81 que pour CD46 et la distribution des coefficients de diffusion des mouvements transitoires est altérée seulement pour ces tétraspanines (figure 87). Ceci suggère qu'à température ambiante, la coalescence de petites plateformes ou la formation de régions en phase gel touche plus spécifiquement les zones enrichies en tétraspanines CD9 et/ou CD81 que CD46. Enfin, il est important de noter ici que si le nombre de confinements augmente, le coefficient de diffusion des trajectoires confinées reste équivalent.

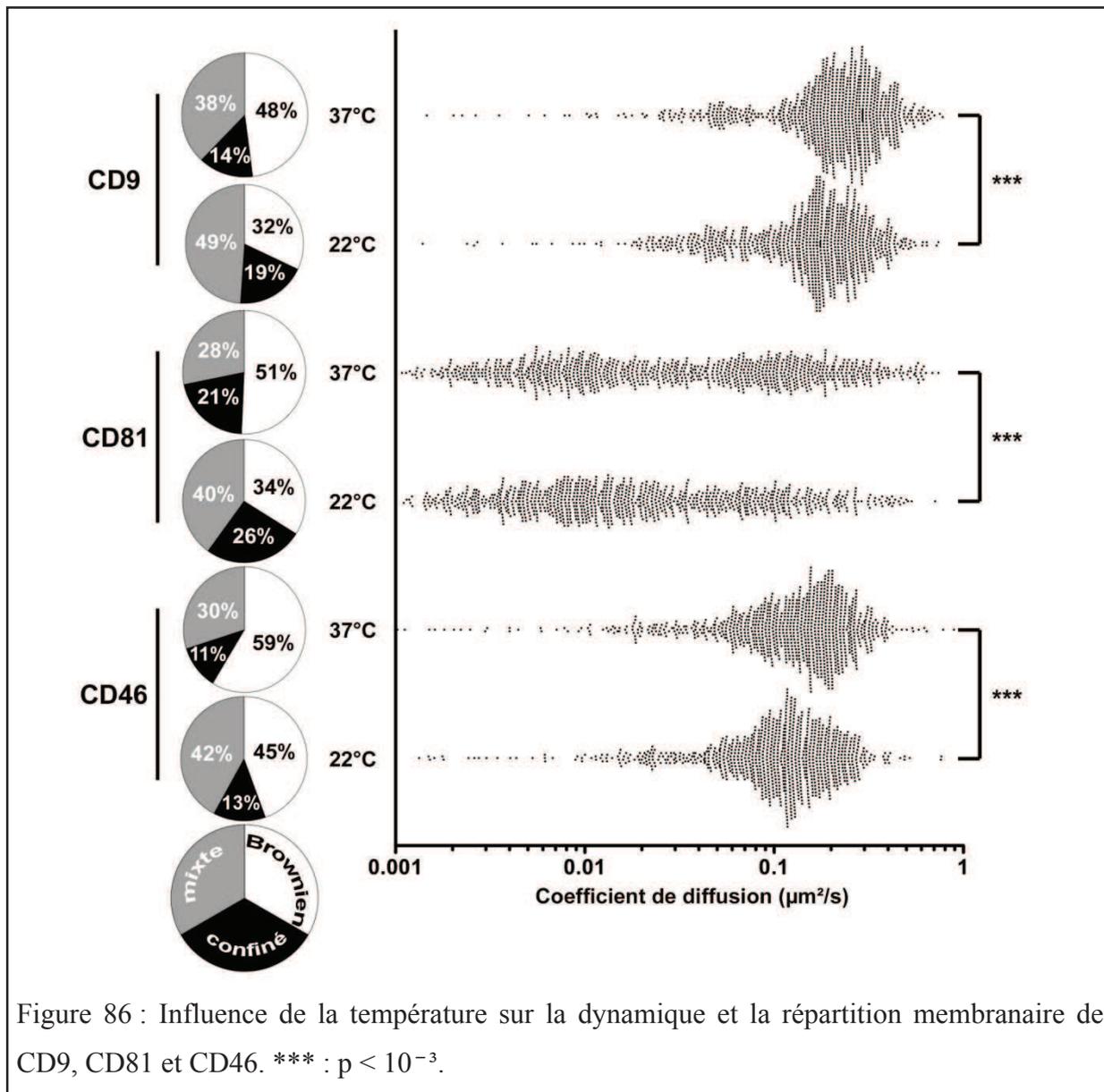


Figure 86 : Influence de la température sur la dynamique et la répartition membranaire de CD9, CD81 et CD46. *** : $p < 10^{-3}$.

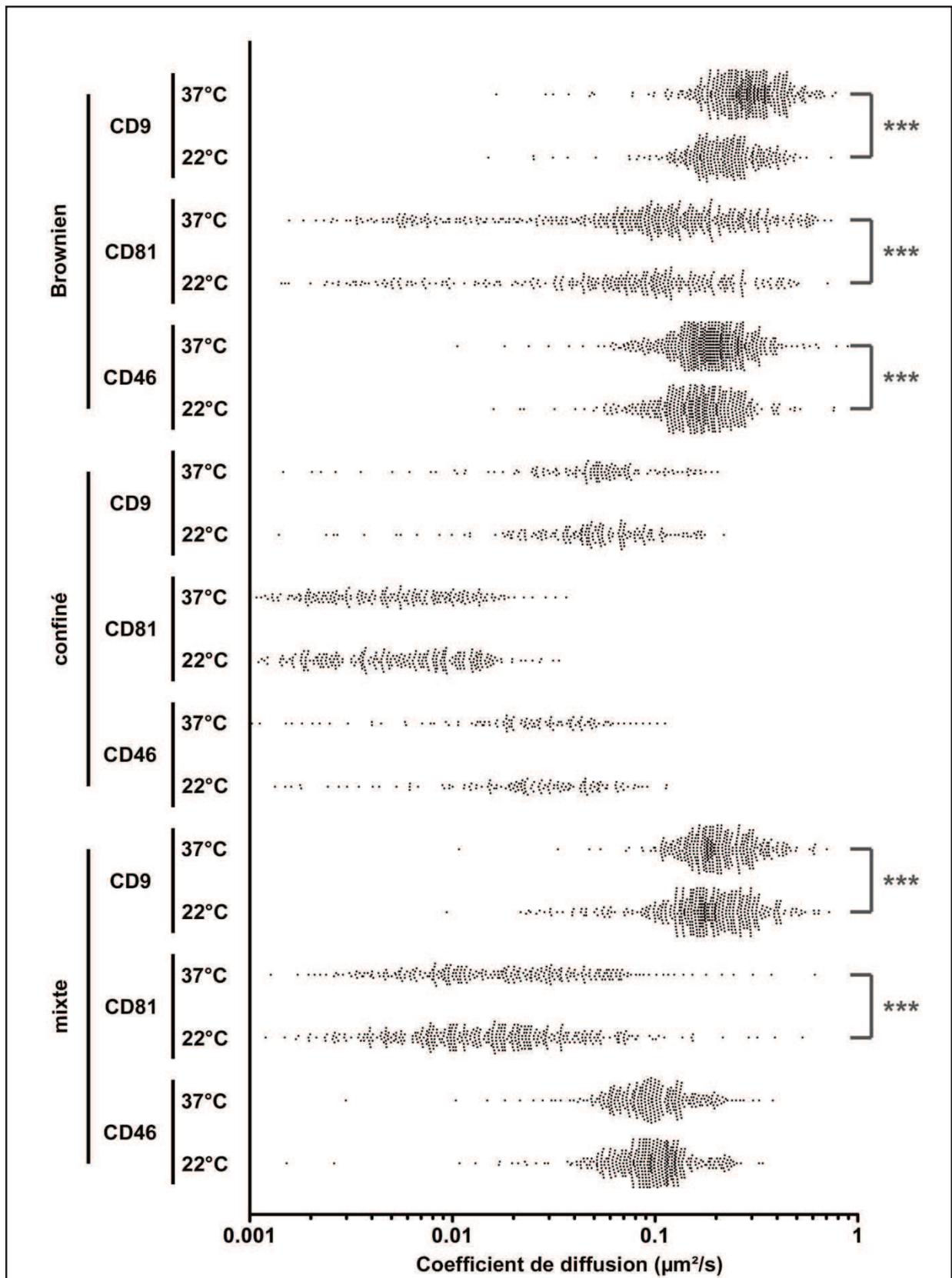
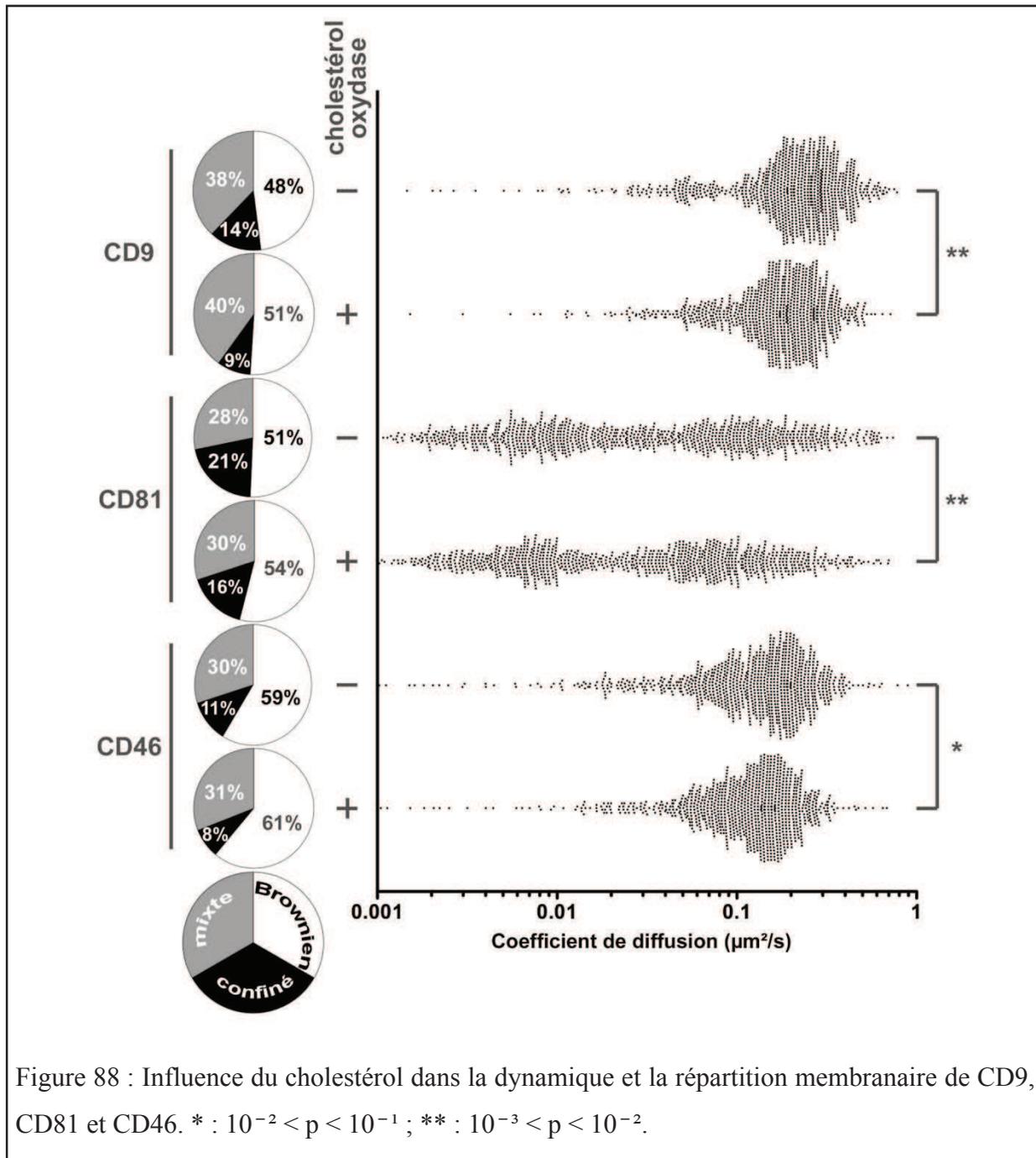


Figure 87 : Influence de la température sur la distribution des coefficients de diffusion de CD9, CD81 et CD46 en fonction du type de trajectoire. *** : $p < 10^{-3}$.

D'autres travaux ont établi que le cholestérol avait aussi un rôle primordial dans la formation de plateformes et la dynamique de protéines membranaires^{458,429}. Après traitement à la cholestérol oxydase, nous avons pu observer une baisse globale de la dynamique de CD9 et de CD81 et dans une moindre mesure de CD46 (figure 88). Paradoxalement, ce phénomène est associé à une réduction du nombre de trajectoires confinées, mais aussi au ralentissement des trajectoires Browniennes et mixtes.



II) 4. Discussion

L'une des facultés majeures des tétraspanines, est leur capacité à générer un réseau diversifié d'interactions, entre elles mais aussi avec un large panel de partenaires n'appartenant pas à cette famille de protéines à 4 domaines transmembranaires. Aussi, les tétraspanines ont été identifiées comme des organisateurs de la membrane plasmique, formant des microdomaines enrichis en tétraspanines (TEMs). Cette architecture a initialement été mise en évidence grâce aux propriétés qu'ont les tétraspanines et leurs partenaires primaires, de se séparer des autres constituants membranaires après une extraction avec certains détergents et une centrifugation sur gradient de sucrose. Grâce à de récents travaux et notamment aux expériences à l'échelle de la molécule unique, il apparaît que, dans les cellules vivantes, il existe effectivement des zones enrichies en tétraspanines, dont la taille et la forme sont relativement stables dans le temps et l'espace, mais en échange permanent avec le reste de la membrane plasmique. Ces études ont aussi montré que la tétraspanine CD9 pouvait effectivement être confinée de façon persistante (trajectoires confinées) ou transitoire (trajectoires mixtes) dans ces régions enrichies, mais était aussi capable de diffuser librement (trajectoires Browniennes) au sein de la membrane plasmique, probablement en association avec certains de ses partenaires. Notre étude montre que le comportement dynamique de CD9 et CD81 est subtilement régulé à différents niveaux du réseau à tétraspanines, en coordination avec le cytosquelette, afin de contrôler certains processus cellulaires et infectieux.

Bien que CD9 et CD81 partagent près de 43% d'identité et 64% d'homologie, ainsi que différents partenaires primaires comme EWI-2, EWI-F, ou la claudine-1, nous avons démontré dans cette publication que leur mobilité est très différente, à la fois en terme de diffusion membranaire et de répartition à l'intérieur ou l'extérieur des zones de confinement, que ce soit dans les cellules HeLa ou CHO. La restriction de mobilité générale de CD81 par rapport à CD9 ne s'explique pas simplement par sa séquestration plus importante au niveau des TEA, mais surtout par le fait que CD81 s'associe à des régions de composition différente en tétraspanines, partenaires primaires et qui lient spécifiquement cette tétraspanine au réseau cortical d'actine et ce de façon indépendante de sa boucle EC2.

Nous avons tout d'abord observé un certain nombre d'éléments qui démontrent que dans des conditions natives, la dynamique et la répartition membranaire de CD81 sont liées au cytosquelette, mais pas celles de CD9. En effet, la désorganisation ménagée du réseau d'actine par la cytochalasine D ou la latrunculine B augmente significativement les propriétés diffusives de CD81 mais pas de CD9 dans les cellules HeLa et CHO (figures 2A et S2 et 81).

Il en est de même après l'expression dans les cellules CHO de dominants négatifs de l'eitrine ou de la moésine sensés inhiber la liaison entre ces tétraspanines et l'actine, mais qui n'accroissent que la mobilité de CD81 et non celle de CD9. De plus, l'expression de ces mutants induit la disparition spécifique de zones enrichies en CD81 mais pas de CD9, ce qui suggère que ces deux tétraspanines ne sont pas présentes en même proportion dans les portions membranaires liées au cytosquelette via les ERM (figures 2B). Cette hypothèse est renforcée par le fait que CD81 est plus colocalisé avec EWI-2 ou EWI-F (protéines associées aux ERM) que CD9 (figure S3). De plus, seule une minorité des zones enrichies (environ 40%) en CD9 et CD81 sont colocalisées en immunofluorescence dans les cellules HeLa (figure S6) et la taille des confinements de CD81 est plus petite par rapport à CD9, notamment au niveau des confinements transitoires (table S1 de l'article et figures 85 et 86 du manuscrit). Par ailleurs la distribution des temps de diffusion passés dans les confinements transitoires de CD9 et CD81 sont sensiblement différents (figure 87). D'autre part, notons que le plus faible coefficient de diffusion moyen de CD81 par rapport à CD9 s'explique en partie par la mobilité drastiquement différente de leurs trajectoires Browniennes dans les cellules HeLa et les CHO (figure S1). Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer pourquoi les mouvements Browniens de CD81 sont plus lents que ceux de CD9. La première est que ce résultat viendrait d'une sous-estimation du coefficient de diffusion de CD81 mesuré ici à 10 images par secondes, si CD81 interagit préférentiellement et transitoirement avec le cytosquelette mais que ces associations durent bien moins de temps que 100ms. Ce phénomène pourrait être corrélé à la « hop diffusion » observée par Kusumi, qui décrit la diffusion des molécules entre différents compartiments délimités par le cytosquelette⁸⁷. Dans ce modèle « fence pickets », les filaments d'actine cortical et les protéines associées joueraient alors le rôle de barrières et de poteaux limitant des microdomaines membranaires entre lesquels les molécules pourraient transitoirement passer. Cependant, il n'est pas possible de visualiser ce phénomène avec une caméra classique, car le temps d'acquisition doit être pour cela de l'ordre de quelques ms. Une autre explication serait que l'environnement lipidique de CD81 est plus visqueux que celui de CD9, notamment via son association avec le cholestérol membranaire. Cependant, ni les expériences d'extraction de CD9 ou de CD81, ni aucun autre élément de la bibliographie ne peut valider cette hypothèse à l'heure actuelle. La dernière possibilité est que la diffusion libre observée de CD9 ou CD81 correspond en réalité aux mouvements Browniens d'un groupe de molécules plus large que l'une ou l'autre de ces tétraspanines. Dans le cas de CD81, ces assemblages pourraient contenir des protéines telles que les ERM, EWI-2 ou EWI-F ou d'autres partenaires qu'il reste à identifier.

Cette hypothèse est en accord avec la théorie de Saffman-Delbruck qui décrit que le coefficient de diffusion d'un objet est d'autant plus faible que son diamètre est grand⁴⁵⁹. Elle est peut aussi être corrélée au fait que CD9 et CD81 sont confinées dans des régions membranaires différentes comme nous l'avons montré précédemment. De plus, il a été suggéré que la propension de CD81 à former des dimères favoriserait la formation de plus larges assemblages membranaires, en particulier avec les ERM^{460,233}.

Afin d'identifier quels déterminants moléculaires sont impliqués dans cette différence entre CD9 et CD81, nous avons exprimé diverses chimères de ces tétraspanines et comparé leur comportement membranaire. De façon intéressante, nous avons mis en évidence que les parties N-terminale (acides aminés 1 à 118) ou C-terminale (acides aminés 118 à 236) de CD81 sont chacune suffisantes pour induire un phénotype relativement lent et confiné, similaire à CD81. Par contre, il apparaît que la boucle extracellulaire 2 n'est ni nécessaire, ni suffisante pour produire ce phénomène (figure 80). Or, cette portion de CD81 interagit spécifiquement avec EWI-2, ce qui suggère qu'à l'état natif, cette association précise entre l'EC2 de CD81 et EWI-2 ne conduit pas à la séquestration de CD81 dans des zones enrichies dépendantes du cytosquelette, mais participe peut être à d'autres processus comme lors de l'infection par le VHC⁴⁶¹. Il est aussi important de remarquer que le TM4 et/ou la queue C-terminale sont impliqués dans la réduction de la mobilité membranaire de CD81, car cette portion participe spécifiquement à l'interaction entre cette tétraspanine et les ERM, ainsi qu'avec EWI-F^{443,233}. La partie N-terminale de CD81 est elle aussi suffisante pour induire un comportement lent, dépendant du cytosquelette. Or, à l'heure actuelle, aucune interaction n'a été établie entre cette portion et les ERM ni même EWI-F, ce qui suggère qu'un autre partenaire intermédiaire pourrait être impliqué. D'ailleurs, des travaux récents montrent que CD81 est capable de se lier à EWI-2 via les TM2 et TM3. De plus, il a été proposé que ces deux domaines transmembranaires participent à l'homodimérisation de CD81, qui pourrait être essentielle à certains processus cellulaires. L'ensemble de ces résultats renforce l'idée que le comportement à la membrane plasmique de CD81 est modulé par le cytosquelette d'actine via les ERM, ainsi éventuellement que EWI-2 et/ou EWI-F et laissent entendre que l'homodimérisation de CD81 pourrait jouer un rôle dans ce phénomène.

