

# Les chevaux de Troie : vers la compréhension du mode d'action de ces peptides vecteurs

Isabel D. Alves

**Résumé** Les peptides vecteurs, aussi nommés chevaux de Troie, sont des molécules capables de traverser la membrane cellulaire et de transporter vers l'intérieur de la cellule des cargaisons de nature et de taille variées, et ceci sans aucun risque pour la viabilité cellulaire. Ces peptides présentent ainsi un intérêt considérable aux niveaux thérapeutique et diagnostique. Cependant, leur mécanisme de transfert de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule est encore discuté. De plus, un des aspects qui reste à améliorer afin d'élargir leur application réside dans la nécessité d'apporter une certaine spécificité d'adressage au niveau du tissu, d'un type de cellule ou de l'organelle intracellulaire.

**Mots-clés** Peptides vecteurs, membrane cellulaire, interaction peptide/lipide, vectorisation, chevaux de Troie.

**Abstract** **Trojan horses: towards the understanding of the mechanism of these cell penetrating peptides**  
Cell penetrating peptides, also called Trojan horses, are molecules able to cross the cell membrane and transport cargos of variable nature and size into the cell interior, and this without any perturbation in cell viability. Therefore, these peptides present a major interest both at the therapeutic and diagnosis levels. However, their mechanism of action, more precisely how they cross the cellular membrane is not yet solved. Another aspect that remains to be improved in order to broaden their application consists in providing or increasing selectivity both in terms of the tissues, cell types and intracellular organelles they target.

**Keywords** Cell penetrating peptides, cellular membrane, peptide/lipid interaction, vectorization, Trojan horses.

## La membrane cellulaire : une barrière sélective protectrice de la cellule

Afin de rentrer à l'intérieur de la cellule, les peptides vecteurs, ou CPP (en anglais « cell penetrating peptides »), sont obligés de franchir la membrane cellulaire, première barrière qu'ils rencontrent.

Ainsi, une brève description de la membrane cellulaire est nécessaire : les membranes délimitent la cellule et jouent le rôle de barrière naturelle sélective ; elles sont composées essentiellement de lipides assemblés en bicouche, de protéines et de carbohydrates (*figure 1*).

Les lipides, assemblés en bicouche, créent un intérieur hydrophobe qui induit une perméabilité de la membrane vis-à-vis du milieu extérieur aqueux. La membrane est composée d'une grande variété de lipides, ce qui confère une grande adaptabilité et flexibilité de la structure à l'environnement. La composition de la membrane est différente selon qu'il s'agit du feuillet externe ou interne. Ainsi, les lipides composés de choline – phosphatidylcholine (PC) et sphingomyéline (SM) – se situent majoritairement sur le feuillet externe de la membrane, tandis que les lipides possédant une amine primaire – phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS) – sont localisés principalement sur le feuillet interne de la membrane. En termes de charge, le feuillet externe est plutôt neutre (zwitterionique), alors que le feuillet interne est anionique. Dans certains états de la cellule, comme l'apoptose (décrit plus bas), l'asymétrie membranaire est perturbée. Au niveau du feuillet externe, la distribution latérale des lipides n'est pas homogène. En 1997, Simons suggère la présence de « radeaux lipidiques » (en anglais « lipid rafts ») dans les membranes. Ces plateformes, enrichies en cholestérol et SM et appauvries en PC, « flottent » sur une matrice désordonnée de lipides et jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire.

La membrane se présente aussi comme une matrice de support pour un grand nombre de protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Environ 20 à 35 % des protéines sont intégralement membranaires, et probablement la moitié des protéines restantes exercent

