

TITRE (Français)	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
TITRE (English)	INFLUENCE OF HIV-1 ASSEMBLY AND CYTOSKELETON INTEGRITY ON TETRASPANINS CD9 AND CD81 DYNAMICS AND PARTITIONING ANALYSED AT SINGLE MOLECULE LEVEL
AUTEUR	Patrice Rassam
UNIVERSITE	Université Montpellier 2
DATE	25 Octobre 2012
LABORATOIRE	Centre de Biochimie Structurale de Montpellier
DIRECTION DE THESE	Pierre-Emmanuel Milhiet
PARRAINAGE	Julien Roche

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'ils soient 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 membranaire 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 était restreinte par le réseau d'actine, via l'eitrine, mais impliquait 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.

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.