Par ailleurs, nous avons établi que les tétraspanines pouvaient présenter un comportement membranaire différent d'un type cellulaire à l'autre. En effet, bien que la dynamique et la répartition membranaire de CD9 soit comparable entre les 2 lignées cancéreuses épithéliales PC3 et HeLa, sa diffusion est plus contrainte dans les cellules fibroblastiques CHO.

Il est envisageable que la stabilité des zones enrichies en tétraspanines et le comportement membranaire général de ces protéines soient directement dépendants de l'environnement dans lequel celles-ci diffusent, en particulier la composition lipidique, le ratio de phospholipides et de cholestérol, la nature et la concentration des différentes tétraspanines et de leurs partenaires membranaires, ainsi que l'organisation du cytosquelette. Or ces paramètres peuvent varier de façon significative d'un type cellulaire à un autre. D'ailleurs, à travers une collaboration avec l'équipe de Jane Mc Keating (Birmingham, Angleterre), nous avons démontré dans une récente étude que la dynamique membranaire de CD81 était différente entre des cellules HepG2 polarisées ou non et que ce phénomène était corrélé à l'adressage spécifique de certains composants à la membrane apicale (Harris et al. en révision, Cellular Microbiology). Nous avons aussi mis en évidence dans une précédente publication que l'expression membranaire de pseudo particules du VIH conduisait à une baisse du coefficient de diffusion moyen de CD9 et de CD81 qui était due à leur recrutement spécifique et leur séquestration durable dans les régions où la polyprotéine Gag s'assemble, de façon dépendante du cholestérol⁴²⁹. Or, d'autres travaux ont montré que le cytosquelette d'actine pouvait participer aux processus de sortie du VIH, par la liaison de Gag à l'actine et/ou au remodelage de ce réseau au niveau des sites de bourgeonnement^{462,463,464}. Nous avons donc décidé d'établir si un lien fonctionnel existait entre l'influence du cytosquelette d'actine sur le comportement membranaire différentiel de CD9 et CD81 et le recrutement de ces tétraspanines au sein des zones enrichies en Gag. Nos résultats montrent que le recrutement de CD9 et de CD81 au niveau des zones de bourgeonnement des pseudo particules virales est dépendant du cytosquelette d'actine, via les ERM (figure 5). Autant ce résultat est en accord avec l'influence du cytosquelette sur CD81 en conditions natives, autant il est surprenant et non moins intéressant de constater que l'influence du réseau d'actine sur CD9 via les ERM, n'apparaît que dans ce contexte infectieux. Ceci suggère que la nature des zones enrichies en Gag est différente de celle des régions concentrées en ERM dans des conditions natives dans le sens où le microenvironnement y est plus propice à des interactions durables avec CD9, autant qu'avec CD81. L'une des explications de ce comportement atypique de CD9 serait, qu'au niveau des assemblages de Gag, les interactions entre CD9 et CD81 soient accrues. Pour tester cette hypothèse, nous avons régulé négativement l'expression de l'une ou l'autre de ces tétraspanines et observé dans ces conditions une réduction partielle de leur recrutement aux sites de bourgeonnement du VIH. Ces résultats confirment que CD81 participent effectivement à la ségrégation latérale de CD9 et réciproquement au sein de ces zones enrichies en Gag, mettant en évidence une coopérativité de ces deux tétraspanines.

Cependant, l'effet observé suggère que cette coopérativité n'est pas suffisante et que ce phénomène pourrait être dû à des interactions indirectes entre ces tétraspanines et/ou qu'il nécessite aussi la présence d'autres partenaires tels que EWI-2 et/ou EWI-F. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que la réduction de l'expression de l'un ou l'autre de ces partenaires primaires de CD9 et de CD81 augmentait significativement le pourcentage de mouvements Browniens au profit des trajectoires confinées pour ces deux tétraspanines (figure 3). De plus, une publication récente a aussi mis en avant l'importance d'EWI-2 et de son association avec l' α -actinine dans la régulation de la synapse immune des lymphocytes T⁴⁶⁵. Par ailleurs, nous avons récemment mis en évidence, via une collaboration avec l'équipe de Laurence Cocquerel (Lille, France), que la dynamique membranaire de CD81 pouvait aussi être régulé négativement, par sa séquestration au niveau de zones enrichies en tétraspanines, lors de l'expression d'EWI-2wint, un mutant tronqué d'EWI-2 qui inhibe l'entrée du VHC dans les cellules Huh-7 (Potel et al. en révision, Cellular Microbiology). L'ensemble de ces résultats met en lumière que la ségrégation latérale des tétraspanines CD9 et CD81 est régulée de façon différentielle, en corrélation avec certains processus cellulaires, infectieux ou non.

Comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente, le cholestérol participe à la stabilité des assemblages membranaires de Gag, où à la fois des éléments de raft et des tétraspanines se retrouvent^{429,436}. Notre étude a permis de montrer que la baisse du taux de cholestérol membranaire induisait une baisse générale de la dynamique de CD9, CD81 et CD46 dans une moindre mesure. Pourtant, ce phénomène est associé à une réduction du nombre de trajectoires confinées, mais aussi au ralentissement des trajectoires Browniennes et mixtes (figure 92). L'ensemble de ces résultats suggère que les zones enrichies en tétraspanines sont partiellement désorganisées par la déplétion en cholestérol, qui pourrait participer à la coalescence de petites zones enrichies en tétraspanine pour donner de plus larges plateformes, à la manière du modèle proposé pour les rafts^{458,429,73}. Ainsi, la baisse du pourcentage de confinement associée à celle des coefficients de diffusion des mouvements Browniens et mixtes pourraient s'expliquer par une augmentation du nombre de petites zones enrichies en tétraspanines aux dépens de larges régions qui sont fragmentées, avec une baisse générale simultanée de la fluidité membranaire.

Il est intéressant de mettre en parallèle cette hypothèse avec les résultats obtenus en réduisant la température de 37°C à 22°C. En effet, dans ces conditions, il apparaît que la dynamique membranaire de CD9, CD81 et CD46 (dans une moindre mesure) est restreinte (figure 90).

En effet, l'augmentation du pourcentage de confinement est plus importante pour CD9 et CD81 que pour CD46 et la distribution des mouvements transitoires est altérée seulement pour ces tétraspanines (figure 91). Ceci suggère qu'à température ambiante, la coalescence de petites plateformes ou la formation de régions en phase gel touche plus spécifiquement les zones enrichies en tétraspanines CD9 et/ou CD81 que CD46. Enfin, remarquons que si le nombre de confinements augmente, le coefficient de diffusion des trajectoires confinées reste équivalent.

Par ailleurs, nous avons aussi montré que le réseau de microtubules influençait de façon non spécifique la dynamique de CD9, CD81 et même CD46 (figures 83 et 84). En effet, malgré la déstabilisation partielle des microtubules, nous avons observé une augmentation générale des coefficients de diffusion associés aux mouvements Browniens et une réduction du pourcentage de confinements au profit notamment de trajectoires libres. Cependant, aucune différence dans la distribution des coefficients de diffusion des trajectoires confinées n'est observée, que ce soit après la déstabilisation du réseau d'actine ou de microtubule. Ces résultats rappellent donc que la structure et la dynamique générale de la membrane plasmique est liée à l'intégrité des réseaux d'actine ou de microtubule, mais démontrent cependant que les propriétés diffusives au sein des assemblages protéiques sont indépendantes du cytosquelette ou de la température.

Conclusions et Perspectives

I) Influence réciproque entre la nature de la membrane plasmique et CD9 ou CD81

I) 1. Influence de la température et du cholestérol

Il est déjà établi que la température est un paramètre qui peut moduler l'organisation générale de la membrane plasmique et en particulier la dynamique et la répartition membranaire de certaines protéines^{456,457,390}. Comme nous nous y attendions, nous avons observé une réduction de la mobilité de CD9, CD81 et même CD46 lorsque la température est réduite à 22°C. Dans ces conditions, nous avons constaté une augmentation du nombre de trajectoires confinées aux dépens du nombre de mouvements Browniens, ainsi qu'une diminution spécifique du coefficient de diffusion moyen des trajectoires Browniennes (et non de la diffusion au sein des zones de confinement). Nous avons alors émis l'hypothèse que ces phénomènes sont dus à la coalescence de petites plateformes enrichies en tétraspanines, peut-être dans un état proche de la phase gel, qui génère plus de confinements et perturbe physiquement le mouvement libre des tétraspanines et de leur partenaire à la membrane plasmique, ou augmente la taille des clusters qui y diffusent.

Nous avons montré que la déplétion en cholestérol conduisait elle aussi à une moindre mobilité des trajectoires Browniennes pour CD9, CD81 et dans une moindre mesure CD46. Cependant, contrairement à ce qui était observé lors de la baisse de la température, la réduction du taux de cholestérol membranaire réduit le pourcentage de confinements permanents. Or, l'augmentation de la fluidité par le cholestérol a été plusieurs fois décrite avec des membranes artificielles contenant des lipides en phases gel comme la DPPC ou la sphingomyéline⁴⁰. Le cholestérol pourrait donc participer à la coalescence de petites zones enrichies en tétraspanine pour donner de plus larges plateformes, à la manière du modèle proposé pour les rafts^{458,429,73}. Ainsi, la baisse du pourcentage de confinement associée à celle des coefficients de diffusion des mouvements Browniens et mixtes pourraient s'expliquer par une augmentation du nombre de petites zones enrichies en tétraspanines aux dépens de larges régions qui seraient alors fragmentées. Le cholestérol pourrait également constituer un point de nucléation par son interaction directe avec les tétraspanines. Cette interaction a déjà été démontrée par des expériences de pontage covalent entre le lipide et les tétraspanines CD9, CD81 et CD82²³⁰. Quoiqu'il en soit, le ralentissement des protéines diffusant de façon Brownienne suggère donc que le cholestérol est un paramètre important de la fluidité membranaire dans les cellules eucaryotes.

Pour mieux comprendre ces phénomènes, nous pourrions conduire le même type d'expériences avec une gamme plus large de température ou en tentant de moduler plus finement le taux de cholestérol ou d'autres lipides comme les sphingolipides. Il faudrait alors observer à la fois la dynamique et la répartition membranaire de ces tétraspanines en molécule unique, mais aussi en marquage d'ensemble pour caractériser les zones enrichies en tétraspanines dans différents contextes. Ceci permettrait d'observer leur forme et leur taille en fonction des conditions expérimentales, grâce à la microscopie super résolue de type PALM/STORM (Photo Activated Localization Microscopy/STochastic Optical Reconstruction Microscopy) développée récemment au laboratoire. Par ailleurs, si nous parvenons à incorporer l'une ou l'autre de ces tétraspanines dans des membranes modèles, il serait possible d'analyser plus finement les relations entre ces protéines membranaires et leur microenvironnement, en visualisant directement l'évolution de ces zones avec la technique de microscopie à force atomique.

I) 2. Influence du type cellulaire

Nous avons constaté que le comportement membranaire de CD9 et de CD81 était plus contraint dans certains types cellulaires comme les CHO que dans d'autres, telles que les cellules HeLa ou PC3. Ceci se traduit par une dynamique membranaire plus lente et/ou une proportion plus importante de confinement. Il est très probable que la stabilité des zones enrichies en tétraspanines et le comportement membranaire général de ces protéines soient directement dépendants de l'environnement dans lequel celles-ci diffusent, en particulier la composition lipidique, le ratio de phospholipides et de cholestérol, la nature et la concentration des différentes tétraspanines et de leurs partenaires membranaires, ainsi que l'organisation du cytosquelette. Or ces paramètres peuvent varier de façon significative d'un type cellulaire à un autre. De plus, nous avons observé au laboratoire, qu'en réponse à un certains stimuli ou lors de processus cellulaires particuliers comme la polarisation des cellules HepG2, la réorganisation de la membrane était corrélée au ralentissement général de la dynamique de CD81. Par ailleurs, la participation active des tétraspanines dans la formation des synapses immunes et virologiques, met en lumière l'interdépendance entre les tétraspanines, ses partenaires et l'organisation dynamique de l'architecture de la membrane plasmique. Un nombre croissant d'études suggère que les courbures membranaires telles que les microvilli ou les tubules intra cellulaires spécifiques de certaines cellules mettent en jeu les tétraspanines. Il en est de même pour les processus de fusion cellulaire comme dans le cas particulier de la fécondation, où CD9 et CD81 sont essentiels.

Afin de mieux comprendre l'implication des tétraspanines et en particulier de CD9 et CD81 dans différents processus cellulaires (adhésion, migration, différenciation, signalisation, fusion, régulation de l'activité de certaines enzymes...), il convient d'étudier la dynamique et la répartition membranaire (avec la meilleure résolution possible) de ces molécules et de leurs partenaires dans des types cellulaires spécifiques des fonctions évoquées, comme par exemple la fusion des myoblastes pour se différencier en myotubes. La confrontation des résultats ainsi obtenus dans différentes lignées ou espèces permettrait à la fois d'éclaircir les mécanismes par lesquels les tétraspanines interviennent dans ces phénomènes, mais aussi de saisir quels sont les déterminants membranaires protéiques ou lipidiques qui participent avec les tétraspanines à l'organisation structurale de la membrane plasmique propre à chaque type cellulaire.

II) Relations entre le cytosquelette et les tétraspanines CD9 et CD81 à l'état natif

II) 1. Influence du cytosquelette

Notre étude, réalisée en parallèle dans les cellules CHO et HeLa, de l'influence du réseau d'actine sur la dynamique et la répartition membranaire de CD9 et CD81 a montré que le comportement membranaire de CD81 était spécifiquement dépendant de l'intégrité du cytosquelette d'actine. En effet, le traitement des cellules à la cytochalasine D ou la latrunculine B déstabilise ce réseau et augmente en parallèle la mobilité de CD81 à la membrane, ce qui suggère que contrairement à CD9, il existe dans des conditions natives, un lien entre l'actine et la séquestration membranaire de CD81. Nous avons donc choisi de comparer la dynamique de CD9 ou de CD81 avec CD82, qui est décrite dans la littérature comme liée à l'intégrité du réseau d'actine lors de l'activation des lymphocytes B. Or, nous avons montré que dans les cellules HeLa, sans stimulation particulière, la mobilité membranaire de CD82 est plus proche de celle de CD9 que de CD81. Il serait cependant judicieux d'effectuer les mêmes mesures dans les lymphocytes B, notamment après leur stimulation. L'étude de la dynamique différentielle de CD9 et CD81 par rapport au cytosquelette pourrait aussi s'inscrire dans différents contextes biologiques comme la fusion des gamètes, puisqu'il a récemment été mis en évidence des relations intimes entre CD9 et l'actine à la surface des ovocytes⁴⁶⁶.

Bien que nous n'ayons pu mettre en évidence de relation spécifique entre le réseau de microtubule et les tétraspanines CD9 et CD81, le traitement au nocodazole a mis en lumière que, même lors d'une désorganisation générale du cytosquelette, malgré ses conséquences globales sur la dynamique membranaire, les propriétés diffusives au sein des zones enrichies en tétraspanines ne sont pas dépendantes du cytosquelette. Cela dit, il n'est peut être pas impossible de trouver des conditions dans lesquelles la déstabilisation ménagée du réseau de microtubule participe spécifiquement à la dynamique de certaines tétraspanines. Nous pensons évidemment à CD63, Tspan5 (ou d'autres éléments impliqués dans le trafic intracellulaire), et CD151 (du fait de sa liaison à certaines intégrines), notamment via des protéines associées aux microtubules.

II) 2. Implication des ERM

La combinaison des chimères de CD9 et CD81 et des dominants négatifs des protéines homologues de l'eitrine démontre que la contrainte différentielle subie par CD81 comparée à CD9 et dépendante de l'actine est largement mais pas exclusivement médiée par l'eitrine ou la moésine via la région transmembranaire 4 et/ou la queue cytoplasmique C-terminale. Des travaux complémentaires réalisés en collaboration avec le laboratoire de Jane Mc Keating montrent qu'un mutant de cette queue C-terminale de CD81 présente une proportion moins grande de confinement par rapport à la protéine sauvage et surtout un comportement membranaire indépendant de la désorganisation du cytosquelette par la latrunculine B. Ces résultats obtenus dans les cellules HepG2, mis en parallèles aux nôtres dans les CHO et les HeLa, permettent de proposer que la partie cytoplasmique C-terminale est l'un des déterminants majeurs du comportement différentiel de CD81 par rapport à CD9, à travers les interactions qu'il entretient avec les ERM, elles-mêmes liées au réseau d'actine. Outre l'importance de tester si la radixine agit aussi de façon coopérative avec ses homologues pour influencer ou non la dynamique membranaire de CD81, il reste à définir si l'association de CD81 avec les ERM se produit au niveau de plateformes préformées enrichies en ERM et stabilisées au préalable par l'actine et/ou à l'inverse, que différents petits assemblages de CD81 et d'eitrine et/ou de moésine coalescent jusqu'à générer de larges zones enrichies, capables de se lier au réseau d'actine sous-jacent. L'une des principales conclusions de notre travail est que les tétraspanines CD9 et CD81 ne sont pas nécessairement présents dans les mêmes zones enrichies, en particulier celles qui contiennent aussi des ERM. Nous pouvons donc supposer que certaines de ces régions (au moins celles préférentiellement enrichies en CD9) ne sont pas (encore) connectées au réseau d'actine.

Cependant, une analyse de la cinétique de nucléation et de remodelage de ces zones est nécessaire pour comprendre en détails les mécanismes qui relient les tétraspanines au cytosquelette en condition native. Pour cela, il serait nécessaire d'accroître considérablement la résolution latérale de notre système grâce au PALM sur cellules vivantes et/ou d'observer des phénomènes de codiffusion dynamique entre différentes tétraspanines ou avec divers partenaires primaires, marqués avec des fluorophores qui présentent des propriétés spectrales différentes. Par ailleurs, nous avons révélé que la diffusion Brownienne de CD81 était significativement plus lente que CD9 et ce de façon partiellement dépendante du cytosquelette via les ERM. Afin de vérifier si ce phénomène est dû à des interactions préférentielles et transitoirement de CD81 avec le cytosquelette via les ERM, il faudrait parvenir à réaliser les mêmes expériences de suivi de molécule unique de CD9 et CD81 avec une résolution temporelle de l'ordre de la ms. Pour cela, l'utilisation de caméras CMOS de nouvelle génération peut être judicieuse. Une autre explication est que la diffusion libre observée de CD9 et CD81 corresponde en réalité aux mouvements Browniens d'un groupe de molécules plus large que l'une ou l'autre de ces tétraspanines. Dans le cas de CD81, ces assemblages pourraient contenir des protéines telles que les ERM, directement liées à cette tétraspanine ou via des protéines comme EWI-2, EWI-F, ou d'autres partenaires qu'il reste à identifier.

II) 3. Implication d'EWI-2 et EWI-F

En analysant l'effet de la réduction de l'expression d'EWI-2 et EWI-F sur le comportement membranaire de CD9 et CD81, il apparaît que ces partenaires primaires sont impliqués dans le confinement à la fois de CD9 et de CD81. Grâce aux expériences de suivi en molécule unique sur les chimères de CD9 et CD81, nous avons pu proposer que la séquestration différentielle de CD81 induite par le cytosquelette via les ERM puisse faire intervenir EWI-F par sa liaison à la fois aux protéines homologues de l'eitrine et à la partie transmembranaire 4 et/ou la queue C-terminale de CD81. De la même façon, nous avons apporté de nouveaux arguments en faveur de la liaison entre CD81 et ERM et donc à l'organisation du cytosquelette d'actine via l'interaction des portions transmembranaires 2 et 3 avec EWI-2. Pour aller plus loin dans la compréhension de ces relations fines entre CD81 et le cytosquelette via différents partenaires, il nous reste à définir si les régions communes entre CD81 et EWI-2 ou EWI-F sont toujours dépendantes ou non des ERM. Il serait aussi important d'explorer la coopérativité de ces différents partenaires primaires dans les contextes biologiques déjà évoqués, mais aussi dans les relations des tétraspanines CD9 et CD81 avec les processus infectieux.