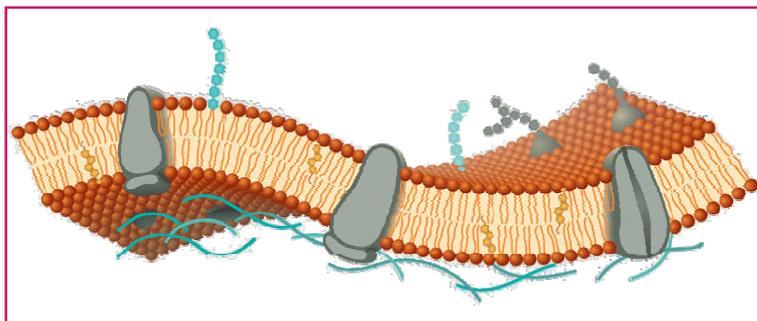


Figure 1 - Modèle de membrane composée de lipides (orange), cholestérol (jaune), protéines membranaires (gris) et carbohydrates liés à la membrane par des lipides (bleu) ou par des protéines (gris).

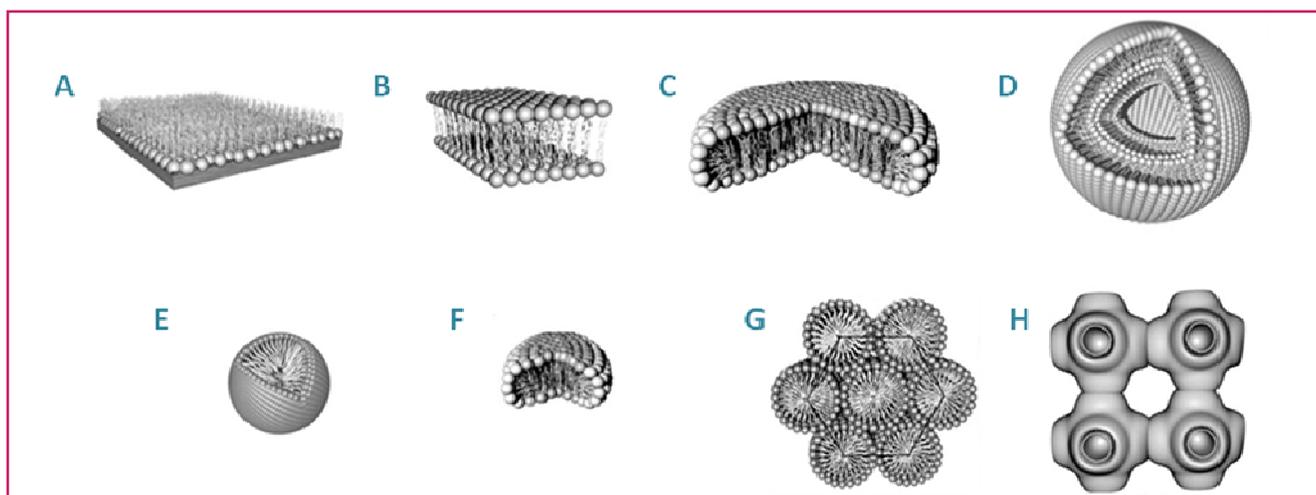


Figure 2 - Différentes géométries d'assemblage lipidique. A : monocouche de Langmuir à l'interface air-eau ; B : bicouche lipidique ; C : bicelle anisotrope ; D : liposomes multilamellaires ; E : micelle ; F : bicelle isotrope ; G : phase hexagonale H1 ; H : phase cubique Q229.

leur fonction à proximité de la surface membranaire. Ainsi, les propriétés physico-chimiques de la membrane affectent la plupart des processus cellulaires, ce qui donne aux lipides un rôle dynamique et fonctionnel dans la cellule, sans les limiter à une simple barrière statique.

Les carbohydrates constituent le troisième composant principal de la membrane cellulaire. Il s'agit de molécules hydrophiles présentes à la surface du feuillet externe de la membrane. Ils n'ont pas de rôle direct dans la cellule mais exercent une fonction indirecte comme la protection des protéines membranaires contre la protéolyse, leur stabilisation ou l'adhésion intracellulaire. Les carbohydrates confèrent un caractère plus anionique à la surface membranaire. Par ailleurs, leur quantité et leur type structural peuvent être modulés en fonction de l'état de la cellule (prolifération, angiogenèse, apoptose, etc.) et ainsi affecter des processus cellulaires comme l'adhésion, la mobilité ou la croissance cellulaire.