III) Relations entre l'assemblage du VIH-1 et les tétraspanines CD9 et CD81

III) 1. Influence de Gag sur les tétraspanines CD9 et CD81

L'une des conclusions majeures de ce travail de thèse est que contrairement à l'idée généralement admise au départ, selon laquelle le VIH s'assemble au niveau de plateformes membranaires préformées, la polyprotéine Gag induit le recrutement des différents constituants de ces zones, qui s'enrichissent progressivement en CD9 et CD81. Grâce à notre collaboration avec l'équipe de Markus Thali et l'utilisation en parallèle de techniques de pointe comme le FRAP et le suivi de molécule unique, nous avons aussi démontré que la séquestration de ces deux tétraspanines au niveau des régions d'assemblage de Gag était durable, alors que pour CD55, une protéine à ancre GPI associée aux rafts, ce recrutement était transitoire. Ces résultats mettent en lumière les mécanismes différents par lesquels les éléments des rafts et les tétraspanines sont régulés, malgré leur relation similaire avec le cholestérol. Par ailleurs, nous sommes parvenus à établir que le cholestérol était un élément important mais pas essentiel à l'association de CD9 et CD81 avec les zones enrichies en Gag. Cependant, un défaut en cholestérol induit la formation de plateformes de taille réduite et nous avons démontré en parallèle que CD9 et CD81 étaient recrutées de façon coopérative dans ces régions. L'ensemble de ces données suggère que contrairement aux premières étapes de l'assemblage membranaire de Gag, indépendantes des tétraspanines, la coalescence de petits domaines enrichis en CD9, CD81 et Gag se produirait par homo- ou hétérodimérisation des tétraspanines, sous l'influence du cholestérol. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions utiliser le suivi en 2 couleurs de CD9 et CD81, ou des mutants de palmitoylation, modification post-traductionnelle impliquée dans l'oligomérisation de CD9, CD81 et CD151.

III) 2. Implication du cytosquelette dans le recrutement de CD9 et CD81 induit par Gag

Nos travaux établissent un lien fonctionnel entre l'influence du cytosquelette d'actine et le comportement membranaire différentiel de CD9 et CD81, notamment par rapport à la séquestration de ces tétraspanines au sein des zones enrichies en Gag. Nous avons montré que le recrutement de CD81 mais aussi de CD9, était dépendant du cytosquelette d'actine, via les ERM. Autant ce résultat est en accord avec l'influence du cytosquelette sur CD81 en conditions natives, autant il est surprenant et non moins intéressant de constater que l'influence du réseau d'actine sur CD9 via les ERM, n'apparaît que dans ce contexte infectieux. Ceci suggère que la nature des zones enrichies en Gag est différente de celle des régions concentrées en ERM dans des conditions natives, dans le sens où le microenvironnement y est plus propice à des interactions durables, tant avec CD9 que CD81.

L'une des explications de ce comportement atypique de CD9 est, qu'au niveau des assemblages de Gag, les interactions entre CD9 et CD81 seraient accrues, interprétation en accord avec nos expériences utilisant les siRNA. Tout comme nous avons évalué l'influence de partenaires primaires tels que EWI-2 et EWI-F dans cette relation avec l'actine en conditions natives, il serait cohérent de déterminer l'implication de ces protéines dans ce processus infectieux, d'autant plus qu'il a récemment été montré que l'association d'EWI-2 avec l' α -actinine était importante dans la régulation de la synapse immune des lymphocytes T⁴⁶⁵. Par extension, il est probable que les synapses virologiques soient modulées par les liens des tétraspanines à la fois avec les protéines virales et le cytosquelette.

Evidemment, au regard des relations entre les tétraspanines et les courbures membranaires, ainsi que les processus de fusion cellulaire en général, la prochaine étape de ce travail devrait être d'explorer l'implication de la dynamique et la répartition membranaire de CD9 et CD81, en relation avec le cytosquelette et ses partenaires primaires, tant dans le bourgeonnement et le relagage des virions, que les processus entrée du virus, notamment le rôle des protéines d'enveloppe dans ces phénomènes. Ce problème sera d'ailleurs abordé prochainement au laboratoire grâce au couplage de la microscopie à force atomique et de la microscopie super résolue PALM/STORM.

IV) Relations entre le VHC et la dynamique des tétraspanines CD9 et CD81

A travers une collaboration fructueuse avec l'équipe de Laurence Cocquerel, nous avons mis en évidence que l'expression d'EWI-2wint, une forme tronquée d'EWI-2 qui inhibe l'entrée du virus, entraînait une augmentation spécifique du pourcentage de confinement de CD81, mais pas de CD9 ni de CD46. Nous avons montré que cette séquestration de CD81 avait lieu dans des zones enrichies en tétraspanines et en Claudine-1. L'entrée du VHC nécessite donc une certaine mobilité de CD81 à la membrane des hépatocytes, peut-être afin de mieux recruter d'autres partenaires importants pour son internalisation. Ainsi, des facteurs entraînant une réduction de la dynamique de CD81, comme son interaction avec EWI-2wint ou la polarisation cellulaire, pourraient être des mécanismes naturels de défense contre l'infection par le VHC. Cependant, il a été montré que l'infection par le VHC ne dépendait pas uniquement de CD81 mais était un processus extrêmement complexe faisant intervenir plusieurs facteurs cellulaires. En effet, SR-BI⁴⁶⁷ et Claudine 1 (CL-1)⁴⁶⁸, un transporteur de cholestérol et une protéine des jonctions serrées, ont été identifiés comme étant essentiels à l'entrée virale. C'est pourquoi nous envisageons maintenant d'étudier au laboratoire, le rôle de SRB1 dans la dynamique, le partitionnement et l'interaction de CD81 et Claudine-1.

V) Conclusions générales

Ce manuscrit présente donc la membrane plasmique comme un environnement complexe et non moins structuré, où les tétraspanines jouent un rôle primordial dans l'organisation de cette membrane, grâce aux différentes associations que ces tétraspanines entretiennent avec de nombreux partenaires primaires protéiques, mais aussi avec certains lipides. A travers cette thèse, nous avons exploré l'influence de la température, du cholestérol et surtout du cytosquelette dans la dynamique et la répartition membranaire des tétraspanines CD9 et CD81, en particulier dans les processus infectieux comme l'assemblage et le bourgeonnement du VIH-1. L'ensemble de notre étude est le fruit de collaborations qui nous ont permis de nous procurer des outils expérimentaux indispensables comme les anticorps monoclonaux dirigés contre les différentes protéines d'intérêt, les plasmides pour exprimer les chimères de CD9 et CD81 ou les dominants négatifs des ERM, les siRNA contre les tétraspanines, ou leurs partenaires primaires EWI-2 ou EWI-F. L'ensemble de nos résultats est aussi issu d'importants efforts de mise au point et d'optimisation dans la production de Fab, leur purification, leur marquage, la mesure de la mobilité des protéines membranaires en molécule unique, l'analyse des trajectoires ainsi que de la colocalisation des zones enrichies en tétraspanines avec leurs partenaires. Nous devons toutefois insister sur le fait que ce travail de thèse ne fait qu'ouvrir de nouvelles portes vers la compréhension des mécanismes par lesquels l'organisation dans le temps et l'espace des tétraspanines pourrait influencer des processus cellulaires comme l'adhésion, la migration, la prolifération, la signalisation, ou la fusion modulant ainsi la progression de certaines pathologies comme le cancer, la malaria, l'hépatite C ou le SIDA.

Bibliographie

1. Ko, K. S. & McCulloch, C. A. Partners in protection: interdependence of cytoskeleton and plasma membrane in adaptations to applied forces. *J. Membr. Biol.* **174**, 85–95 (2000).
2. Trubiani, O. *et al.* Changes of plasma membrane properties in a human pre-T cell line undergoing apoptosis. *J. Membr. Biol.* **204**, 77–84 (2005).
3. Józwiak, Z. & Leyko, W. Role of membrane components in thermal injury of cells and development of thermotolerance. *Int. J. Radiat. Biol.* **62**, 743–756 (1992).
4. Vicente-Manzanares, M. & Horwitz, A. R. Adhesion dynamics at a glance. *J. Cell. Sci.* **124**, 3923–3927 (2011).
5. Vicente-Manzanares, M. & Horwitz, A. R. Cell migration: an overview. *Methods Mol. Biol.* **769**, 1–24 (2011).
6. Arnadóttir, J. & Chalfie, M. Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys* **39**, 111–137 (2010).
7. Smith, I. F., Shuai, J. & Parker, I. Active generation and propagation of Ca²⁺ signals within tunneling membrane nanotubes. *Biophys. J.* **100**, L37–39 (2011).
8. Sigismund, S. *et al.* Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiol. Rev.* **92**, 273–366 (2012).
9. Neto, H., Collins, L. L. & Gould, G. W. Vesicle trafficking and membrane remodelling in cytokinesis. *Biochem. J.* **437**, 13–24 (2011).
10. Gadella, B. M. & Evans, J. P. Membrane fusions during mammalian fertilization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **713**, 65–80 (2011).
11. Krauss, M. & Haucke, V. Shaping membranes for endocytosis. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **161**, 45–66 (2011).
12. Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S. & Longnecker, R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 369–381 (2011).
13. Colman, P. M. & Lawrence, M. C. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 309–319 (2003).
14. Dussupt, V. *et al.* Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are critical for late events of HIV-1 budding. *J. Virol.* **85**, 2304–2315 (2011).
15. Kleinzeller, A. William Hewson's studies of red blood corpuscles and the evolving concept of a cell membrane. *Am. J. Physiol.* **271**, C1–8 (1996).
16. Tvrzicka, E., Kremmyda, L.-S., Stankova, B. & Zak, A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **155**, 117–130 (2011).
17. Leventis, P. A. & Grinstein, S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* **39**, 407–427 (2010).
18. Denecker, G. *et al.* Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome c and decrease in mitochondrial transmembrane potential. *FEBS Lett.* **465**, 47–52 (2000).
19. Heyningen, S. V. Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside GM1. *Science* **183**, 656–7 (1974).
20. van Meer, G. Lipids of the Golgi membrane. *Trends in Cell Biology* **8**, 29–33 (1998).
21. Mayor, S. & Riezman, H. Sorting GPI-anchored proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 110–120 (2004).
22. Hanson, M. A. & Stevens, R. C. Discovery of new GPCR biology: one receptor structure at a time. *Structure* **17**, 8–14 (2009).
23. Salaun, C., Greaves, J. & Chamberlain, L. H. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J. Cell Biol.* **191**, 1229–1238 (2010).
24. Yoon, V. *et al.* The GP120 molecule of HIV-1 and its interaction with T cells. *Curr. Med. Chem.* **17**, 741–749 (2010).
25. Weinbaum, S., Tarbell, J. M. & Damiano, E. R. The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. *Annual Review of Biomedical Engineering* **9**, 121–167 (2007).
26. Brannigan, G. & Brown, F. L. H. Contributions of Gaussian Curvature and Nonconstant Lipid Volume to Protein Deformation of Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **92**, 864–876 (2007).
27. Botelho, A. V., Huber, T., Sakmar, T. P. & Brown, M. F. Curvature and Hydrophobic Forces Drive Oligomerization and Modulate Activity of Rhodopsin in Membranes. *Biophys. J.* **91**, 4464–4477 (2006).
28. Frick, M. *et al.* Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr. Biol.* **17**, 1151–1156 (2007).
29. Gil, T. *et al.* Theoretical analysis of protein organization in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 245–266 (1998).
30. Alessandrini, A. & Facci, P. Nanoscale mechanical properties of lipid bilayers and their relevance in biomembrane organization and function. *Micron* **43**, 1212–1223 (2012).
31. Chapman, D. Phase transitions and fluidity characteristics of lipids and cell membranes. *Q Rev Biophys* **8**, 185–235 (1975).
32. Cone, R. A. Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane. *Nat New Biol* **236**, 39–43 (1972).
33. Frye, L. D. & Edidin, M. The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *Journal of Cell Science* (1970).
34. Poo, M. & Cone, R. A. Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature* **247**, 438–41 (1974).
35. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–31 (1972).
36. Morrisset, J. D. *et al.* Multiple thermotropic phase transitions in Escherichia coli membranes and membrane lipids. *J. Biol. Chem.* **250**, 6969–6976 (1975).
37. Wu, S. H. W. & McConnell, H. M. Phase Separations in Phospholipid Membranes. *Biochemistry* **14**, 847–854 (1975).
38. Almeida, P. F., Vaz, W. L. & Thompson, T. E. Percolation and diffusion in three-component lipid bilayers: effect of cholesterol on an equimolar mixture of two phosphatidylcholines. *Biophys J* **64**, 399–412 (1993).
39. Subramaniam, S. & McConnell, H. M. Critical Mixing in Monolayer Mixtures of Phospholipid and Cholesterol. *Journal of Physical Chemistry* **91**, 1715–1718 (1987).
40. Ipsen, J. H., Karlstrom, G., Mouritsen, O. G., Wennerstrom, H. & Zuckermann, M. J. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim Biophys Acta* **905**, 162–72. (1987).
41. Engelman, D. M. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* **438**, 578–580 (2005).
42. Marguet, D., Lenne, P. F., Rigneault, H. & He, H. T. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo Journal* **25**, 3446–3457 (2006).
43. Simons, K. & van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197–202 (1988).

44. Skibbens, J. E., Roth, M. G. & Matlin, K. S. Differential extractability of influenza virus hemagglutinin during intracellular transport in polarized epithelial cells and nonpolar fibroblasts. *J. Cell Biol.* **108**, 821–832 (1989).
45. Lisanti, M. P., Caras, I. W., Davitz, M. A. & Rodriguez-Boulan, E. A glycosphospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **109**, 2145–2156 (1989).
46. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* (1997).
47. Brown, D. A. & Rose, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533–44 (1992).
48. Song, K. S., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Parenti, M. & Lisanti, M. P. Targeting of a G alpha subunit (Gi1 alpha) and c-Src tyrosine kinase to caveolae membranes: clarifying the role of N-myristoylation. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **43**, 293–303 (1997).
49. Melkonian, K. A., Ostermeyer, A. G., Chen, J. Z., Roth, M. G. & Brown, D. A. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts - Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* **274**, 3910–3917 (1999).
50. Milhiet, P.-E. *et al.* Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts. *EMBO reports* **3**, 485–490 (2002).
51. Saslowsky, D. E. *et al.* Placental Alkaline Phosphatase Is Efficiently Targeted to Rafts in Supported Lipid Bilayers. *J. Biol. Chem.* **277**, 26966–26970 (2002).
52. Schroeder, R., London, E. & Brown, D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12130–4. (1994).
53. Epanand, R. M. Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Prog Lipid Res* **45**, 279–94 (2006).
54. Munro, S. Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell* **115**, 377–388 (2003).
55. Pike, L. J. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* **378**, 281–92 (2004).
56. Heerklotz, H. Triton Promotes Domain Formation in Lipid Raft Mixtures. *Biophys. J.* **83**, 2693–2701 (2002).
57. Schnitzer, J. E., McIntosh, D. P., Dvorak, A. M., Liu, J. & Oh, P. Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* **269**, 1435–9 (1995).
58. London, E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* (2005).
59. Shogomori, H. & Brown, D. A. Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem* **384**, 1259–63 (2003).
60. Shah, M. B. & Sehgal, P. B. Nondetergent isolation of rafts. *Methods Mol Biol* **398**, 21–8 (2007).
61. Thorn, H. *et al.* Cell Surface Orifices of Caveolae and Localization of Caveolin to the Necks of Caveolae in Adipocytes. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3967–3976 (2003).
62. Parton, R. G. & Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185–194 (2007).
63. Mayor, S., Rothberg, K. G. & Maxfield, F. R. Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* **264**, 1948–51 (1994).
64. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31–9. (2000).
65. Prior, I. A., Muncke, C., Parton, R. G. & Hancock, J. F. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *J. Cell Biol.* **160**, 165–170 (2003).
66. Kenworthy, A. K. & Edidin, M. Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of $\approx 100\text{ \AA}$ using imaging fluorescence resonance energy transfer. *The Journal of Cell Biology* **142**, 69–84 (1998).
67. Sharma, P. *et al.* Nanoscale Organization of Multiple GPI-Anchored Proteins in Living Cell Membranes. *Cell* **116**, 577–589 (2004).
68. Varma, R. & Mayor, S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* **394**, 798–801 (1998).
69. Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. & Tsien, R. Y. Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **296**, 913–916 (2002).
70. Maxfield, F. R. Plasma membrane microdomains. *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 483–487 (2002).
71. Anderson, R. G. & Jacobson, K. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* **296**, 1821–5 (2002).
72. Mayor, S. & Rao, M. Rafts: Scale-Dependent, Active Lipid Organization at the Cell Surface. *Traffic* (2004).
73. Pike, L. J. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.* **47**, 1597–1598 (2006).
74. Jacobson, K., Mouritsen, O. G. & Anderson, R. G. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* **9**, 7–14 (2007).
75. Jacobson, K., Sheets, E. D. & Simson, R. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science (New York, NY)* (1995).
76. Sheetz, M. P., Turney, S., Qian, H. & Elson, E. L. Nanometre-level analysis demonstrates that lipid flow does not drive membrane glycoprotein movements. *Nature* **340**, 284–288 (1989).
77. Edidin, M., Kuo, S. C. & Sheetz, M. P. Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers. *Science* **254**, 1379–82 (1991).
78. Edidin, M., Zuniga, M. C. & Sheetz, M. P. Truncation Mutants Define and Locate Cytoplasmic Barriers to Lateral Mobility of Membrane Glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 3378–3382 (1994).
79. Svoboda, K. & Block, S. M. Biological Applications of Optical Forces. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **23**, 247–285 (1994).
80. Kusumi, A., Sako, Y. & Yamamoto, M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* **65**, 2021–40 (1993).
81. Kusumi, A. & Sako, Y. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 566–574 (1996).
82. Viola, A. & Gupta, N. Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 889–896 (2007).
83. Chichili, G. R. & Rodgers, W. Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2319–2328 (2009).
84. Mueller, V. *et al.* STED nanoscopy reveals molecular details of cholesterol- and cytoskeleton-modulated lipid interactions in living cells. *Biophys. J.* **101**, 1651–1660 (2011).
85. Kusumi, A., Ike, H., Nakada, C., Murase, K. & Fujiwara, T. Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. *Seminars in Immunology* **17**, 3–21 (2005).
86. Kusumi, A. *et al.* PARADIGM SHIFT OF THE PLASMA MEMBRANE CONCEPT FROM THE TWO-DIMENSIONAL CONTINUUM FLUID TO THE PARTITIONED FLUID: High-Speed Single-Molecule Tracking of Membrane Molecules. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* (2005).

87. Suzuki, K., Ritchie, K., Kajikawa, E., Fujiwara, T. & Kusumi, A. Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys J* **88**, 3659–80 (2005).
88. Kusumi, A. & Suzuki, K. Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions. *Biochim Biophys Acta* **1746**, 234–51 (2005).
89. Cartaud, A., Stetzkowski-Marden, F., Maoui, A. & Cartaud, J. Agrin triggers the clustering of raft-associated acetylcholine receptors through actin cytoskeleton reorganization. *Biol. Cell* **103**, 287–301 (2011).
90. Francis, R. *et al.* Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS ONE* **6**, e26379 (2011).
91. Louvet-Vallée, S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol. Cell* **92**, 305–316 (2000).
92. Wieser, S., Moertelmaier, M., Fuertbauer, E., Stockinger, H. & Schutz, G. (Un)Confined Diffusion of CD59 in the Plasma Membrane Determined by High-Resolution Single Molecule Microscopy. *Biophysical Journal* (2007).
93. Sieber, J. J. *et al.* Anatomy and Dynamics of a Supramolecular Membrane Protein Cluster. *Science (New York, NY)* (2007).
94. Fukuda, M., Kanno, E., Ogata, Y. & Mikoshiba, K. Mechanism of the SDS-resistant synaptotagmin clustering mediated by the cysteine cluster at the interface between the transmembrane and spacer domains. *J Biol Chem* **276**, 40319–25 (2001).
95. Uhles, S., Moede, T., Leibiger, B., Berggren, P. O. & Leibiger, I. B. Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J Cell Biol* **163**, 1327–37 (2003).
96. Gulik-Krzywicki, T., Seigneuret, M. & Rigaud, J. L. Monomer-oligomer equilibrium of bacteriorhodopsin in reconstituted proteoliposomes. A freeze-fracture electron microscope study. *J Biol Chem* **262**, 15580–8 (1987).
97. Stradner, A. *et al.* Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids. *Nature* **432**, 492–495 (2004).
98. Destainville, N. Cluster phases of membrane proteins. *Physical review E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics* **77**, 011905 (2008).
99. Glebov, O. O. & Nichols, B. J. Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nat Cell Biol* **6**, 238–43 (2004).
100. Gaus, K., Chklovskaya, E., Fazekas de St. Groth, B., Jessup, W. & Harder, T. Condensation of the plasma membrane at the site of T lymphocyte activation. *J. Cell Biol.* **171**, 121–131 (2005).
101. Douglass, A. & Vale, R. Single-Molecule Microscopy Reveals Plasma Membrane Microdomains Created by Protein-Protein Networks that Exclude or Trap Signaling Molecules in T Cells. *Cell* **121**, 937–950 (2005).
102. Post, T. W. *et al.* Structure of the gene for human complement protein decay accelerating factor. *J Immunol* **144**, 740–4 (1990).
103. Todd, S. C., Doctor, V. S. & Levy, S. Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* **1399**, 101–104 (1998).
104. Serru, V., Dessen, P., Boucheix, C. & Rubinstein, E. Sequence and expression of seven new tetraspans. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1478**, 159–163 (2000).
105. Kopczyński, C. C., Davis, G. W. & Goodman, C. S. A neural tetraspanin, encoded by late bloomer, that facilitates synapse formation. *Science* **271**, 1867–1870 (1996).
106. Todres, E., Nardi, J. B. & Robertson, H. M. The tetraspanin superfamily in insects. *Insect Molecular Biology* **9**, 581–590 (2000).
107. Tomlinson, M. G. & Wright, M. D. A new transmembrane 4 superfamily molecule in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Evolution* **43**, 312–314 (1996).
108. Clergeot, P. H. *et al.* PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6963–6968 (2001).
109. Gourgues, M. *et al.* A new class of tetraspanins in fungi. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **297**, 1197–1204 (2002).
110. Garcia-España, A. *et al.* Appearance of new tetraspanin genes during vertebrate evolution. *Genomics* (2008).
111. Huang, S. F. *et al.* The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics* **86**, 674–684 (2005).
112. Huang, S., Tian, H., Chen, Z., Yu, T. & Xu, A. The evolution of vertebrate tetraspanins: gene loss, retention, and massive positive selection after whole genome duplications. *BMC Evol. Biol.* **10**, 306 (2010).
113. Boucheix, C. & Rubinstein, E. Tetraspanins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* (2001).
114. Hemler, M. E. TETRASPANIN PROTEINS MEDIATE CELLULAR PENETRATION, INVASION, AND FUSION EVENTS AND DEFINE A NOVEL TYPE OF MEMBRANE MICRODOMAIN. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2003).
115. Hemler, M. E. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2005).
116. Levy, S. & Shoham, T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nature Reviews Immunology* **5**, 136–148 (2005).
117. Hemler, M. E. Specific tetraspanin functions. *The Journal of Cell Biology* (2001).
118. Seigneuret, M. Complete predicted three-dimensional structure of the facilitator transmembrane protein and hepatitis C virus receptor CD81: Conserved and variable structural domains in the tetraspanin superfamily. *Biophysical Journal* **90**, 212–227 (2006).
119. Kitadokoro, K. *et al.* CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *Embo Journal* **20**, 12–18 (2001).
120. Berditchevski, F. & Odintsova, E. Tetraspanins as Regulators of Protein Trafficking. *Traffic* **8**, 89–96 (2007).
121. Yang, X. W. *et al.* Palmitoylation of tetraspanin proteins: Modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 767–781 FTXT HighWire <http://www.molbiolcell.org/cgi/content/full/13/3/767> (2002).
122. Berditchevski, F., Odintsova, E., Sawada, S. & Gilbert, E. Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem* **277**, 36991–7000 (2002).
123. Charrin, S. *et al.* Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 107–12 (2003).
124. Lineberry, N., Su, L., Soares, L. & Fathman, C. G. The single subunit transmembrane E3 ligase gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) captures and then ubiquitinates transmembrane proteins across the cell membrane. *J. Biol. Chem.* **283**, 28497–28505 (2008).
125. Maecker, H. T., Todd, S. C. & Levy, S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **11**, 428–442 (1997).
126. Kovalenko, O. V., Metcalf, D. G., DeGrado, W. F. & Hemler, M. E. Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Struct Biol* **5**, 11 (2005).
127. Gratkowski, H., Lear, J. D. & DeGrado, W. F. Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 880–885 (2001).
128. Zhou, F. X., Cocco, M. J., Russ, W. P., Brunger, A. T. & Engelman, D. M. Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nature Structural Biology* **7**, 154–160 (2000).

129. Cannon, K. S. & Cresswell, P. Quality control of transmembrane domain assembly in the tetraspanin CD82. *Embo Journal* **20**, 2443–2453 (2001).
130. Toyo-oka, K. *et al.* Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *International Immunology* **11**, 2043–2052 (1999).
131. Tu, L. Y., Kong, X. P., Sun, T. T. & Kreibich, G. Integrity of all four transmembrane domains of the tetraspanin uroplakin Ib is required for its exit from the ER. *Journal of Cell Science* **119**, 5077–5086 (2006).
132. Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 106–112 (2003).
133. Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C. & Conjeaud, H. Structure of the tetraspanin main extracellular domain - A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40055–40064 (2001).
134. Hochrein, M. B., Reich, C., Krause, B., Rädler, J. O. & Nickel, B. Structure and mobility of lipid membranes on a thermoplastic substrate. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids* **22**, 538–545 (2006).
135. Roccasecca, R. *et al.* Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J. Virol.* **77**, 1856–1867 (2003).
136. Zhu, G. Z. *et al.* Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development* **129**, 1995–2002 (2002).
137. Escola, J. M. *et al.* Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 20121–20127 (1998).
138. Nishibori, M. *et al.* The Protein Cd63 Is in Platelet Dense Granules, Is Deficient in a Patient with Hermansky-Pudlak Syndrome, and Appears Identical to Granulophysin. *Journal of Clinical Investigation* **91**, 1775–1782 (1993).
139. Vischer, U. M. & Wagner, D. D. Cd63 Is a Component of Weibel-Palade Bodies of Human Endothelial-Cells. *Blood* **82**, 1184–1191 (1993).
140. Sincock, P. M. *et al.* PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *Journal of Cell Science* **112**, 833–844 (1999).
141. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1161–1172 (1996).
142. They, C. *et al.* Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology* **166**, 7309–7318 (2001).
143. Sato, K. *et al.* Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol* **82**, 1021–33 (2008).
144. Ito, C. *et al.* Tetraspanin family protein CD9 in the mouse sperm: unique localization, appearance, behavior and fate during fertilization. *Cell Tissue Res.* **340**, 583–594 (2010).
145. Crew, V. K. *et al.* CD 151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood* **104**, 2217–2223 (2004).
146. Schwartzalbiez, R., Dorken, B., Hofmann, W. & Moldenhauer, G. The B-Cell-Associated Cd37-Antigen (Gp40-52) Structure and Subcellular Expression of an Extensively Glycosylated Glycoprotein. *Journal of Immunology* **140**, 905–914 (1988).
147. Tomlinson, M. G. *et al.* Characterization of Mouse Cd53 - Epitope Mapping, Cellular-Distribution and Induction by T-Cell Receptor Engagement During Repertoire Selection. *European Journal of Immunology* **25**, 2201–2205 (1995).
148. Hu, C.-C. A. *et al.* Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3937–3950 (2005).
149. Sridhar, S. C. & Miranti, C. K. Tetraspanin KAI1/CD82 suppresses invasion by inhibiting integrin-dependent crosstalk with c-Met receptor and Src kinases. *Oncogene* **25**, 2367–2378 (2006).
150. Liu, L. *et al.* Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. *J. Biol. Chem.* **282**, 31631–31642 (2007).
151. Zhou, Z. *et al.* TM4SF3 promotes esophageal carcinoma metastasis via upregulating ADAM12m expression. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 537–548 (2008).
152. Testa, J. E., Brooks, P. C., Lin, J. M. & Quigley, J. P. Eukaryotic expression cloning with an antimetastatic monoclonal antibody identifies a tetraspanin (PETA-3/CD151) as an effector of human tumor cell migration and metastasis. *Cancer Res.* **59**, 3812–3820 (1999).
153. Shigeta, M. *et al.* CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.* **163**, 165–176 (2003).
154. Lazo, P. A. Functional implications of tetraspanin proteins in cancer biology. *Cancer Science* **98**, 1666–1677 (2007).
155. Zöller, M. Gastrointestinal tumors: metastasis and tetraspanins. *Z Gastroenterol* **44**, 573–586 (2006).
156. Liu, W. M. & Zhang, X. A. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett.* **240**, 183–194 (2006).
157. Nakazawa, Y. *et al.* Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood* **112**, 1730–1739 (2008).
158. Bandyopadhyay, S. *et al.* Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nature Medicine* **12**, 933–938 (2006).
159. Winterwood, N. E., Varzavand, A., Meland, M. N., Ashman, L. K. & Stipp, C. S. A critical role for tetraspanin CD151 in alpha3beta1 and alpha6beta4 integrin-dependent tumor cell functions on laminin-5. *Mol Biol Cell* **17**, 2707–21 (2006).
160. Takeda, Y. *et al.* Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood* **109**, 1524–1532 (2007).
161. Kotha, J., Longhurst, C., Appling, W. & Jennings, L. K. Tetraspanin CD9 regulates beta 1 integrin activation and enhances cell motility to fibronectin via a PI-3 kinase-dependent pathway. *Exp. Cell Res.* **314**, 1811–1822 (2008).
162. Saito, Y. *et al.* Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 9557–9565 (2006).
163. Odintsova, E. *et al.* Gangliosides play an important role in the organization of CD82-enriched microdomains. *The Biochemical journal* (2006).
164. Todeschini, A. R., Dos Santos, J. N., Handa, K. & Hakolmori, S. I. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 1925–1930 (2008).
165. Tedder, T. F., Inaoki, M. & Sato, S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* **6**, 107–118 (1997).
166. Cherukuri, A. *et al.* B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *J. Biol. Chem.* **279**, 31973–31982 (2004).
167. Le Naour, F., cois, André, M., Boucheix, C. & Rubinstein, E. Membrane microdomains and proteomics: Lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *PROTEOMICS* (2006).

168. Andre, M. *et al.* Proteomic analysis of the tetraspanin web using LC-ESI-MS/MS and MALDI-FTICR-MS. *Proteomics* **6**, 1437–49 (2006).
169. Arduise, C. *et al.* Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* (2008).
170. Hasegawa, M. *et al.* CD151 dynamics in carcinoma-stroma interaction: integrin expression, adhesion strength and proteolytic activity. *Lab. Invest.* **87**, 882–892 (2007).
171. Bass, R. *et al.* Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82. *J. Biol. Chem.* **280**, 14811–14818 (2005).
172. Sugiura, T. & Berditchevski, F. Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J. Cell Biol.* **146**, 1375–1389 (1999).
173. Hong, I.-K. *et al.* Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **281**, 24279–24292 (2006).
174. Takino, T. *et al.* Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 160–166 (2003).
175. Yañez-Mó, M. *et al.* MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood* **112**, 3217–3226 (2008).
176. Shi, W., Fan, H., Shum, L. & Derynck, R. The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J. Cell Biol.* **148**, 591–602 (2000).
177. Imhof, I., Gasper, W. J. & Derynck, R. Association of tetraspanin CD9 with transmembrane TGF confers alterations in cell-surface presentation of TGF and cytoskeletal organization. *Journal of Cell Science* **121**, 2265–2274 (2008).
178. Kobayashi, T. *et al.* The tetraspanin CD63/lamp3 cycles between endocytic and secretory compartments in human endothelial cells. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 1829–1843 (2000).
179. Duffield, A., Kamsteeg, E.-J., Brown, A. N., Pagel, P. & Caplan, M. J. The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 15560–15565 (2003).
180. Codina, J. & DuBose, T. D., Jr Molecular regulation and physiology of the H⁺,K⁺ -ATPases in kidney. *Semin. Nephrol.* **26**, 345–351 (2006).
181. Yoshida, T. *et al.* A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* **9**, 540–558 (2008).
182. Zhang, X. A. & Huang, C. Tetraspanins and cell membrane tubular structures. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 2843–2852 (2012).
183. Tachibana, I. & Hemler, M. E. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J. Cell Biol.* **146**, 893–904 (1999).
184. Chen, H. F., Titushkin, I., Stroschio, M. & Cho, M. Altered membrane dynamics of quantum dot-conjugated integrins during osteogenic differentiation of human bone marrow derived progenitor cells. *Biophysical Journal* **92**, 1399–1408 (2007).
185. Ishii, M. *et al.* RANKL-induced expression of tetraspanin CD9 in lipid raft membrane microdomain is essential for cell fusion during osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 965–976 (2006).
186. Iwai, K., Ishii, M., Ohshima, S., Miyatake, K. & Saeki, Y. Expression and function of transmembrane-4 superfamily (tetraspanin) proteins in osteoclasts: reciprocal roles of Tspan-5 and NET-6 during osteoclastogenesis. *Allergol Int* **56**, 457–463 (2007).
187. Vignery, A. Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. *J. Exp. Med.* **202**, 337–340 (2005).
188. Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. & Boucheix, C. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* **287**, 319–21 (2000).
189. Miyado, K. *et al.* Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**, 321–324 (2000).
190. Kaji, K. *et al.* The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nature Genetics* **24**, 279–282 (2000).
191. Rubinstein, E. *et al.* Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Developmental Biology* (2006).
192. Runge, K. E. *et al.* Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev. Biol.* **304**, 317–325 (2007).
193. Chen, M. S. *et al.* Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11830–11835 (1999).
194. Ziyat, A. *et al.* CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci* **119**, 416–24 (2006).
195. Rubinstein, E., Ziyat, A., Wolf, J. P., Le Naour, F. & Boucheix, C. The molecular players of sperm-egg fusion in mammals. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 254–63 (2006).
196. Silvie, O. *et al.* Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nat Med* **9**, 93–6 (2003).
197. Silvie, O., Mota, M. M., Matuschewski, K. & Prudêncio, M. Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 352–359 (2008).
198. Yalaoui, S. *et al.* Hepatocyte Permissiveness to Plasmodium Infection Is Conveyed by a Short and Structurally Conserved Region of the CD81 Large Extracellular Domain. *PLoS Pathogens* **4**, e1000010 (2008).
199. Martin, F. *et al.* Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology? *Journal of Virology* **79**, 10839–10851 (2005).
200. Singethan, K. *et al.* CD9 Clustering and Formation of Microvilli Zippers Between Contacting Cells Regulates Virus-Induced Cell Fusion. *Traffic* (2008).
201. Pileri, P. *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science (New York, NY)* **282**, 938–941 (1998).
202. Higginbottom, A. *et al.* Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Journal of Virology* (2000).
203. Allander, T., Forns, X., Emerson, S. U., Purcell, R. H. & Bukh, J. Hepatitis C virus envelope protein E2 binds to CD81 of tamarins. *Virology* **277**, 358–367 (2000).
204. Voisset, C. *et al.* Ceramide enrichment of the plasma membrane induces CD81 internalization and inhibits hepatitis C virus entry. *Cellular Microbiology* (2008).
205. Masciopinto, F. *et al.* Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology* **304**, 187–196 (2002).
206. Helle, F. & Dubuisson, J. Hepatitis C virus entry into host cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* (2008).
207. Stamatakis, Z., Grove, J., Balfe, P. & McKeating, J. A. Hepatitis C virus entry and neutralization. *Clin Liver Dis* **12**, 693–712, x (2008).
208. Cocquerel, L., Voisset, C. & Dubuisson, J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* **87**, 1075–84 (2006).

209. Zhang, J. *et al.* CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *Journal of Virology* **78**, 1448–1455 (2004).
210. Rocha-Perugini, V. *et al.* The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* **3**, e1866 (2008).
211. von Lindern, J. J. *et al.* Potential role for CD63 in CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *Journal of Virology* **77**, 3624–3633 (2003).
212. Ho, S. H. *et al.* Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **80**, 6487–6496 (2006).
213. Gordon-Alonso, M. *et al.* Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *Journal of Immunology* **177**, 5129–5137 (2006).
214. Chertova, E. *et al.* Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *Journal of Virology* **80**, 9039–9052 (2006).
215. Nydegger, S. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *The Journal of Cell Biology* (2006).
216. Garcia, E. *et al.* HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* **6**, 488–501 (2005).
217. Li, G., Dziuba, N., Friedrich, B., Murray, J. L. & Ferguson, M. R. A post-entry role for CD63 in early HIV-1 replication. *Virology* **412**, 315–324 (2011).
218. Rubinstein, E. *et al.* CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* **26**, 2657–65 (1996).
219. Angelisova, P., Hilgert, I. & Horejsi, V. Association of 4 Antigens of the Tetraspans Family (Cd37, Cd53, Tapa-1, and R2/C33) with Mhc Class-II Glycoproteins. *Immunogenetics* **39**, 249–256 (1994).
220. Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem* **276**, 40545–54. (2001).
221. Little, K. D., Hemler, M. E. & Stipp, C. S. Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: Central role of CD81 in facilitating GPR56-G alpha(q/11) association. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 2375–2387 (2004).
222. Yauch, R. L., Kazarov, A. R., Desai, B., Lee, R. T. & Hemler, M. E. Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9230–9238 (2000).
223. Charrin, S. *et al.* The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem* **276**, 14329–37 (2001).
224. Charrin, S. *et al.* EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *The Biochemical journal* (2003).
225. Serru, V. *et al.* Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *The Biochemical journal* (1999).
226. Barreiro, O. *et al.* Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *The Journal of Cell Biology* **183**, 527–542 (2008).
227. Kovalenko, O. V., Yang, X., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem J* **377**, 407–17 (2004).
228. Claas, C., Stipp, C. S. & Hemler, M. E. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 7974–7984 (2001).
229. Ono, M. *et al.* GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: Coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochemistry* **40**, 6414–6421 (2001).
230. Charrin, S. *et al.* A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *European Journal of Immunology* **33**, 2479–2489 (2003).
231. Odintsova, E., Voortman, J., Gilbert, E. & Berditchevski, F. Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *Journal of Cell Science* **116**, 4557–4566 (2003).
232. Espenel, C. *et al.* Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *The Journal of Cell Biology* (2008).
233. Charrin, S. *et al.* Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *The Biochemical journal* (2009).
234. Briggs, J. A. G. *et al.* The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure* **14**, 15–20 (2006).
235. Montagnier, L. 25 years after HIV discovery: prospects for cure and vaccine. *Virology* **397**, 248–254 (2010).
236. Peterlin, B. M. & Trono, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 97–107 (2003).
237. Yu, B. *et al.* A new role of the HIV-1 nucleocapsid in the spatiotemporal control of the reverse transcription throughout the virus replication cycle. *Retrovirology* **6**, P14 (2009).
238. Pornillos, O. *et al.* X-ray Structures of the Hexameric Building Block of the HIV Capsid. *Cell* **137**, 1282–1292 (2009).
239. Demirov, D. G., Orenstein, J. M. & Freed, E. O. The Late Domain of Human Immunodeficiency Virus Type 1 p6 Promotes Virus Release in a Cell Type-Dependent Manner. *J Virol* **76**, 105–117 (2002).
240. Bukrinskaya, A. HIV-1 matrix protein: a mysterious regulator of the viral life cycle. *Virus Res.* **124**, 1–11 (2007).
241. Watabe, T. *et al.* X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. *J. Mol. Biol.* **392**, 657–665 (2009).
242. Chan, S. Y. *et al.* V3 recombinants indicate a central role for CCR5 as a coreceptor in tissue infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **73**, 2350–2358 (1999).
243. Sayer, J. M., Agniswamy, J., Weber, I. T. & Louis, J. M. Autocatalytic maturation, physical/chemical properties, and crystal structure of group N HIV-1 protease: relevance to drug resistance. *Protein Sci.* **19**, 2055–2072 (2010).
244. Sarafianos, S. G. *et al.* Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J. Mol. Biol.* **385**, 693–713 (2009).
245. Briones, M. S., Dobard, C. W. & Chow, S. A. Role of human immunodeficiency virus type 1 integrase in uncoating of the viral core. *J. Virol.* **84**, 5181–5190 (2010).
246. Opi, S. *et al.* Tat HIV-1 primary and tertiary structures critical to immune response against non-homologous variants. *J. Biol. Chem.* **277**, 35915–35919 (2002).
247. Hetzer, C., Dormeyer, W., Schnölzer, M. & Ott, M. Decoding Tat: the biology of HIV Tat posttranslational modifications. *Microbes Infect.* **7**, 1364–1369 (2005).
248. Dayton, A. I. MatrIn 3 and HIV Rev regulation of mRNA. *Retrovirology* **8**, 62 (2011).
249. Fackler, O. T. *et al.* Functional characterization of HIV-1 Nef mutants in the context of viral infection. *Virology* **351**, 322–339 (2006).