La composition très diverse de la membrane cellulaire et ses nombreuses fonctions compliquent la compréhension des phénomènes membranaires. Ainsi, afin de simplifier la membrane cellulaire, des modèles lipidiques ont été créés. Comme les lipides s'alignent spontanément de manière à ce que la tête polaire soit orientée vers la phase aqueuse et la partie hydrophobe protégée à l'intérieur de la bicouche excluant l'eau de cette partie, plusieurs organisations lipidiques sont possibles (figure 2).

Il est possible de réaliser des membranes plates, des monocouches (modèle le plus rudimentaire) ou des bicouches lipidiques, comme décrit par Mueller dans les années 1960. Des liposomes multilamellaires ou unilamellaires de tailles variées sont aussi très souvent utilisés ; leur formation est simple et ils s'avèrent être de bons modèles de la membrane cellulaire. Dans les modèles de plus petite taille, on trouve les micelles et les bicelles. Les micelles sont composées de détergents (molécule amphiphile utilisée comme mime de lipide) ; les bicelles sont constituées de deux types de lipides. Ces deux modèles sont souvent utilisés pour les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) du fait de leur petite taille. Enfin, les phases hexagonales et cubiques sont formées quand certains types de lipides aux géométries particulières sont utilisés, telle la phosphatidyléthanolamine (PE), un lipide qui a tendance à induire une courbure négative de la membrane.

Ces modèles lipidiques constituent une représentation simplifiée de la membrane mais ils permettent cependant d'analyser les phénomènes mis en jeu, notamment à la surface externe, première étape dans la pénétration des peptides vecteurs. Le choix du modèle utilisé dépend de plusieurs facteurs, comme de la propriété qui est étudiée, mais aussi de la sensibilité et des contraintes de la technique utilisée pour l'étude.

### Chevaux de Troie : de quoi s'agit-il et quels sont-ils ?

Les peptides vecteurs (CPP) ont été découverts à la fin des années 1980, suite à l'observation que certaines protéines étaient capables de traverser la paroi cellulaire. Ce sont de petits peptides, constitués en général de moins de trente acides aminés. Ils sont dotés de la capacité à traverser la membrane cellulaire sans être détruits et ont ainsi été nommés chevaux de Troie. De plus, ces peptides sont capables de transporter des cargaisons de taille et de nature très variées comme des protéines, des anticorps, des acides nucléiques, des médicaments dérivés de peptides, etc. Ils peuvent aussi transporter des molécules utilisées pour l'imagerie comme des « quantum dots », des fluorophores, ainsi que des marqueurs radioactifs ou des agents de contraste. Comme les CPP ne sont pas cytotoxiques, ils représentent un énorme potentiel aux niveaux thérapeutique et diagnostique. Ils ont souvent un caractère cationique et certains possèdent aussi des résidus hydrophobes. Selon leur origine, ils sont classés en trois familles : peptides dérivés de protéines, peptides chimères et peptides synthétiques (voir tableau 1). Ils peuvent aussi être classés en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques : amphiphiles, hydrophobes ou cationiques.

Il a été observé par Frankel et Pabo que la protéine Tat (pour trans-activateur de la transcription) du virus VIH, impliquée dans la réplication de ce virus, était internalisée dans les cellules et pouvait atteindre le noyau et ainsi activer le promoteur du VIH [1]. La même année, plusieurs régions essentielles de la protéine, indispensables à sa liaison à l'ADN et à la trans-activation du promoteur du VIH, ont été identifiées [2]. Ces résultats ont soulevé de nombreuses questions et notamment celle du mode de transport de ces protéines. À cette époque, il semblait inconcevable qu'une protéine ou un peptide

Tableau I - Famille de peptides vecteurs (CPP) selon leur origine : exemples, origine, séquence et cargaison transportée.  
ODN : oligonucléotide ; PNA : acide nucléique peptidique ; siRNA : petits ARN interférents.