250. Dubé, M., Bego, M. G., Paquay, C. & Cohen, É. A. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* **7**, 114 (2010).
251. Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. & Greene, W. C. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell* **12**, 591–601 (2003).
252. Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M. & Adachi, A. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Rev. Med. Virol.* **20**, 68–76 (2010).
253. Murray, J. M., Kelleher, A. D. & Cooper, D. A. Timing of the components of the HIV life cycle in productively infected CD4+ T cells in a population of HIV-infected individuals. *J. Virol.* **85**, 10798–10805 (2011).
254. Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* **9**, 853–860 (2003).
255. Sattentau, Q. J. & Weiss, R. A. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* **52**, 631–633 (1988).
256. Wu, L. *et al.* CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179–183 (1996).
257. Lapham, C. K. *et al.* Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* **274**, 602–605 (1996).
258. Finnegan, C. M., Berg, W., Lewis, G. K. & DeVico, A. L. Antigenic properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion. *J. Virol.* **76**, 12123–12134 (2002).
259. Melikyan, G. B. & Chernomordik, L. V. Membrane rearrangements in fusion mediated by viral proteins. *Trends Microbiol.* **5**, 349–355 (1997).
260. Bomsel, M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. Med.* **3**, 42–47 (1997).
261. Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V. & Melikyan, G. B. HIV Enters Cells via Endocytosis and Dynamin-Dependent Fusion with Endosomes. *Cell* **137**, 433–444 (2009).
262. Campbell, E. M., Nunez, R. & Hope, T. J. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J. Virol.* **78**, 5745–5755 (2004).
263. Freed, E. O. HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* **26**, 13–33 (2001).
264. Kogan, M. & Rappaport, J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* **8**, 25 (2011).
265. Laguette, N., Brégnard, C., Benichou, S. & Basmaciogullari, S. Human immunodeficiency virus (HIV) type-1, HIV-2 and simian immunodeficiency virus Nef proteins. *Mol. Aspects Med.* **31**, 418–433 (2010).
266. Strebel, K. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS* **17 Suppl 4**, S25–34 (2003).
267. Strebel, K. HIV accessory genes Vif and Vpu. *Adv. Pharmacol.* **55**, 199–232 (2007).
268. Jouvenet, N. *et al.* Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS biology* (2006).
269. Joshi, A., Ablan, S. D., Soheilian, F., Nagashima, K. & Freed, E. O. Evidence that productive human immunodeficiency virus type 1 assembly can occur in an intracellular compartment. *J Virol* **83**, 5375–87 (2009).
270. Ono, A. Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* (2010).
271. Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5781–5 (1989).
272. Massiah, M. A. *et al.* Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Mol Biol* **244**, 198–223 (1994).
273. Zhou, W., Parent, L. J., Wills, J. W. & Resh, M. D. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol* **68**, 2556–69 (1994).
274. Waheed, A. A. & Freed, E. O. Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. *Virus research* (2009).
275. Jolly, C. & Sattentau, Q. J. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *Journal of Virology* **81**, 7873–7884 (2007).
276. Jouvenet, N., Zhadina, M., Bieniasz, P. D. & Simon, S. M. Dynamics of ESCRT protein recruitment during retroviral assembly. *Nat. Cell Biol.* **13**, 394–401 (2011).
277. Tang, C., Louis, J. M., Aniana, A., Suh, J.-Y. & Clore, G. M. Visualizing transient events in amino-terminal autoprocessing of HIV-1 protease. *Nature* **455**, 693–696 (2008).
278. Tremblay, M. J., Fortin, J. F. & Cantin, R. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol. Today* **19**, 346–351 (1998).
279. Koyanagi, Y. *et al.* Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms. *Science* **236**, 819–822 (1987).
280. Clapham, P. R. & McKnight, A. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J. Gen. Virol.* **83**, 1809–1829 (2002).
281. Levy, J. A. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* **23**, 147–160 (2009).
282. Jiang, C. *et al.* Primary infection by a human immunodeficiency virus with atypical coreceptor tropism. *J. Virol.* **85**, 10669–10681 (2011).
283. Poveda, E., Briz, V., Quiñones-Mateu, M. & Soriano, V. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS* **20**, 1359–1367 (2006).
284. Hladik, F. & McElrath, M. J. Setting the stage: host invasion by HIV. *Nature Reviews Immunology* **8**, 447–457 (2008).
285. Nikolic, D. S. *et al.* HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. *Blood* **118**, 4841–4852 (2011).
286. Davis, D. M. Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 543–555 (2009).
287. Sowinski, S. *et al.* Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat. Cell Biol.* **10**, 211–219 (2008).
288. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871 (1983).
289. Zagury, D. *et al.* HTLV-III in cells cultured from semen of two patients with AIDS. *Science* **226**, 449–451 (1984).
290. Cohen, J. The Duesberg phenomenon. *Science* **266**, 1642–1644 (1994).
291. Andrews, S. Social support as a stress buffer among human immunodeficiency virus-seropositive urban mothers. *Holist Nurs Pract* **10**, 36–43 (1995).
292. Duesberg, P. H. ‘The Duesberg phenomenon’: Duesberg and other voices. *Science* **267**, 313–314; author reply 316 (1995).
293. Clavel, F. *et al.* Molecular cloning and polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **324**, 691–695 (1986).
294. Preston, B. D., Poiesz, B. J. & Loeb, L. A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**, 1168–1171 (1988).

295. Roberts, J. D., Bebenek, K. & Kunkel, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**, 1171–1173 (1988).
296. Plantier, J.-C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* **15**, 871–872 (2009).
297. Montagnier, L. [The immunodeficiency retrovirus in man and primates]. *Bull. Acad. Natl. Med.* **173**, 185–190; discussion 190–191 (1989).
298. Donegan, E., Lenes, B. A., Tomasulo, P. A., Mosley, J. W. & Mosely, J. W. Transmission of HIV-1 by component type and duration of shelf storage before transfusion. *Transfusion* **30**, 851–852 (1990).
299. Coovadia, H. Antiretroviral agents—how best to protect infants from HIV and save their mothers from AIDS. *N. Engl. J. Med.* **351**, 289–292 (2004).
300. Kaplan, E. H. & Heimer, R. HIV incidence among New Haven needle exchange participants: updated estimates from syringe tracking and testing data. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **10**, 175–176 (1995).
301. Varghese, B., Maher, J. E., Peterman, T. A., Branson, B. M. & Steketee, R. W. Reducing the risk of sexual HIV transmission: quantifying the per-act risk for HIV on the basis of partner, sex act, and condom use. *Sex Transm Dis* **29**, 38–43 (2002).
302. Ellery, P. J. *et al.* The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J. Immunol.* **178**, 6581–6589 (2007).
303. Chang, J. J. & Altfield, M. TLR-mediated immune activation in HIV. *Blood* **113**, 269–270 (2009).
304. Stoddart, C. A., Keir, M. E. & McCune, J. M. IFN- α -induced upregulation of CCR5 leads to expanded HIV tropism in vivo. *PLoS Pathog.* **6**, e1000766 (2010).
305. Lehner, T., Wang, Y., Whittall, T. & Seidl, T. Innate immunity and HIV-1 infection. *Adv. Dent. Res.* **23**, 19–22 (2011).
306. Cho, M. W., Shibata, R. & Martin, M. A. Infection of chimpanzee peripheral blood mononuclear cells by human immunodeficiency virus type 1 requires cooperative interaction between multiple variable regions of gp120. *J. Virol.* **70**, 7318–7321 (1996).
307. Garzino-Demo, A. Chemokines and defensins as HIV suppressive factors: an evolving story. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 163–172 (2007).
308. Ji, X., Gewurz, H. & Spear, G. T. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol. Immunol.* **42**, 145–152 (2005).
309. Koning, F. A. *et al.* Correlates of resistance to HIV-1 infection in homosexual men with high-risk sexual behaviour. *AIDS* **18**, 1117–1126 (2004).
310. Goila-Gaur, R. & Strebel, K. HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology* **5**, 51 (2008).
311. Nisole, S., Stoye, J. P. & Saib, A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 799–808 (2005).
312. Andrews, K. T., Haque, A. & Jones, M. K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. *Immunol. Cell Biol.* **90**, 66–77 (2012).
313. Nakayama, E. E. & Shioda, T. Anti-retroviral activity of TRIM5 α . *Rev. Med. Virol.* **20**, 77–92 (2010).
314. Skasko, M. *et al.* HIV-1 Vpu protein antagonizes innate restriction factor BST-2 via lipid-embedded helix-helix interactions. *J. Biol. Chem.* **287**, 58–67 (2012).
315. Kishko, M. *et al.* Genotypic and functional properties of early infant HIV-1 envelopes. *Retrovirology* **8**, 67 (2011).
316. Wu, X., Goebel, R., Wan, X.-F. & Lin, G. Whole genome composition distance for HIV-1 genotyping. *Comput Syst Bioinformatics Conf* 179–190 (2006).
317. Liu, R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367–377 (1996).
318. Rana, S. *et al.* Role of CCR5 in infection of primary macrophages and lymphocytes by macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus: resistance to patient-derived and prototype isolates resulting from the delta ccr5 mutation. *J. Virol.* **71**, 3219–3227 (1997).
319. Oh, D.-Y. *et al.* CCR5Delta32 genotypes in a German HIV-1 seroconverter cohort and report of HIV-1 infection in a CCR5Delta32 homozygous individual. *PLoS ONE* **3**, e2747 (2008).
320. Lewin, S. R. & Rouzioux, C. HIV cure and eradication: how will we get from the laboratory to effective clinical trials? *AIDS* **25**, 885–897 (2011).
321. Celum, C. L. HIV preexposure prophylaxis: new data and potential use. *Top Antivir Med* **19**, 181–185 (2011).
322. Hayden, E. C. HIV drug-prevention strategy carries risks. *Nature* **476**, 260–261 (2011).
323. Cohen, M. S. & Baden, L. R. Preexposure prophylaxis for HIV—where do we go from here? *N. Engl. J. Med.* **367**, 459–461 (2012).
324. Richman, D. D. The treatment of HIV infection. Azidothymidine (AZT) and other new antiviral drugs. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2**, 397–407 (1988).
325. De Clercq, E. Human viral diseases: what is next for antiviral drug discovery? *Current opinion in virology* (2012).doi:10.1016/j.coviro.2012.07.004
326. Bower, M. *et al.* Highly active anti-retroviral therapy (HAART) prolongs time to treatment failure in Kaposi's sarcoma. *AIDS* **13**, 2105–2111 (1999).
327. Perry, C. M. Maraviroc: a review of its use in the management of CCR5-tropic HIV-1 infection. *Drugs* **70**, 1189–1213 (2010).
328. Tilton, J. C. & Doms, R. W. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res.* **85**, 91–100 (2010).
329. Nguyen, B.-Y. T. *et al.* Raltegravir: the first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor in the HIV armamentarium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1222**, 83–89 (2011).
330. Matalon, S., Rasmussen, T. A. & Dinarello, C. A. Histone deacetylase inhibitors for purging HIV-1 from the latent reservoir. *Mol. Med.* **17**, 466–472 (2011).
331. Pettersen, F. O. *et al.* An exploratory trial of cyclooxygenase type 2 inhibitor in HIV-1 infection: downregulated immune activation and improved T cell-dependent vaccine responses. *J. Virol.* **85**, 6557–6566 (2011).
332. Martin, G. *et al.* Stabilization of HIV-1 envelope in the CD4-bound conformation through specific cross-linking of a CD4 mimetic. *J. Biol. Chem.* **286**, 21706–21716 (2011).
333. Da, L. & Wu, Y.-D. Theoretical studies on the interactions and interferences of HIV-1 glycoprotein gp120 and its coreceptor CCR5. *J Chem Inf Model* **51**, 359–369 (2011).
334. Hanna, G. J. *et al.* Antiviral activity, pharmacokinetics, and safety of BMS-488043, a novel oral small-molecule HIV-1 attachment inhibitor, in HIV-1-infected subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 722–728 (2011).
335. Westby, M. *et al.* Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J. Virol.* **81**, 2359–2371 (2007).
336. Tenorio, A. R. The monoclonal CCR5 antibody PRO-140: the promise of once-weekly HIV therapy. *Curr HIV/AIDS Rep* **8**, 1–3 (2011).
337. Karlsson Hedestam, G. B. *et al.* The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 143–155 (2008).
338. Suzuki, K., Sterba, R. E. & Sheetz, M. P. Outer membrane monolayer domains from two-dimensional surface scanning resistance measurements. *Biophys. J.* **79**, 448–459 (2000).

339. Cairo, C. W. *et al.* Dynamic regulation of CD45 lateral mobility by the spectrin-ankyrin cytoskeleton of T cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 11392–11401 (2010).
340. Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* **2**, 905–909 (2005).
341. Ha, T. & Tinnefeld, P. Photophysics of fluorescent probes for single-molecule biophysics and super-resolution imaging. *Annu Rev Phys Chem* **63**, 595–617 (2012).
342. Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A. & Dahan, M. Probing cellular events, one quantum dot at a time. *Nat Meth* **7**, 275–85 (2010).
343. O'Hare, H. M., Johnsson, K. & Gautier, A. Chemical probes shed light on protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 488–494 (2007).
344. Lippincott-Schwartz, J. & Patterson, G. H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* **300**, 87–91 (2003).
345. Delaguillamie, A. *et al.* Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *Journal of Cell Science* **117**, 5269–5282 (2004).
346. White, J. G., Squirrell, J. M. & Eliceiri, K. W. Applying multiphoton imaging to the study of membrane dynamics in living cells. *Traffic* **2**, 775–780 (2001).
347. Joubert, J. & Sharma, D. Light microscopy digital imaging. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 2**, Unit2.3 (2011).
348. Kishimoto, S. Pulse-height measurements with a cooled avalanche-photodiode detector. *J Synchrotron Radiat* **5**, 883–885 (1998).
349. Ohsugi, Y., Saito, K., Tamura, M. & Kinjo, M. Lateral mobility of membrane-binding proteins in living cells measured by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **91**, 3456–3464 (2006).
350. Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* **17**, 549–560 (1905).
351. Peters, R., Peters, J., Tews, K. H. & Bahr, W. Microfluorimetric Study of Translational Diffusion in Erythrocyte-Membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* **367**, 282–294 (1974).
352. Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. & Webb, W. W. Mobility Measurement by Analysis of Fluorescence Photobleaching Recovery Kinetics. *Biophysical Journal* **16**, 1055–1069 (1976).
353. Salomé, L., Cazeils, J. L., Lopez, A. & Tocanne, J. F. Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. *Eur. Biophys. J.* **27**, 391–402 (1998).
354. Baker, A.-M. *et al.* CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells. A fluorescence recovery after photobleaching at variable radii approach. *J. Biol. Chem.* **282**, 35163–35168 (2007).
355. Goodwin, J. S. & Kenworthy, A. K. Photobleaching approaches to investigate diffusional mobility and trafficking of Ras in living cells. *Methods* **37**, 154–164 (2005).
356. Elson, E. L. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophys. J.* **101**, 2855–2870 (2011).
357. Ruan, Q., Cheng, M. A., Levi, M., Gratton, E. & Mantulin, W. W. Spatial-temporal studies of membrane dynamics: scanning fluorescence correlation spectroscopy (SFCs). *Biophys. J.* **87**, 1260–1267 (2004).
358. Nohe, A. & Petersen, N. O. Image correlation spectroscopy. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2007**, pl7 (2007).
359. Digman, M. A. & Gratton, E. Scanning image correlation spectroscopy. *Bioessays* **34**, 377–385 (2012).
360. Pertsinidis, A., Zhang, Y. & Chu, S. Subnanometre single-molecule localization, registration and distance measurements. *Nature* **466**, 647–651 (2010).
361. Cheezum, M. K., Walker, W. F. & Guilford, W. H. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophysical Journal* **81**, 2378–2388 (2001).
362. Thompson, R. E., Larson, D. R. & Webb, W. W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal* **82**, 2775–2783 (2002).
363. Schmidt, T., Schutz, G. J., Baumgartner, W., Gruber, H. J. & Schindler, H. Characterization of Photophysics and Mobility of Single Molecules in a Fluid Lipid-Membrane. *Journal of Physical Chemistry* **99**, 17662–17668 (1995).
364. Saxton, M. J. & Jacobson, K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* (1997).
365. Ritchie, K. *et al.* Detection of Non-Brownian Diffusion in the Cell Membrane in Single Molecule Tracking. *Biophys. J.* **88**, 2266–2277 (2005).
366. Saxton, M. J. Single-particle tracking: the distribution of diffusion coefficients. *Biophysical Journal* (1997).
367. Schütz, G. J., Schindler, H. & Schmidt, T. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophysical Journal* (1997).
368. Lommerse, P. H. M. *et al.* Single-molecule imaging of the H-ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane. *Biophysical Journal* **86**, 609–616 (2004).
369. Lommerse, P. H. M. Single-molecule diffusion measurements of H-Ras at the plasma membrane of live cells reveal microdomain localization upon activation. *Journal of Cell Science* **118**, 1799–1809 (2005).
370. Lommerse, P. H. *et al.* Single-molecule diffusion reveals similar mobility for the Lck, H-ras, and K-ras membrane anchors. *Biophys J* **91**, 1090–7 (2006).
371. Dahan, M. *et al.* Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science (New York, NY)* **302**, 442–445 (2003).
372. Huet, S. *et al.* Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics. *Biophysical Journal* **91**, 3542–3559 (2006).
373. Bouzigues, C. & Dahan, M. Transient directed motions of GABA(A) receptors in growth cones detected by a speed correlation index. *Biophysical Journal* (2007).
374. Bouzigues, C., Morel, M., Triller, A. & Dahan, M. Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11251–6 (2007).
375. Simson, R., Sheets, E. D. & Jacobson, K. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys. J.* **69**, 989–993 (1995).
376. Meilhac, N., Le Guyader, L., Salome, L. & Destainville, N. Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **73**, 011915 (2006).
377. Voisinne, G., Alexandrou, A. & Masson, J.-B. Quantifying biomolecule diffusivity using an optimal Bayesian method. *Biophys. J.* **98**, 596–605 (2010).
378. Rajani, V., Carrero, G., Golan, D. E., de Vries, G. & Cairo, C. W. Analysis of molecular diffusion by first-passage time variance identifies the size of confinement zones. *Biophys. J.* **100**, 1463–1472 (2011).
379. Jacobson, K., Ishihara, A. & Inman, R. Lateral diffusion of proteins in membranes. *Annu. Rev. Physiol.* **49**, 163–175 (1987).
380. Sheets, E. D., Lee, G. M., Simson, R. & Jacobson, K. Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. *Biochemistry* **36**, 12449–58 (1997).

381. Simson, R. *et al.* Structural mosaicism on the submicron scale in the plasma membrane. *Biophysical Journal* (1998).
382. Dietrich, C., Yang, B., Fujiwara, T., Kusumi, A. & Jacobson, K. Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. *Biophys J* **82**, 274–84 (2002).
383. Lenne, P.-F. *et al.* Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *The EMBO Journal* (2006).
384. Shvartsman, D. E., Kotler, M., Tall, R. D., Roth, M. G. & Henis, Y. I. Differently anchored influenza hemagglutinin mutants display distinct interaction dynamics with mutual rafts. *Journal of Cell Biology* **163**, 879–888 (2003).
385. Shvartsman, D. E., Gutman, O., Tietz, A. & Henis, Y. I. Cyclodextrins but not Compactin Inhibit the Lateral Diffusion of Membrane Proteins Independent of Cholesterol. *Traffic* **7**, 917–926 (2006).
386. Kenworthy, A. K. *et al.* Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *Journal of Cell Biology* **165**, 735–746 (2004).
387. Kwik, J. *et al.* Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13964–9 (2003).
388. Nishimura, S. Y. *et al.* Diffusion of lipid-like single-molecule fluorophores in the cell membrane. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys* **110**, 8151–7 (2006).
389. Vrljic, M., Nishimura, S., Moerner, W. & McConnell, H. Cholesterol Depletion Suppresses the Translational Diffusion of Class II Major Histocompatibility Complex Proteins in the Plasma Membrane. *Biophysical Journal* **88**, 334–347 (2005).
390. Mascialchi, P., Lamort, A. S., Salomé, L. & Dumas, F. Single Particle Tracking reveals two distinct environments for CD4 receptors at the surface of living T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 409–413 (2012).
391. Morone, N. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *The Journal of Cell Biology* (2006).
392. Sako, Y. & Kusumi, A. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.* **125**, 1251–1264 (1994).
393. Sako, Y. & Kusumi, A. Barriers for lateral diffusion of transferrin receptor in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether. *J. Cell Biol.* **129**, 1559–1574 (1995).
394. Tomishige, M., Sako, Y. & Kusumi, A. Regulation mechanism of the lateral diffusion of band 3 in erythrocyte membranes by the membrane skeleton. *The Journal of Cell Biology* **142**, 989–1000 (1998).
395. Umemura, Y. M. *et al.* Both MHC class II and its GPI-anchored form undergo hop diffusion as observed by single-molecule tracking. *Biophys. J.* **107**, 123018 (2008).
396. Suzuki, K. G. *et al.* GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1. *The Journal of Cell Biology* (2007).
397. Lampe, M. *et al.* Double-labelled HIV-1 particles for study of virus-cell interaction. *Virology* **360**, 92–104 (2007).
398. Joo, K.-I. *et al.* Site-specific labeling of enveloped viruses with quantum dots for single virus tracking. *ACS Nano* **2**, 1553–1562 (2008).
399. Arhel, N. *et al.* Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat. Methods* **3**, 817–824 (2006).
400. Trister, A. D. & Hammer, D. A. Role of gp120 trimerization on HIV binding elucidated with Brownian adhesive dynamics. *Biophys. J.* **95**, 40–53 (2008).
401. Nguyen, D. H., Giri, B., Collins, G. & Taub, D. D. Dynamic reorganization of chemokine receptors, cholesterol, lipid rafts, and adhesion molecules to sites of CD4 engagement. *Exp. Cell Res.* **304**, 559–569 (2005).
402. Coleman, C. M. & Wu, L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* **6**, 51 (2009).
403. SchötteIndreier, H., Mayr, G. W. & Guse, A. H. Beta1-integrins mediate Ca²⁺-signalling and T cell spreading via divergent pathways. *Cell. Signal.* **11**, 611–619 (1999).
404. Douglass, A. D. & Vale, R. D. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* **121**, 937–950 (2005).
405. Carlson, L.-A. *et al.* Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host Microbe* **4**, 592–599 (2008).
406. Gladnikoff, M., Shimoni, E., Gov, N. S. & Rousso, I. Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophysical Journal* (2009).
407. Courty, S., Luccardini, C., Bellaiche, Y., Cappello, G. & Dahan, M. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging. *Nano Lett.* **6**, 1491–1495 (2006).
408. Rhee, S. S., Hui, H. X. & Hunter, E. Preassembled capsids of type D retroviruses contain a signal sufficient for targeting specifically to the plasma membrane. *J. Virol.* **64**, 3844–3852 (1990).
409. Kaplan, A. H. Assembly of the HIV-1 core particle. *AIDS Rev* **4**, 104–111 (2002).
410. Müller, B. *et al.* Construction and characterization of a fluorescently labeled infectious human immunodeficiency virus type 1 derivative. *Journal of Virology* **78**, 10803–10813 (2004).
411. Larson, D. R., Johnson, M. C., Webb, W. W. & Vogt, V. M. Visualization of retrovirus budding with correlated light and electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15453–15458 (2005).
412. Ni Choileain, S. & Astier, A. L. CD46 processing: a means of expression. *Immunobiology* **217**, 169–175 (2012).
413. Kirkitadze, M. D. & Barlow, P. N. Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation. *Immunol Rev* **180**, 146–61 (2001).
414. Lozahic, S. *et al.* CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol* **30**, 900–7 (2000).
415. Mikesch, J.-H. *et al.* The expression and action of decay-accelerating factor (CD55) in human malignancies and cancer therapy. *Cell. Oncol.* **28**, 223–232 (2006).
416. Kuttner-Kondo, L., Medof, M. E., Brodbeck, W. & Shoham, M. Molecular modeling and mechanism of action of human decay-accelerating factor. *Protein Eng.* **9**, 1143–1149 (1996).
417. Saifuddin, M. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 incorporates both glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD55 and CD59 and integral membrane CD46 at levels that protect from complement-mediated destruction. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt 8), 1907–1911 (1997).
418. Dietrich, C., Volovyk, Z. N., Levi, M., Thompson, N. L. & Jacobson, K. Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2001).

419. Holm, K., Weclawicz, K., Hewson, R. & Suomalainen, M. Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J. Virol.* **77**, 4805–4817 (2003).
420. Jolly, C. & Sattentau, Q. J. Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J. Virol.* **79**, 12088–12094 (2005).
421. Nguyen, D. H. & Hildreth, J. E. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* **74**, 3264–72. (2000).
422. Ono, A. & Freed, E. O. Role of lipid rafts in virus replication. *Adv. Virus Res.* **64**, 311–358 (2005).
423. Giocondi, M.-C., Milhiet, P. E., Dosset, P. & Le Grimellec, C. Use of cyclodextrin for AFM monitoring of model raft formation. *Biophysical Journal* (2004).
424. Patzer, E. J. & Wagner, R. R. Cholesterol oxidase as a probe for studying membrane organisation. *Nature* **274**, 394–395 (1978).
425. Ahn, K. & Sampson, N. S. Cholesterol oxidase senses subtle changes in lipid bilayer structure. *Biochemistry* **43**, 827–836 (2004).
426. JablOñski, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* **131**, 839–840 (1933).
427. Schwille, P., Korlach, J. & Webb, W. W. Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometry* (1999).
428. Zinchuk, V., Zinchuk, O. & Okada, T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem* **40**, 101–111 (2007).
429. Kremontsov, D. N. *et al.* HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic* **11**, 1401–14 (2010).
430. Grigorov, B. *et al.* A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology* **6**, 28 (2009).
431. Epand, R. M. Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1576–82 (2008).
432. Gómez-Mouton, C. *et al.* Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9642–9647 (2001).
433. Röper, K., Corbeil, D. & Huttner, W. B. Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane. *Nat. Cell Biol.* **2**, 582–592 (2000).
434. Mazurov, D., Heidecker, G. & Derse, D. The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 3896–903 (2007).
435. Mazurov, D., Heidecker, G. & Derse, D. HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology* **346**, 194–204 (2006).
436. Hogue, I. B., Grover, J. R., Soheilian, F., Nagashima, K. & Ono, A. Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J. Virol.* **85**, 9749–9766 (2011).
437. Hogue, I. B., Llewellyn, G. N. & Ono, A. Dynamic Association between HIV-1 Gag and Membrane Domains. *Mol. Biol. Int.* **2012**, (2012).
438. Montefiori, D. C. *et al.* Complement control proteins, CD46, CD55, and CD59, as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection. *Virology* **205**, 82–92 (1994).
439. Sullivan, B. L. *et al.* Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. *J. Immunol.* **157**, 1791–1798 (1996).
440. Hammarstedt, M., Wallengren, K., Pedersen, K. W., Roos, N. & Garoff, H. Minimal exclusion of plasma membrane proteins during retroviral envelope formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7527–7532 (2000).
441. Schreiner, C. L. *et al.* Isolation and characterization of Chinese hamster ovary cell variants deficient in the expression of fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* **109**, 3157–3167 (1989).
442. Schreiner, C. L., Fisher, M., Bauer, J. & Juliano, R. L. Defective vasculature in fibronectin-receptor-deficient CHO cell tumors in nude mice. *Int. J. Cancer* **55**, 436–441 (1993).
443. Sala-Valdes, M. EWI-2 and EWI-F Link the Tetraspanin Web to the Actin Cytoskeleton through Their Direct Association with Ezrin-Radixin-Moesin Proteins. *Journal of Biological Chemistry* (2006).
444. Petrásek, J. & Schwarzerová, K. Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 728–734 (2009).
445. Meiri, D. *et al.* Mechanistic insight into the microtubule and actin cytoskeleton coupling through dynein-dependent RhoGEF inhibition. *Mol. Cell* **45**, 642–655 (2012).
446. Stephens, D. J. Functional coupling of microtubules to membranes - implications for membrane structure and dynamics. *J. Cell. Sci.* **125**, 2795–2804 (2012).
447. Shoji, K., Ohashi, K., Sampei, K., Oikawa, M. & Mizuno, K. Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin-cofilin interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **424**, 52–57 (2012).
448. Spector, I., Shochet, N. R., Kashman, Y. & Groweiss, A. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* **219**, 493–5 (1983).
449. Thyberg, J. & Moskalewski, S. Subpopulations of microtubules with differential sensitivity to nocodazole: role in the structural organization of the Golgi complex and the lysosomal system. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **21**, 259–274 (1989).
450. Seigneuret, M. & Garnier-Suillerot, A. A structural model for the open conformation of the mdr1 P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure. *J. Biol. Chem.* **278**, 30115–24 (2003).
451. Kovalenko, O. V., Metcalf, D. G., DeGrado, W. F. & Hemler, M. E. Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Struct. Biol.* **5**, 11 (2005).
452. Jolly, C. & Sattentau, Q. J. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J. Virol.* **81**, 7873–7884 (2007).
453. Tsai, Y. C. & Weissman, A. M. Dissecting the diverse functions of the metastasis suppressor CD82/KAI1. *FEBS Lett.* **585**, 3166–3173 (2011).
454. Lagaudrière-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Hubeau, C., Fradelizi, D. & Conjeaud, H. Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation. *European Journal of Immunology* **28**, 4332–4344 (1998).
455. Delaguillaumie, A. *et al.* Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J. Cell. Sci.* **117**, 5269–5282 (2004).
456. Swamy, M. J. *et al.* Coexisting Domains in the Plasma Membranes of Live Cells Characterized by Spin-Label ESR Spectroscopy. *Biophys. J.* **90**, 4452–4465 (2006).
457. Nohe, A., Keating, E., Fivaz, M., van der Goot, F. G. & Petersen, N. O. Dynamics of GPI-anchored proteins on the surface of living cells. *Nanomedicine* **2**, 1–7 (2006).
458. Orr, G. *et al.* Cholesterol dictates the freedom of EGF receptors and HER2 in the plane of the membrane. *Biophys. J.* **89**, 1362–73 (2005).

459. Saffman, P. G. & Delbruck, M. Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3111–3 (1975).
460. Shoham, T., Rajapaksa, R., Kuo, C.-C., Haimovich, J. & Levy, S. Building of the tetraspanin web: distinct structural domains of CD81 function in different cellular compartments. *Mol. Cell Biol.* **26**, 1373–1385 (2006).
461. Montpellier, C. *et al.* Interacting regions of CD81 and two of its partners, EWI-2 and EWI-2wint, and their effect on hepatitis C virus infection. *The Journal of biological chemistry* (2011).
462. Rey, O., Canon, J. & Krogstad, P. HIV-1 Gag protein associates with F-actin present in microfilaments. *Virology* **220**, 530–534 (1996).
463. Liu, B. *et al.* Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid with actin. *J. Virol.* **73**, 2901–2908 (1999).
464. Gladnikoff, M., Shimoni, E., Gov, N. S. & Rouso, I. Retroviral assembly and budding occur through an actin-driven mechanism. *Biophys. J.* **97**, 2419–2428 (2009).
465. Gordón-Alonso, M. *et al.* EWI-2 association with α -actinin regulates T cell immune synapses and HIV viral infection. *J. Immunol.* **189**, 689–700 (2012).
466. Jégou, A. *et al.* CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10946–10951 (2011).
467. Scarselli, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo Journal* **21**, 5017–5025 (2002).
468. Evans, M. J. *et al.* Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* **446**, 801–805 (2007).
469. Marguet, D., Lenne, P. F., Rigneault, H. & He, H. T. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J* **25**, 3446–57 (2006).
470. Espenel, C. *et al.* Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J Cell Biol* **182**, 765–76 (2008).
471. Eggeling, C. *et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 1159–62 (2009).
472. Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A. & Dahan, M. Probing cellular events, one quantum dot at a time. *Nature Methods* (2010).
473. Saxton, M. J. & Jacobson, K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **26**, 373–399 (1997).
474. Simson, R., Sheets, E. D. & Jacobson, K. Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys. J.* **69**, 989–993 (1995).
475. Suzuki, K. G. *et al.* GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1. *The Journal of Cell Biology* **177**, 717–730 (2007).
476. Sergé, A., Bertaux, N., Rigneault, H. & Marguet, D. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat Meth* **5**, 687–694 (2008).
477. Bates, I. R. *et al.* Membrane Lateral Diffusion and Capture of CFTR within Transient Confinement Zones. *Biophys. J.* **91**, 1046–1058 (2006).
478. Bouzigues, C. & Dahan, M. Transient Directed Motions of GABAA Receptors in Growth Cones Detected by a Speed Correlation Index. *Biophys. J.* **92**, 654–660 (2007).
479. Meilhac, N., Le Guyader, L., Salome, L. & Destainville, N. Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **73**, 011915 (2006).
480. Schutz, G. J., Schindler, H. & Schmidt, T. Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys J* **73**, 1073–80 (1997).
481. Krogh, A. What are artificial neural networks? *Nat Biotechnol* **26**, 195–7 (2008).
482. Rumelhart, D. E., Hilton, G. E. & Williams, R. J. Learning representations by back-propagating errors. *Nature* 533–536 (1986).
483. Qian, H., Sheetz, M. P. & Elson, E. L. Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J* **60**, 910–21 (1991).
484. Kusumi, A., Sako, Y. & Yamamoto, M. Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* **65**, 2021–40 (1993).
485. Lagache, T., Dauty, E. & Holcman, D. Physical principles and models describing intracellular virus particle dynamics. *Current Opinion in Microbiology* (2009).
486. Ruthardt, N., Lamb, D. C. & Bräuchle, C. Single-particle Tracking as a Quantitative Microscopy-based Approach to Unravel Cell Entry Mechanisms of Viruses and Pharmaceutical Nanoparticles. *Molecular Therapy* (2009).
487. Ewers, H. *et al.* Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15110–5 (2005).
488. Basyuk, E. *et al.* Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* **5**, 161–74 (2003).
489. Charrin, S. *et al.* Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *The Biochemical journal* **420**, 133–154 (2009).
490. Kremontsov, D. N. *et al.* HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic* **11**, 1401–1414 (2010).
491. Qian, N. & Sejnowski, T. J. Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models. *J. Mol. Biol.* **202**, 865–884 (1988).
492. Ehrensperger, M., Hanus, C., Vannier, C., Triller, A. & Dahan, M. Multiple Association States between Glycine Receptors and Gephyrin Identified by SPT Analysis. *Biophysical Journal* **92**, 3706–3718 (2007).
493. Helmuth, J. A., Burckhardt, C. J., Koumoutsakos, P., Greber, U. F. & Sbalzarini, I. F. A novel supervised trajectory segmentation algorithm identifies distinct types of human adenovirus motion in host cells. *J Struct Biol* **159**, 347–58 (2007).
494. Jin, S. & Verkman, A. S. Single particle tracking of complex diffusion in membranes: simulation and detection of barrier, raft, and interaction phenomena. *J Phys Chem B* **111**, 3625–3632 (2007).
495. Manley, S. *et al.* High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods* **5**, 155–7 (2008).
496. Wieser, S., Moertelmaier, M., Fuertbauer, E., Stockinger, H. & Schutz, G. (Un)Confined Diffusion of CD59 in the Plasma Membrane Determined by High-Resolution Single Molecule Microscopy. *Biophysical Journal* **92**, 3719–3728 (2007).
497. Charrin, S. *et al.* EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* **373**, 409–21 (2003).
498. Segura-Morales, C. *et al.* Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *J Biol Chem* **280**, 27004–12 (2005).

Annexes

D) Article n°3

Il est important de noter que l'article qui suit est une ébauche de publication qui n'a pas encore été examinée par nos différents collaborateurs. Par conséquent, bien que le message général et les informations principales de ce papier ne doivent que peu changer, le choix et la présentation des résultats ainsi que de la discussion sont susceptibles de subir un certain nombre de modifications. L'examen de ce manuscrit et les débats à venir durant la soutenance de la thèse seront donc des étapes particulièrement utiles pour améliorer la pertinence et la qualité de cette publication.

Automatic detection of diffusion modes using neural networks in single molecule tracking experiments in living cells

Patrice Dosset^{1,2}, Patrice Rassam^{1,2,¶}, Cedric Espenel^{1,2,¶}, Eric Rubinstein^{3,4}, Emmanuel Margeat^{1,2} and Pierre-Emmanuel Milhiet^{1,2,*}

¹ Inserm, Unité 1054, Montpellier, France

² Université de Montpellier, CNRS, UMR 5048, Centre de Biochimie Structurale, Montpellier, France

³ Inserm, U602, Villejuif, France

⁴ Université Paris 11, Institut André Lwoff, Villejuif, France

* To whom correspondence should be addressed: pem@cbs.cnrs.fr, Centre de Biochimie Structurale, 29, rue de Navacelles, 34090, Montpellier, France: Phone: (33) 4 67 41 79 17; Fax: (33) 4 67 41 79 13.

¶ The two authors have equally contributed to this work

Key words: single molecule tracking, membrane, diffusion, trajectory, neural network

Abstract

Dynamics of components is a key feature of biological membrane and single molecule tracking experiments using fluorescence microscopy is now recognized as a very powerful technique to probe dynamics of membrane components in living cells. Analysis of recorded trajectories is therefore a key step to decipher both spatial and temporal dynamics of single molecule diffusing within biological membranes. Here we developed a new algorithm based on back-propagation neural network allowing automatic detection of Brownian, confined and directed motion modes within a trajectory. The ability of the software to accurately detect different diffusion modes was first established on simulated data and then evaluated on trajectories recorded from fluorescently labelled molecules in two different biological systems.

I. INTRODUCTION

A. Tracking and analysis of membrane components

Diffusion and partition of membrane components into specialized areas are most probably key events in cell function, especially their lateral segregation and organization into micro or nanodomains. Different domains have been characterized at the cell surface involving lipid-protein-protein interactions and most of them are enriched in specific lipids such as sphingolipids and cholesterol that have been proposed to create peculiar physical properties within membranes (liquid ordered phase). Cytoskeleton could also play an important role in membrane lateral segregation by creating compartments delineated by actin-anchored proteins. In order to understand the molecular mechanisms underlying this lateral segregation, dynamics of membrane components, mostly that of membrane proteins, has been investigated in living cells. To do so, the most popular techniques are fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), fluorescence correlation spectroscopy (FCS), and single molecule tracking (SMT)(reviewed in ⁴⁷¹). However, because molecular events that are associated to membrane dynamics are spatially and temporally heterogeneous, SMT remains especially interesting. Thanks to the development of highly sensitive camera and high numerical aperture objectives, it is now possible to track single molecule within membranes and to analyze their motion. Molecules are classically labelled with stable fluorescent probes such as Atto647N (e.g. ^{472,473} or with stable colloid beads such as semiconductor quantum dots ⁴⁷⁴ allowing direct visualization of the diffusing molecule and the reconstruction of their trajectory, frame per frame.

An important part in SMT experiments consists in the analysis of diffusion of a large number of molecules in order to properly described the stochastic behaviour of membrane proteins and to obtain statistically significant results. Such an analysis allows extracting physical parameters from trajectories describing the behaviour of diffusing molecules, i.e. diffusion coefficient, velocity and mode of motion. It is now consensual that diffusion of membrane proteins in cell membranes is not limited to pure Brownian diffusion and two other modes of motion have been identified within membranes so far, namely directed and confined that includes tethered diffusion or diffusion in the presence of obstacles ⁴⁷⁵. In addition numerous studies have highlighted that single molecules could present complex behaviour, namely a combination of different modes of diffusion described above. It was early described by the group of Jacobson that the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein Thy1 could be transiently confined in specific areas identified as raft microdomain, these confinement alternating with Brownian diffusion ⁴⁷⁶.

More recently, a similar behaviour was observed for with another GPI-anchored proteins (CD59) that can be transiently trapped in confinement zones named STALL (Stimulation-Induced Temporary Arrest of Lateral Diffusion)⁴⁷⁷. A combination of confined and Brownian diffusion modes within a trajectory has also been observed for transmembrane proteins such as tetraspanins (Espenel et al., 2008), epidermal growth factor (EGF) receptor⁴⁷⁸ and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) channel⁴⁷⁹. In addition transient directed motion was observed for gamma amino butyric acid (GABA) receptors in nerve growth cones⁴⁸⁰.

Most of the times, the analysis of diffusion in SMT experiments is performed by connecting the dots into a trajectory and by plotting the mean-square displacement (MSD) $\langle r^2 \rangle$ versus time lag. From this plot, it is not straightforward to identify different modes of diffusion within a trajectory and a few methods have been developed to discriminate them. In order to detect temporary lateral confinements, Jacobson's group has developed an algorithm based on the determination of a confinement index that corresponds to the probability that a given protein with diffusion coefficient D will stay in a region of radius R for a period of time t ⁴⁷⁶(see also an improvement of this method, Meilhac et al., 2006). An algorithm to detect transient directed motion has also been developed by Dahan's group. It consists in the determination of a speed correlation index, based on the fact that temporal correlations of the speed exist in directed motions whereas they vanish on average for a purely Brownian motion⁴⁸⁰. In both techniques a sliding time window is used to achieve a local analysis. The presence of multiple diffusion regimes within a trajectory can also be determined by analyzing the probability distribution of square displacement (PDS_D)⁴⁸². In this case, PDS_D describes the probability that a particle will be found within a circle of radius r at time t . However, with this technique, it is impossible to know when and where the change in the diffusion mode occurs.

B. Neural network approach

In this paper we present a new approach to automatically discriminate between different modes of membrane diffusion within a trajectory using back-propagation neural network (BPNN). BPNN is the most widely used type of artificial neural networks (reviewed in Krogh, 2008) and typically consists in many simple processing elements called neurons grouped in layers and connected by interconnections called synapses (Fig. 1).