	CPP	Origines	Séquences	Cargaisons
Peptides dérivés de protéine	Tat	Protéine Tat du VIH-1	YGRKKRRQRRR	Protéine/peptide/ siRNA/ liposome/nanoparticule
	Pénétratine	Homéodomaine Drosophila Antennapedia	RQIKYFQNRRMKWKK	Protéine/peptide/PNA/ siRNA/liposome
	pVEc	Cadhérine (vasculaire endothéliale)	LLILRRRIRKQAHASK	Protéine/peptide/PNA
Peptides chimériques	Transportan	Galanine + Mastoparan	GWTLNSAGYLLG-K-INLKALAALAKKIL	Protéine/PNA/siRNA
	MPG	HIV Gp41 + SV40 NLS	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	siRNA/ODN/plasmide
	Pep-1	Motif riche en Trp + SV40 NLS	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	Protéine/peptide
Peptides synthétiques	Oligoarginine	Dérivé de Tat	Rn : 6 < n < 12	Protéine/peptide/ siRNA/ODN
	CADY	Dérivé de ppTG1	Ac-GLWRALWRLRLSLWLLWRA-cystéamide	siRNA
	MAP	Peptide amphipatique modèle	KLALKLALKALKALKLA-NH2	siRNA

puisse être transporté aussi rapidement et efficacement dans des cellules en raison de la faible perméabilité de la membrane cellulaire. Ce n'est qu'en 1997 que l'équipe de Lebleu a identifié la séquence minimale d'acides aminés responsable de l'internalisation de la protéine Tat [3].

En 1991, le groupe d'Alain Prochiantz avait découvert que l'homéodomaine de l'homéoprotéine Antennapedia *Drosophila* était également capable de traverser les membranes des cellules neuronales, d'atteindre leur noyau et d'activer leur différenciation morphologique [4]. Pour mieux identifier la région de la protéine impliquée dans ce phénomène, des fragments peptidiques ont été synthétisés. Le peptide de seize résidus (43-58) correspondant à la troisième hélice de l'homéodomaine, appelé pénétratine (pAntp), possède les mêmes propriétés d'internalisation que la protéine entière [5] (figure 3).

Cette propriété a été observée à la fois à 37 °C et à 4 °C, température à laquelle l'endocytose est inhibée, démontrant ainsi que l'internalisation est énergie-indépendante. De plus, il a été démontré que son internalisation n'impliquait pas de récepteurs membranaires [6].



Figure 3 - Structure de la protéine de l'homéodomaine de *Drosophila Antennapedia* (bleu) en complexe avec l'ADN (rose). L'hélice III correspondant aux résidus 43-58 est représentée en vert.

D'autres CPP peuvent être dérivés de protéines transmembranaires, par exemple le peptide pVec, composé de dix-huit acides aminés, dérivé d'une protéine d'adhésion cellulaire, la cadhérine. Au-delà de cette fonction, la cadhérine joue un rôle dans la transmission d'informations de l'extérieur à l'intérieur de la cellule et dans le contrôle de la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. L'internalisation de pVec et le transport de cargaisons de façon efficace, énergie- et récepteur-indépendante ont été observés dans plusieurs lignées cellulaires [7].

La présence d'un nombre important de résidus cationiques dans la séquence du peptide Tat (six arginines (Arg) et deux lysines (Lys) sur treize résidus) est déterminante dans la séquence des CPP. Les recherches menées au sein du groupe de Wender ont permis d'identifier le nombre optimal d'arginines nécessaire à l'internalisation cellulaire pour améliorer l'efficacité des CPP [8]. L'oligoarginine R9 a été proposé comme étant le meilleur compromis : coûts de synthèse, dégradation, toxicité du peptide. Lorsque le nombre d'arginines est supérieur à neuf, le taux d'internalisation cellulaire décline rapidement [9].