Neural network was trained using simulated Brownian, confined or directed trajectories and the validity of the algorithm in identifying different motion modes was achieved using synthetic data and trajectories of a human virus-like particle and a transmembrane protein diffusing at the plasma membrane of living cells.

II. RESULTS AND DISCUSSION

A. Backpropagation Neural Networks architecture

A BPNN was created with one hidden layer between input and output units (Fig. 1). All nodes of a layer were connected to all the nodes in the adjacent layers. The BPNN included two working phases, the learning and the recall phase. During the learning phase, known data sets were used as a training signal in input and output layers. The first operation for the learning phase is the feed forward operation. During this operation, each input neuron receives an input signal and broadcasts this signal to the connected neurons in the hidden layer. Each neuron in the hidden layer computes its activation and sends its result to the output neuron. The recall phase is performed in one pass using the weight obtained in the learning phase. Mathematically, a 3-layer BPNN with m , n , and p , the number of input, hidden and output nodes, respectively, is based on the following equation:

$$O_k = f\left(\sum_{j=1}^n W_{jk} * f\left(\sum_{i=1}^m W_{ij} X_i\right)\right) \quad (1)$$

where O_k is the calculated output of the k^{th} neuron in the output layer, X_i the input values of the network, W_{ij} the connection weight from node i of the input layer to node j of the hidden layer, W_{jk} the connection weight from node j of the hidden layer to node k of the output layer, $f(\cdot)$ is the activation function of the neuron which is classically a sigmoid function as defined in Eq. (2).

$$f(x) = \frac{1}{1 + e^{-x}} \quad (2)$$

The [target outputs](#) from each [training pattern](#) are compared with the actual [activation levels](#) of the [output units](#) and the difference between the two determines the system error (Eq. 3).

$$E = 0.5 \sum_{k=1}^p (O_k - T_k)^2 \quad (3)$$

where p is the number of output neurons, O_k and T_k are respectively the calculated output and the target output of the k^{th} neuron in the output layer.

The second operation for the learning phase is the backward pass in which a gradient descent method is used to minimize the total error on patterns in the training set. Starting from the output layer, the error is backward propagated through the network, layer by layer, by recursively computing the local gradient of each neuron. The connection weight is then changed in proportion to the negative of an error derivative using the following equation:

$$\Delta W_{i,j}(t+1) = -\eta \frac{\partial E}{\partial W_{i,j}} + \alpha \Delta W_{i,j}(t) \quad (5)$$

where $\Delta W_{i,j}(t+1)$ is the weight increment minimizing E between the j^{th} neuron and the i^{th} neuron at the $(t+1)^{\text{th}}$ iteration. η is the learning rate and α is the momentum parameter. α is chosen between 0 and 1, typically 0.9, a value allowing high learning rates⁴⁸⁴. Using a momentum term is the simplest method to avoid oscillations problems during the search for the minimum value of the error surface. This forward-backward process is repeated for each input.

The BPNN is trained by repeatedly presenting a series of input/output pattern sets to the network until the mean squared error (MSE) falls below a predefined tolerance level or until the maximum number of iterations is achieved (Eq. 6).

$$\text{MSE} = \frac{1}{n_x p} \sum_{l=1}^n \sum_{k=1}^p (T_{lk} - O_{lk})^2 \quad (6)$$

where n is the number of input vector, p is the number of output neurons. O_{lk} and T_{lk} respectively denote the calculated output and the desired output of the k^{th} neuron when the input vector l is applied to the network. The recall phase is performed by one pass using the weight obtained in the learning phase.

B. System architecture and algorithm

Analysis of the trajectory is performed by plotting the MSD versus time lag according to the equation:

$$\text{MSD}(n\delta t) = \frac{1}{N-1-n} \sum_{j=1}^{N-1-n} \left\{ \left[x(j\delta t+n\delta t) - x(j\delta t) \right]^2 + \left[y(j\delta t+n\delta t) - y(j\delta t) \right]^2 \right\}$$

where δt is the time interval between two successive frames, $x(t)$ and $y(t)$ are the particle coordinates at time t , N is the total number of frames and n is the number of time intervals^{485,486} (for more details, see the Methods section). For Brownian motion, the MSD curve increases linearly with time increment δt , whereas it exhibits an upward or downward curvature for directed or confined motion.

In our system, the shape is used to discriminate between the 3 types of movements described above. Analysis of the trajectory with the algorithm was performed using a sliding window with a size S_1 (figure 2). A three-layer BPNN with S_1 input nodes and three output nodes (one for each motion type, namely Brownian, directed and confined) was constructed. Hidden nodes and the number of hidden layers have been decided by reasonable errors from repeated trainings (we chose one hidden layer with five hidden nodes). Input variables were normalized (scaled into the range of 0.0–1.0). The networks were then trained and tested using separate data sets of simulated trajectories.

Generating training and validation sets

1000 trajectories of 3.1 s duration and time increment of 100ms were simulated for each type of diffusion modes. For Brownian trajectories, the movement of the particle between two time intervals is a 2D Gaussian function with a standard deviation of $\sqrt{2Dt}$ and a mean value of zero in the x and y directions (D was fixed to $0.25\mu\text{m}^2/\text{s}$ in this example). For confined diffusion, the particle displays a Brownian diffusion in a square constrained area with a L side value randomly ranging from 0.25 to 2 μm . For directed diffusion, a Vt term of constant drift velocity in a direction is added to the Brownian movement, with a constant value all along the trajectory randomly ranging from 0.5 to 1.5 $\mu\text{m}/\text{s}$. A similar database was created to test the validity of the system with different parameters (L between 0.1 and 3 μm and V randomly vary between 0.25 and 3.0 $\mu\text{m}/\text{s}$). The learning procedure was also performed for another dataset of trajectories with 2.1s and 4.1s durations.

The performance of a trained BPNN was first evaluated using new naive simulated patterns and by computing the percentage error between calculated output and expected values (probability of detection). It increases for a given diffusion coefficient when the confinement size decreased for confined trajectories (Fig 3A) or when the velocity increases for directed trajectories (Fig. 3B). The probability of detection increases with the size of the segments S. This can be explained by the fact that smaller the size of the segment, more difficult the distinction on the MSD curve between Brownian, directed or confined behaviour. The size of the segment was fixed to 31 frames and used for the following experiments. Because the normalization of the MSD curves, the algorithm is independent of the diffusion coefficient.

Indeed, considering 2 directed trajectories T_0 and T_1 with respective diffusion coefficient D_0 and D_1 and velocity V_0 and V_1 , the normalized MSD curves will be similar if

$$V_1 = V_0 \sqrt{\frac{D_1}{D_0}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Similarly, 2 confined trajectories T_0 and T_1 with respective diffusion coefficient D_0 and D_1 and confinement diameter L_0 and L_1 , the normalized MSD curves will be similar if

$$L_1 = L_0 \sqrt{\frac{D_1}{D_0}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Determination of the detection threshold of confined and directed motion

A sliding window with a length S_1 (31 frames) is used to split the trajectory in different segments and is positioned at the point $i=(S_1-1)/2$ of the trajectory in order to define a first segment containing the first 31 points. The MSD curve is calculated for this segment and, after normalization, was presented as an input to the neural network. The 3 output values of the neural network Y_B , Y_C and Y_D correspond to the probability of the particle to diffuse according to one of the 3 diffusion modes (Brownian, confined and directed, respectively). The sliding window is then translated to the point $i = [(S_1-1)/2] + 1$ in order to determine the next segment of the trajectory and the procedure is repeated up to the point $i = N - [(S_1-1)/2]$. For each trajectory, the BPNN output values Y (Y_B , Y_C and Y_D) for each point of the trajectory, corresponding to the probability of detection of one of the 3 diffusion modes, was plotted as a function of time (see one example in Fig. 4A). Taken into account that Brownian trajectories can transiently have a behaviour similar to confined or directed trajectories, we determined a threshold value in order to distinguish the true confined or directed part of the trajectory from that due to Brownian fluctuations. For this purpose, 100 Brownian trajectories of 1000 points were generated (increment of time, 100ms; D , $0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$). We then plotted the threshold value Th_C or Th_D as a function of the number of successive frames T for which the cumulated time corresponding to a neural network output indicating a confined (Fig. 4B) or directed (Fig. 4C) motion for a Brownian trajectory is better than 5% ($p = 0.05$) of the total number of frames, respectively. The analysis was repeated for p values of 0.025 and 0.01. We arbitrary chose a reasonable value of 10 consecutive frames and consequently, the threshold value Th of the BPNN output for a 5% error is 0.65 and 0.73 for confined and directed trajectories, respectively (see dot lines in Fig. 4B and 4C).

C. Validation of the algorithm

The algorithm was first validated on synthetic data. 50 trajectories of 400 frames alternating Brownian, confined and directed motion (increment of time, 100ms; D , $0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$) were created. All the confined and directed segments were detected by the BPNN and an example is shown in Fig. 5 for a Brownian trajectory with both transient confined and directed motion during 50 frames (5 s). Under these conditions, the BPNN detected a confinement and a directed behaviour during 3.8 and 4.2 s, respectively. Data from BPNN segments identified as directed or confined were respectively fitted with the equation 2 and 3 described in the Methods section given values of confinement size and velocity in good agreement with the parameters of the simulation (data not shown).

The BPNN was then used on trajectories recorded during the tracking of a Moloney Murine Leukemia virus (MLV) in human embryonic kidney (HEK) cells using TIRF microscopy (see the Methods section). The behaviour of such a viral particle can be Brownian, confined when trapped within membrane of the host cells or directed when the particle is exported from the cytoplasm to the plasma membrane^{487,488}. An example of such complex trajectory alternating different motion modes is shown in Fig. 6A and the analysis by the neural network in Fig. 6B. The algorithm was able to detect the different motion modes within the trajectory. A confinement was detected during 6.4 s in a zone of 170 nm diameter, a size in good agreement with a previous report for murine polyoma virus-like particles⁴⁸⁹. Directed motion was also observed during 4 s with a velocity of $0.38 \mu\text{m}/\text{s}$ that compares well with that previously measured for MLV ($0.57 \mu\text{m}/\text{s}$ in⁴⁹⁰). We also validated the software by analysing the tracking of CD9 molecules in HeLa cells. CD9 are transmembrane proteins expressed at the plasma membrane that have been demonstrated to mainly diffuse in a Brownian mode but that can transiently or permanently confined in membrane areas enriched in tetraspanins and partners (see the recent review⁴⁹¹). As expected from our previous results⁴⁹², Brownian and confined trajectories as well as mixed trajectories (succession of Brownian and confined motions) were detected in proportion comparable to what we have detected using the method described by Kusumi⁴⁸⁶. Each identified segment was then analysed in terms of apparent diffusion coefficient by plotting the MSD as a function of time (data not shown).

D. Discussion

In this work we propose a new approach to automatically identify and characterize the main motion modes of single molecules encountered within biological membranes. The novel algorithm is based on artificial neural network analysis that has already applied in biology, e.g. to prediction of protein secondary structure ⁴⁹³. Such a computational approach is especially suitable to solve complex behaviour with non-linear relationships between independent and dependent variables. We demonstrate that it can be applied to probing heterogeneity encountered in membrane of eukaryotic cells in terms of behaviour of membrane proteins or lipids (reviewed in ⁴⁷¹. The new algorithm is based on a BPNN analysis that required training with short synthetic trajectories of particles displaying Brownian, confined or directed motion modes and statistical analysis allows us to propose reasonable threshold of detection that fits very well with the reality. The accuracy of the algorithm based on MSD analysis can be explained by the relative low number of free parameters that the BPNN has to manage preventing over-fitting, the main disadvantage of using neural network as compared to linear regression.

Similarly to other trajectory segmentation-based algorithms for analysing motion modes ^{478,494-496}, detection was performed thanks to a sliding window allowing detection of temporal changes in the mode of motion within a trajectory. We used here a sliding window of 31 frames corresponding to the length of synthetic trajectories used for BPNN training. Under these conditions, the algorithm was able to accurately discriminate between Brownian, confined and directed diffusion and therefore to detect transition between these 3 modes. This is especially interesting in the light of publications showing that diffusing molecules or particles often display a complex behaviour rather than a single motion mode that could be a combination of Brownian diffusion with confined (see the first description in ⁴⁷⁶) or directed ⁴⁸⁰ motion modes. According to the size of the sliding windows used to explore the trajectory, it is possible to confidently identify motion types for segment sizes as short as 10 frames.

Detection of small segments and the small size of the sliding window could be very useful for super resolution microscopy like Photo-Activated Localization Microscopy (PALM), experiments that only allows recording of short trajectories due to the limited time of fluorescence emission of photo-activated proteins ⁴⁹⁷. Together with the algorithm based on vector classification and developed by Helmuth et al ⁴⁹⁵, our BPN-based approach allows detection of both confined or directed motion modes.

Interestingly, the normalization of the output of the neural network avoids BPNN training for different acquisition times. Because this algorithm is dedicated to the analysis of fluorescent particles (see below), we did not include any training for hop diffusion since such behaviour has not been observed in fluorescence microscopy, even on a millisecond time scale⁴⁹⁸.

The BPNN detection algorithm has been implemented in our homemade tracking software named Patrack, a friendly-user software developed using Visual C++ language (Scotts Valley, CA, USA) (More details about the software are available at <http://w3.cbs.cnrs.fr/...>). This software, already used to analyse trajectories using a relative deviation (RD parameter) of the fit from a straight line with a $4Dt$ slope as suggested by Kusumi et al. (1993), uses a step by step analysis. In addition, because our single molecule fluorescence microscope is equipped with dual-view imaging, the software has been developed to simultaneously track two probes. In conclusion, we have demonstrated that our algorithm provides a new conceptual approach in detecting motion modes within a trajectory that requires adjustment of a minimal set of parameters. Combined with our homemade software, it can accurately analysed the membrane dynamics of single molecules or particles such as viruses in terms of diffusion coefficient, velocity, lengths and distribution of the different motion modes within a trajectory as well as the main parameters of the different modes.

III. METHODS

Generation of synthetic trajectories

Synthetic trajectories were composed of 31 frames for BPPN training and 400 frames for algorithm validation. Brownian diffusion in 2 dimensions was simulated as a random walk process. x and y coordinates of each particle were sampled step by step, from normal distribution with zero mean and standard deviation of $\sqrt{2D\tau}$ where D is the diffusion coefficient and τ the time interval between 2 frames. The diffusion coefficient and time intervals were generally $0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and 0.1 s , respectively.

For confined trajectories, the particles freely diffuse but inside a square domain with a side length L . Directed trajectories were constructed by adding a v^2t^2 term component where v is the constant drift velocity of the particle. Heterogeneous synthetic trajectories are creating by assembling different segments of different motion modes.

Tracking procedure

All movies or simulated data were analyzed using homemade software named “PaTrack“ developed in the Visual C++ environment (Microsoft, Washington, USA) in which the BPNN-based algorithm has been implemented. This software is available online at the following address: <http://...> where the complete instructions manual can be downloaded.

Single molecule tracking was based on point spread function (PSF) fitting. MSD was computed according to the equation: $MSD(n\delta t) = \frac{1}{N-1-n} \sum_{j=1}^{N-1-n} \{ [x(j\delta t + n\delta t) - x(j\delta t)]^2 + [y(j\delta t + n\delta t) - y(j\delta t)]^2 \}$ where δt is the time interval between two successive frames, $x(t)$ and $y(t)$ are the particle coordinates at time t , N is the total number of frames, n is the number of time intervals⁴⁸⁵.

Apparent diffusion coefficient values were determined from a linear fit between the first and fourth points (D1-4) of the MSD versus time lag according to⁴⁸⁶. Once their associated motion mode identified by the BPNN, segments were fitted with the following equation: $MSD(\Delta t) = 4D\Delta t$ for a simple diffusion, $MSD(\Delta t) = 4D\Delta t + v^2(\Delta t)^2$ for directed diffusion and $MSD(\Delta t) = (1/3)L^2 [1 - \exp(-12D\Delta t/L^2)]$ for confined diffusion,

where v is the constant drift velocity, L^2 the area of the confined region and D the diffusion coefficient. Data analysis of the different particles is performed step by step

Tracking in living cells

SMT experiments were carried out as previously described^{472,492}. For CD9, HeLa cells were plated on 25-mm Ø glass coverslips and incubated in culture medium at 37°C for 10min with Atto647N-labeled Fab fragments of the anti-CD9 mAb, SYB-1⁴⁹⁹. A home made objective-type TIRF setup allowing multicolor single molecule imaging and equipped with an α Plan Fluor 100X/1,45 NA objective (Zeiss, Le Peck, France Brattleboro, VT) was used. All the experiments were done with a 100ms integration time.

For MLV, human embryonic kidney HEK293 cells were transfected with the MLV YFP-GAG vector⁵⁰⁰ using Lipofectamine (Invitrogen), washed and incubated with the transfection mixture for 6h. Fresh media was then added, and the dynamics of GAG molecules was investigated 24h later at 37°C as described above.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dorothée Molle and Edouard Bertrand (IGMM, Montpellier, France) for providing the MLV YFP-GAG vector. This work was supported by the ANR #06-BLAN-0378. C.E. and P.R. are recipients from the French Ministry for Research and Technology.

REFERENCES

- Basyuk, E., Galli, T., Mougél, M., Blanchard, J.M., Sitbon, M., and Bertrand, E. (2003). Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev Cell* 5, 161–174.
- Bates, I.R., Hebert, B., Luo, Y., Liao, J., Bachir, A.I., Kolin, D.L., Wiseman, P.W., and Hanrahan, J.W. (2006). Membrane Lateral Diffusion and Capture of CFTR within Transient Confinement Zones. *Biophys. J.* 91, 1046–1058.
- Bouzigues, C., and Dahan, M. (2007). Transient Directed Motions of GABAA Receptors in Growth Cones Detected by a Speed Correlation Index. *Biophys. J.* 92, 654–660.
- Charrin, S., Le Naour, F., cois, Silvie, O., Milhiet, P.-E., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2009). Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *The Biochemical Journal* 420, 133–154.
- Charrin, S., Le Naour, F., Labas, V., Billard, M., Le Caer, J.P., Emile, J.F., Petit, M.A., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003). EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J* 373, 409–421.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V.N., Hein, B., Von Middendorff, C., Schönle, A., et al. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457, 1159–1162.
- Ehrensperger, M., Hanus, C., Vannier, C., Triller, A., and Dahan, M. (2007). Multiple Association States between Glycine Receptors and Gephyrin Identified by SPT Analysis. *Biophysical Journal* 92, 3706–3718.
- Espenel, C., Margeat, E., Dosset, P., Arduise, C., Le Grimellec, C., Royer, C.A., Boucheix, C., Rubinstein, E., and Milhiet, P.E. (2008). Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J Cell Biol* 182, 765–776.
- Ewers, H., Smith, A.E., Sbalzarini, I.F., Lillie, H., Koumoutsakos, P., and Helenius, A. (2005). Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15110–15115.
- Helmuth, J.A., Burckhardt, C.J., Koumoutsakos, P., Greber, U.F., and Sbalzarini, I.F. (2007). A novel supervised trajectory segmentation algorithm identifies distinct types of human adenovirus motion in host cells. *J Struct Biol* 159, 347–358.
- Jin, S., and Verkman, A.S. (2007). Single particle tracking of complex diffusion in membranes: simulation and detection of barrier, raft, and interaction phenomena. *J Phys Chem B* 111, 3625–3632.
- Krementsov, D.N., Rassam, P., Margeat, E., Roy, N.H., Schneider-Schaulies, J., Milhiet, P.E., and Thali, M. (2010). HIV-1 assembly differentially alters dynamics and partitioning of tetraspanins and raft components. *Traffic* 11, 1401–1414.
- Krogh, A. (2008). What are artificial neural networks? *Nat Biotechnol* 26, 195–197.
- Kusumi, A., Sako, Y., and Yamamoto, M. (1993). Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys J* 65, 2021–2040.
- Lagache, T., Dauty, E., and Holcman, D. (2009). Physical principles and models describing intracellular virus particle dynamics. *Current Opinion in Microbiology*.
- Manley, S., Gillette, J.M., Patterson, G.H., Shroff, H., Hess, H.F., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods* 5, 155–157.
- Marguet, D., Lenne, P.F., Rigneault, H., and He, H.T. (2006). Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo J* 25, 3446–3457.
- Meilhac, N., Le Guyader, L., Salome, L., and Destainville, N. (2006). Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 73, 011915.
- Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A., and Dahan, M. (2010). Probing cellular events, one quantum dot at a time. *Nature Methods*.
- Qian, H., Sheetz, M.P., and Elson, E.L. (1991). Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys J* 60, 910–921.
- Qian, N., and Sejnowski, T.J. (1988). Predicting the secondary structure of globular proteins using neural network models. *J. Mol. Biol.* 202, 865–884.
- Rumelhart, D.E., Hilton, G.E., and Williams, R.J. (1986). Learning representations by back-propagating errors. *Nature* 533–536.