Un autre peptide synthétique amphiphile, composé de vingt résidus, dérivé du peptide chimérique PPTG1 et dénommé CADY, a été conçu de manière à augmenter i) l'interaction avec les petits ARN interférents (ou siRNA pour « small interfering RNA »), ainsi que ii) la capacité à interagir avec la partie hydrophobe de la membrane [10]. Sept résidus ont ainsi été mutés en arginine et en tryptophane (Trp), un groupement amide ajouté à l'extrémité C-terminale et le groupement de l'extrémité N-terminale a été acétylé, améliorant ainsi la capacité d'internalisation et sa stabilité lorsqu'il est complexé avec une cargaison de type siRNA.

Le peptide modèle amphiphile (MAP), composé de leucine, lysine et alanine, est synthétisé pour être entièrement amphiphile lorsqu'il est structuré en hélice  $\alpha$ . Il est internalisé par un mécanisme non endocytotique et dépendant de son amphiphilie, en accord avec les résultats de Derossi *et coll.* sur la pénétratine [11].

Enfin, la dernière famille concerne les peptides chimères qui résultent de la fusion de deux séquences de peptides naturels et/ou synthétiques. Un représentant important de cette famille de peptides, le transportan, a été décrit en 1996 par Langel *et coll.* [12]. C'est un CPP de 27 acides aminés composé des douze résidus à l'extrémité N-terminale du neuropeptide galanine liés par une lysine aux quatorze acides aminés du mastoparan issu du venin de guêpe. La partie

N-terminale du peptide est rendue plus hydrophobe pour améliorer les interactions avec la membrane. Le transport peut être internalisé en moins de cinq minutes dans des cellules de fibroblastes et transporter de larges cargaisons. Il a ainsi inspiré la synthèse de nombreux dérivés dont le plus efficace est le transportan 10 (TP10), largement étudié et utilisé en tant que peptide vecteur [13].

Un autre exemple de peptide chimère est le peptide amphiphile primaire Pep-1. Composé de 21 résidus, il est constitué de trois domaines : un domaine hydrophobe riche en résidus Trp, un domaine hydrophile riche en lysines et dérivant de la séquence de localisation nucléaire (NLS) de l'antigène-T SV40, et un domaine central liant les deux domaines précédents contenant une proline qui augmente la flexibilité et la stabilité du peptide [14]. Il a été démontré que Pep-1 est un peptide vecteur efficace dans le transport de protéines et de peptides, sans subir de dégradation endosomale [15].

Enfin, le peptide MPG est dérivé du peptide de fusion gp41 du VIH-1 et de la séquence de localisation nucléaire de l'antigène-T SV40. *In vitro*, il forme rapidement un complexe non covalent avec des oligonucléotides grâce à des interactions principalement électrostatiques, mettant en jeu les charges positives de la partie riche en lysines du peptide vecteur et les charges négatives des phosphates des acides nucléiques. Ce complexe est ensuite efficacement et rapidement internalisé (en moins d'une heure) dans les noyaux des cellules [16].

## Mode d'action des peptides vecteurs

Deux types de mécanismes ne dépendant pas de récepteurs membranaires sont envisagés pour l'internalisation des CPP : la translocation directe à travers la membrane qui ne dépend pas de l'activité enzymatique de la cellule, et l'endocytose qui est liée à l'activité enzymatique (par exemple kinase). C'est au phénomène de translocation directe des peptides, par l'utilisation de membranes lipidiques modèles, que nous nous sommes intéressés.

### Translocation directe des peptides à travers la membrane

La translocation directe est la première voie d'internalisation envisagée pour la pénétratine. La simple diffusion passive à travers la membrane plasmique est exclue pour des molécules de la taille de ces peptides, qui sont, de plus, fortement chargés. Le terme de translocation directe recouvre plusieurs mécanismes possibles, ayant tous un point commun : ils ne dépendent ni de l'énergie ni de la température. De nombreuses études sur cellules vivantes ont démontré que la translocation directe existait, même si l'endocytose demeure considérée comme la voie principale d'internalisation des peptides vecteurs. Des études sur la pénétratine, le Tat ou les oligoarginines ont prouvé que ces peptides peuvent être internalisés par translocation directe dans les cellules. De nombreuses études sur des modèles membranaires ont été réalisées afin de mieux comprendre le mécanisme de translocation à travers les membranes et notamment l'interaction peptide/membrane. La translocation directe permettrait de délivrer directement des cargaisons au niveau du cytoplasme et du noyau sans perturbation létale pour la membrane.

Des études de spectroscopie de fluorescence sur des liposomes ont révélé que le peptide Tat n'induit pas de

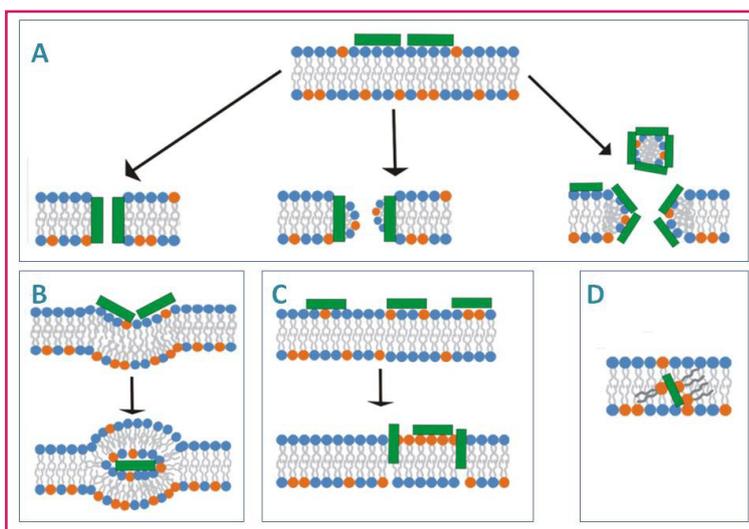


Figure 4 - Mécanismes employés par les peptides vecteurs pour traverser directement la membrane cellulaire. A : pore transitoire : en tonneau (gauche), toroïdale (centre) et tapis ou détergent (droite) ; B : micelle inverse ; C : domaines et défauts membranaires ; D : translocation adaptative.

Les peptides sont représentés en vert, les lipides neutres (zwitterioniques) en bleu et les anioniques en orange.

perturbation de la membrane et n'entraîne pas de fuite de fluorophore. Cependant, des études de simulation de dynamique moléculaire et de mesure du potentiel membranaire avec le peptide Tat et la pénétratine ont montré que ces peptides induisent des pores transitoires dans les membranes. Plusieurs mécanismes ont été avancés afin d'expliquer la translocation directe des CPP. Dès 1996, Derossi *et coll.* proposaient un mécanisme d'internalisation de la pénétratine reposant sur la déstabilisation de la membrane conduisant à la formation de structures hexagonales de type micelle inverse [6] (figure 4B). Plusieurs arguments sont invoqués par les auteurs pour appuyer ce mécanisme, en particulier le fait que les résidus Trp sont connus pour induire la formation de micelles inverses. De plus, des études de RMN du phosphore sur des phospholipides cérébraux montrent que la pénétratine induit l'apparition de phases HII alors que le peptide mutant où les résidus Trp sont remplacés par des résidus phényle (Phe) n'a pas d'effet. Enfin, quelques années plus tard, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour « differential scanning calorimetry ») a corroboré cette hypothèse [17].

En 2003, Sakai et Matile montrent qu'en présence d'anions amphiphiles, le transfert d'hexaarginine d'une phase aqueuse vers une phase hydrophobe est possible, ce qui n'est pas le cas pour l'hexalysine. Cette différence peut s'expliquer par la capacité des groupements guanidinium à former des liaisons hydrogène bidentates avec les anions de type phosphate, carboxylate ou sulfate (figure 5A). Ils suggèrent que les oligoarginines peuvent donc avoir un caractère hydrophile ou hydrophobe selon les contre-ions associés (voir ci-après).