- Ruthardt, N., Lamb, D.C., and Bräuchle, C. (2009). Single-particle Tracking as a Quantitative Microscopy-based Approach to Unravel Cell Entry Mechanisms of Viruses and Pharmaceutical Nanoparticles. *Molecular Therapy*.
- Saxton, M.J., and Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 26, 373–399.
- Schneckenburger, H. (2005). Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 13–18.
- Schutz, G.J., Schindler, H., and Schmidt, T. (1997). Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys J* 73, 1073–1080.
- Segura-Morales, C., Pescia, C., Chatellard-Causse, C., Sadoul, R., Bertrand, E., and Basyuk, E. (2005). Tsg101 and Alix interact with murine leukemia virus Gag and cooperate with Nedd4 ubiquitin ligases during budding. *J Biol Chem* 280, 27004–27012.
- Sergé, A., Bertaux, N., Rigneault, H., and Marguet, D. (2008). Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat Meth* 5, 687–694.
- Simson, R., Sheets, E.D., and Jacobson, K. (1995). Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. *Biophys. J.* 69, 989–993.
- Suzuki, K.G., Fujiwara, T.K., Sanematsu, F., Iino, R., Edidin, M., and Kusumi, A. (2007). GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1. *The Journal of Cell Biology* 177, 717–730.
- Wieser, S., Moertelmaier, M., Fuertbauer, E., Stockinger, H., and Schutz, G. (2007). (Un)Confined Diffusion of CD59 in the Plasma Membrane Determined by High-Resolution Single Molecule Microscopy. *Biophysical Journal* 92, 3719–3728.

FIGURES

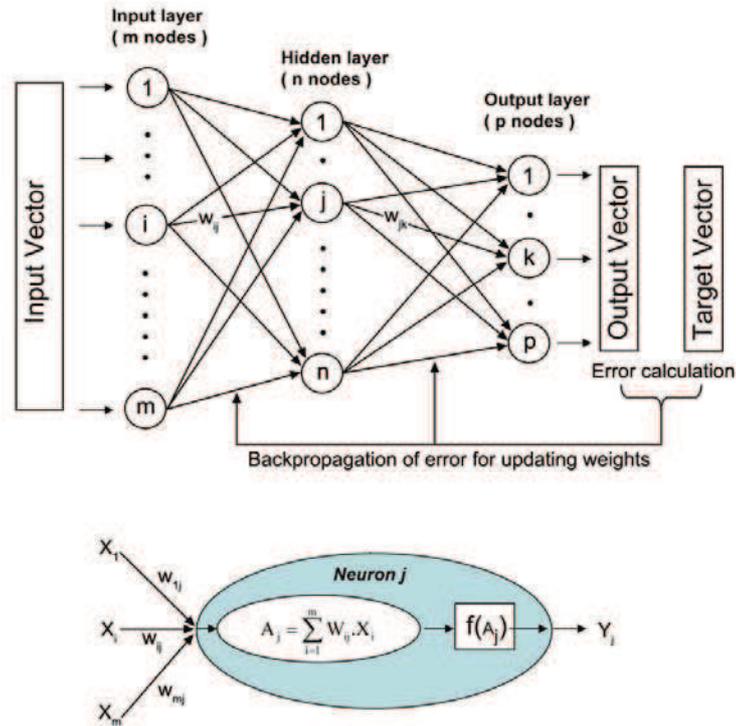


Figure 1. Configuration of the neural networks

Upper panel: schematic view of the three-layer back propagation neural network.

Each input value is passed through the neural network. The output value is compared with the desired target output, an error is computed and this error is propagated backward through the network to each node.

Lower panel: graphical representation of the model neuron j or threshold unit. The threshold unit receives input, called X_i , from m other units. The associated weight is called W_i . The total input A_j is the sum over all inputs. The activation function $f(A_j)$ of the neuron is a sigmoid and Y_j is the output of the neuron.

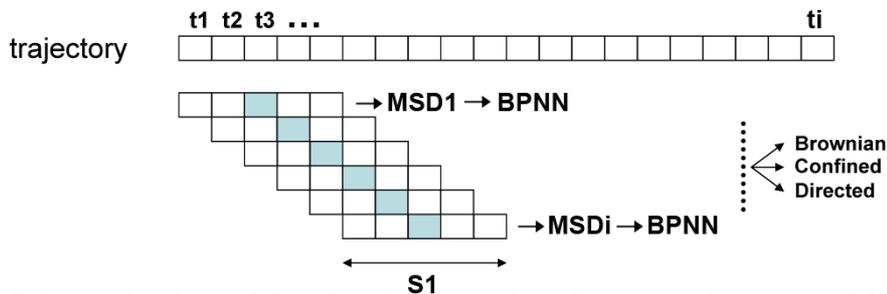


Figure 2. Schematic view of the algorithm used to detect motion type of diffusion i

The trajectory is split in overlapping segments of length $L1$. The MSD curve is calculated for each segment, normalized, presented to the neural network and classify according to three main diffusion modes (Brownian, directed or confined). A score (output value) is obtained for each frame of the movie.

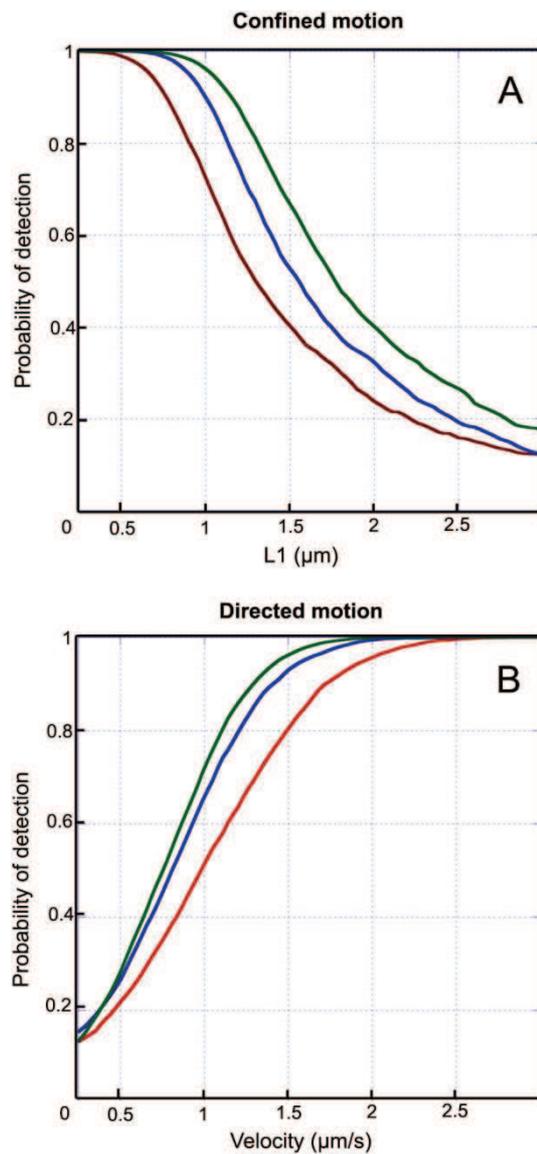


Figure 3. Percentage of detection of confined and directed diffusion modes as a function of the length of segments L1

The probability of detection of confinement or directed motion in simulated trajectories was calculated for different length of segment L1 used to calculate the MSD (L1 equal to 21 (red), 31 (blue) or 41(green) frames). The probability of detection of confinement in trajectories is expressed as a function of the diameter of confinement R1 (A) whereas the probability of detection of directed motion is expressed as a function of the velocity (B).

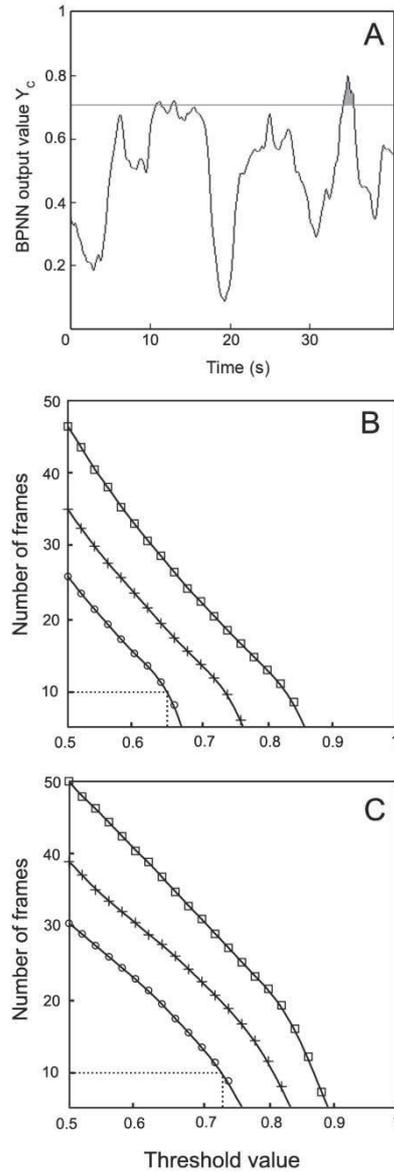


Figure 4. Detection threshold of confined and directed diffusion modes

The panel A depicts an example of plotting the BPNN output value Y_C as a function of time along a confined trajectory using the 31 frames sliding window. The detection threshold of confined (B) and directed (C) diffusion modes were respectively determined by plotting the number of frames as a function of the BPNN output value Y for a probability of detection of 0.95 (empty circle), 0.975 (cross) and 0.99 (empty square) (probability of 5, 2.5 and 1% for a Brownian trajectory to be falsely identified as confined or directed). We arbitrary chose a value of 10 frames as the minimal length of a segment that can be identified as confined or directed, respectively corresponding to a threshold value Th_C of 0.65 or Th_D of 0.73 with a 95% confidence (see dot lines).

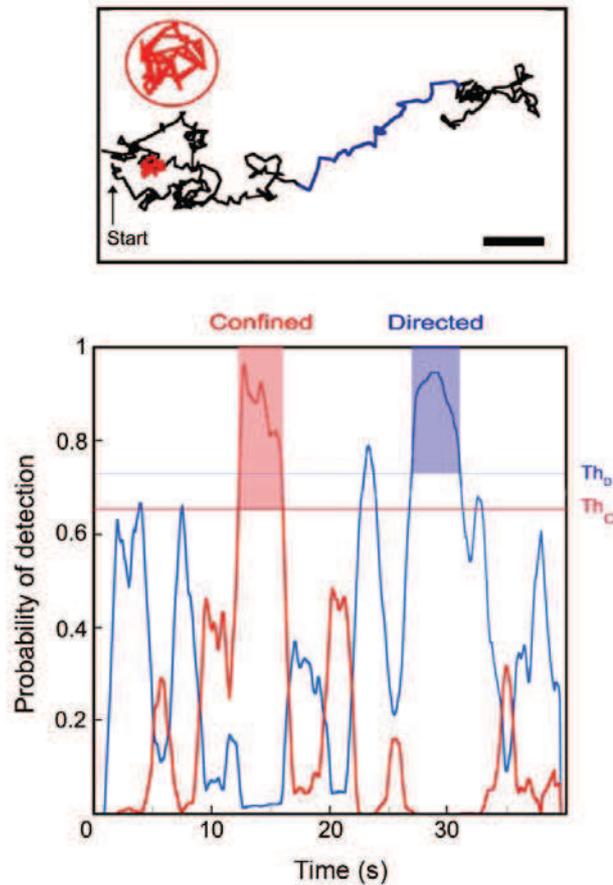


Figure 5. Analysis of motion modes within a simulated trajectory

The upper panel shows a simulated trajectory of 40 s (400 frames) including a transient confinement (from 12 to 17 s) with a diameter of 1 μm (red trace, zoomed in the red circle) and a transient directed motion (27 to 32 s) with a velocity $v = 1 \mu\text{m/s}$ (blue trace). The Brownian part is in black. The diffusion coefficient D is $0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and the integration time 100 ms. Scale bar, 2 μm .

The Lower panel is the plot of the probability of detection of motion mode (BPNN output) as a function of the duration time of the trajectory. Confined (red trace and box) and directed (blue trace and box) are respectively detected between 12.2 and 16 s ($\text{Th}_C = 0.65$) and between 26.9 and 31.1 s ($\text{Th}_D = 0.73$). The threshold values Y correspond to a probability of detection with a 95% confidence (see Fig. 4).

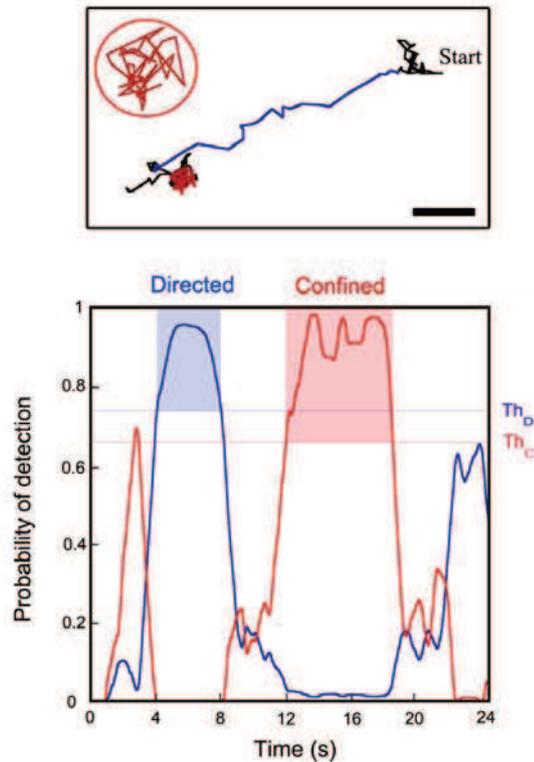


Figure 6. Analysis of the motion of a Moloney Murine Leukemia virus (MLV) particle

The upper panel shows the trajectory of a MLV particle containing YFP-tagged Gag proteins recorded in infected 293 HEK cells, tracked using TIRF microscopy and recorded at a 100 ms integration time. The confinement area is zoomed in the red circle.

The lower panel is the plot of the probability of detection of motion mode as a function of the duration time of the trajectory. A zone of confinement is detected during 6.45 s (red trace, $Th_C = 0.65$) with a diffusion coefficient of $0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and a diameter of 170 nm. Directed motion is indicated in blue ($Th_D=0.73$) with a diffusion coefficient of $0.012 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and a velocity of $0.38 \mu\text{m}/\text{s}$. Scale bar, 500 nm.

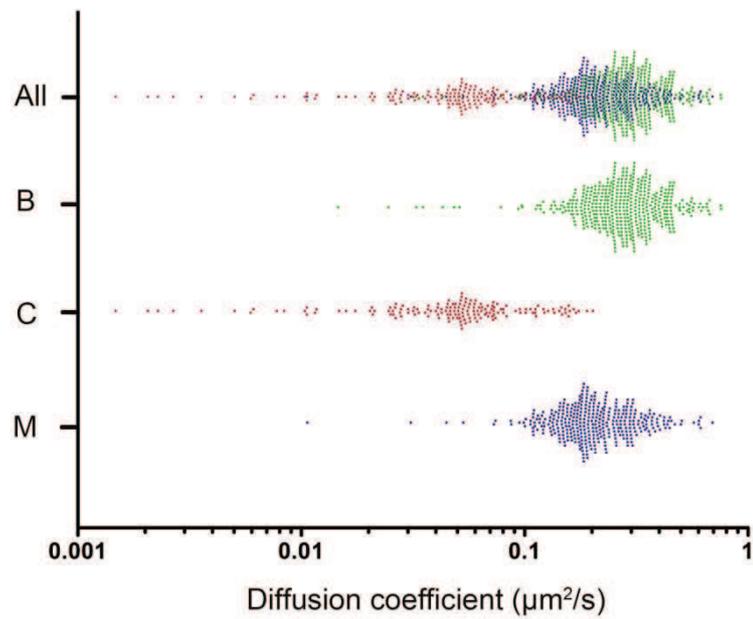


Figure 7. Single molecule tracking of CD9 in HeLa cells

Scatter plots for CD9 apparent diffusion coefficients calculated from the first points of the MSD-t plots of 1000 trajectories in HeLa cells (see supplemental material). Each point represents one trajectory and the behavior determined thanks to the neural network is indicated with a color code (red, Confined; green, Brownian; blue, mixed). The upper panel corresponds to the totality of the trajectories whereas B, C and M are Brownian, Confined and Mixed trajectories, respectively.

Titre : Influence de l'assemblage du VIH-1 et de l'organisation du cytosquelette sur la dynamique et la répartition membranaire des tétraspanines CD9 et CD81 analysée à l'échelle de la molécule unique

Résumé : Les mécanismes moléculaires d'assemblage et de bourgeonnement des virus tels que le VIH-1 dans les cellules infectées sont encore relativement mal connus. Toutefois, il semble établi que la multimérisation de la protéine Gag s'effectue à la membrane plasmique et que le bourgeonnement des particules virales a lieu au niveau de zones enrichies en tétraspanines. Ces protéines transmembranaires forment un réseau d'interactions protéiques à la surface de la cellule et s'organisent en microdomaines différents des radeaux lipidiques, bien qu'enrichis en cholestérol.

En utilisant la technique de suivi de molécules uniques fluorescentes sur des cellules HeLa exprimant la protéine Gag, l'objectif de mon travail de thèse était d'abord de déterminer l'influence de l'assemblage et le bourgeonnement de pseudoparticules virales sur la dynamique et la répartition membranaires des tétraspanines CD9 et CD81. Nos résultats renforcent l'émergence d'un nouveau concept, selon lequel les composants cellulaires et viraux, plutôt que de se regrouper au niveau de plateformes membranaires préexistantes, s'organisent en structures de taille croissante où les tétraspanines sont peu à peu concentrées avec leurs partenaires pour former une architecture propice à l'assemblage et la sortie du VIH-1.

Par ailleurs, nous avons montré que CD81 était plus confiné et moins dynamique que CD9 et avons donc étudié les mécanismes moléculaires expliquant cette différence de comportement membranaire. L'utilisation du suivi de molécule unique couplé à des marquages d'ensemble, l'emploi de protéines chimériques et de drogues spécifiques ont permis de révéler que la dynamique membranaire de CD81 est restreinte par le réseau d'actine, via l'ezrine, mais implique aussi EWI-2 et CD9P-1, deux partenaires membranaires de CD9 et de CD81. Enfin, cette étude montre que cette interaction avec le cytosquelette est impliquée dans le recrutement de CD81 et indirectement de CD9, lors de l'assemblage du VIH.

Title : Influence of HIV-1 assembly and cytoskeleton integrity on tetraspanins CD9 and CD81 dynamics and partitioning analysed at the single molecule level

Summary : Molecular mechanisms of assembly and budding of HIV-1 particles in infected cells are still a matter of debate. However it is now well established that Gag assembly occurs at the plasma membrane and that budding involves tetraspanin-enriched areas. Tetraspanins are transmembrane proteins that form a network of protein interaction at the cell surface organized into microdomains enriched in cholesterol but distinct from rafts.

Using single molecule tracking of fluorescent markers with Gag-expressing HeLa cells, the aim my PhD thesis was first to determine the influence of Gag assembly and budding of pseudo particles on the dynamics and partitioning of the tetraspanins CD9 and CD81 at the plasma membrane. Our results support an emerging concept that cellular and viral components, instead of clustering at preexisting microdomains or platforms, direct the organization of growing structures where tetraspanins are more and more concentrated with their partners, in order to form a membrane scaffold that helps HIV-1 assembly and egress.

In a second work, we showed that CD81 is more confined and less dynamic than CD9, and tried to clarify the molecular mechanisms involved in this differential behavior at the plasma membrane. Single molecule tracking, in addition to ensemble labeling experiments, CD9/CD81 chimeric proteins, as well as specific drugs, demonstrated that CD81 membrane dynamics is restricted by the actin network through ezrin proteins, but also implicates EWI-2 and CD9P-1, primary partners of CD9 and CD81. Finally, this study reveals that this interaction with the cytoskeleton is in part responsible of the recruitment of CD81 and indirectly of CD9 during HIV-1 assembly.

Discipline : biophysique cellulaire.

Mots clefs : suivi de molécule unique, diffusion, tétraspanine, membrane, microdomaine, radeau lipidique, cholestérol, virus, VIH-1, Gag, assemblage, cytosquelette.

Institut : Centre de Biochimie Structurale de Montpellier, CNRS UMR 5048 - INSERM U1054, 29 Rue de Navacelles 34090 Montpellier CEDEX FRANCE.