En 2004, l'équipe de Wender montre également que l'octaarginine peut être transférée de l'eau vers l'octanol en présence d'un acide gras. Lorsque les groupements guanidinium sont alkylés, cette propriété est perdue. Si cette compensation de charges peut expliquer l'insertion dans la membrane, les auteurs suggèrent que le potentiel membranaire est à l'origine de la traversée de la membrane. Le complexe peptide/contre-ions serait capable de migrer dans la membrane dans le sens imposé par le potentiel membranaire et se dissocierait au niveau du feuillet interne. Pour que le

potentiel membranaire puisse servir de force motrice au passage du peptide, il est nécessaire que l'espèce transportée reste globalement chargée positivement. Ceci signifie que tous les guanidiniums ne seraient pas liés à un contre-ion hydrophobe, ce qui peut être le cas si le nombre d'arginines sur le peptide est suffisamment important, et cela peut expliquer pourquoi il faut un nombre suffisant de résidus arginines dans les peptides de type oligoarginines pour observer une internalisation efficace. Afin de mettre en évidence l'importance du potentiel transmembranaire, l'entrée de R8 et Tat dans des cellules est étudiée après dépolarisation ou hyperpolarisation. L'internalisation est réduite dans le premier cas et augmentée dans le second. De même, l'internalisation du peptide amphiphile RW9 (RRWRRRWRR) est fortement diminuée lorsque les expériences sont réalisées en présence d'une forte concentration de  $K^+$  extracellulaire [18]. L'importance du potentiel transmembranaire avait déjà été mise en évidence en 2003 par Terrone *et coll.* en montrant que la pénétratine et l'hexaarginine pénétraient efficacement dans des vésicules lipidiques en présence d'un potentiel transmembranaire. De même en 2007, l'équipe de Nordén a montré que la pénétratine et des analogues peuvent passer d'une phase aqueuse à une phase hydrophobe (octanol) en présence de lipides. L'analogue de la pénétratine où tous les résidus basiques sont des arginines est transféré avec un maximum d'efficacité, suivi de la pénétratine, puis de l'analogue où tous les résidus basiques sont des lysines. Enfin en 2006, le groupe de Futaki a montré que la co-incubation de R8 et de butyrate de pyrène favorisait très nettement la translocation directe par rapport à l'endocytose. Les résidus arginines peuvent se lier *via* une liaison hydrogène bidentate au groupement carboxylate du butyrate de pyrène servant de contre-ion hydrophobe et permettant le passage direct du peptide chargé à travers la membrane (figure 4D).

Dans une même optique, Binder et Lindblom proposent un mécanisme de type électroporation pouvant expliquer comment la pénétratine peut traverser une membrane chargée négativement. La pénétratine s'associe avec le feuillet extérieur de la bicouche et, en s'accumulant, crée un champ électrique transmembranaire dû à la différence de charge entre les deux feuilletts. La membrane devient alors perméable, permettant au peptide de passer. On peut envisager ce type de mécanisme comme « intermédiaire » entre le passage par transfert de phase entraîné par le potentiel transmembranaire et la formation de pores présenté ci-après.

La formation de pores dans la membrane est un mécanisme classique invoqué pour expliquer l'action toxique de

certains peptides antimicrobiens. CPP et peptides antimicrobiens partagent de nombreuses caractéristiques, et la possibilité de l'entrée des CPP par formation de pores transitoires est souvent évoquée. Trois types de pores sont décrits (figure 4A). Dans le modèle « tonneau », les peptides structurés en hélice amphiphile délimitent un canal, la partie hydrophile de l'hélice exposée vers l'intérieur du pore et la partie hydrophobe protégeant les chaînes grasses des lipides du milieu aqueux. Dans le modèle « toroïdal », un continuum se forme entre feuillet interne et feuillet externe de la membrane, stabilisé par les peptides structurés en hélice amphiphile. Enfin, dans le modèle « tapis », le peptide recouvre la membrane et a un effet détergent, entraînant une micellisation de la membrane. La formation de pores comme mécanisme de translocation directe des CPP est très discutée. De nombreuses études sur des membranes modèles tentent de mettre en évidence ce phénomène. Par exemple, la formation de pores a été observée par différentes techniques pour le peptide Tat et les peptides riches en arginines sur des membranes modèles. Les peptides amphiphiles primaires comme TP10, analogue du transporteur, ainsi que Pep-1 et MPG sont également capables de former des pores dans les membranes.

Par un mécanisme plus respectueux de l'intégrité membranaire, les CPP peuvent aussi, pour pouvoir entrer, profiter des zones de la membrane lipidique plus susceptibles d'être déstabilisées, comme les régions avec une tension de surface réduite, formées entre des domaines lipidiques. Cela peut être initié par l'interaction préférentielle du peptide avec des lipides anioniques de la membrane qui conduit ensuite à un recrutement de ces lipides et à la formation de domaines. Ce phénomène a été observé avec la pénétratine par notre laboratoire par des études de microcalorimétrie (DSC) (figure 4C). Une autre possibilité pour la formation de domaines implique l'action de la sphingomyélinase (ASMase), une enzyme qui est normalement présente sur le feuillet interne de la membrane mais qui peut traverser vers le feuillet externe par activation *via* un CPP, comme cela a été montré pour R9 par l'équipe de Brock. Cette enzyme peut alors hydrolyser la sphingomyéline en céramide, entraînant la formation de domaines membranaires riches en céramide pouvant se regrouper. À la frontière des domaines fluides et des domaines rigides riches en céramide, la membrane est plus perméable et les CPP pourraient entrer par cette « faille ». L'entrée des peptides amplifierait l'exposition de l'ASMase sur le feuillet externe, créant ainsi une sorte de boucle de rétroaction positive.

En 2007, l'équipe d'Ayala-Sanmartin a proposé un mécanisme d'entrée indépendant de l'énergie, baptisé « endocytose

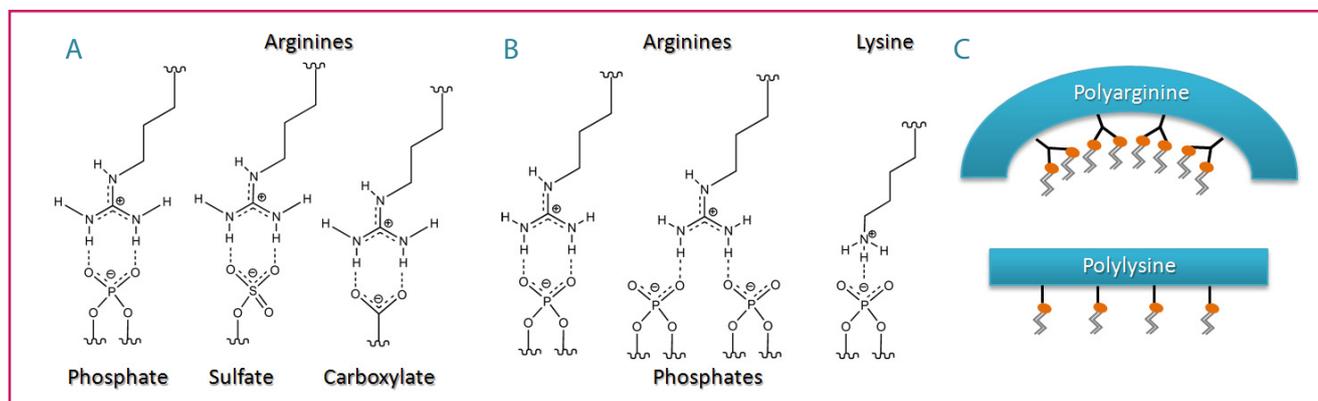


Figure 5 - A : différents types de récepteurs présents à la surface de la membrane ; B : interactions bidentates et monodentates avec les arginines et les lysines ; C : schéma de la courbure membranaire en présence de polyarginine ou de polylysine.

physique », à mi-chemin entre translocation directe et endocytose. Les auteurs ont montré que différents CPP entraînent de fortes déformations de vésicules géantes (tubulation et vésiculation), alors que deux autres peptides membranotropes et non pénétrants n'entraînent pas ce type de déformations. Ces tubes et vésicules seraient stabilisés par la faculté des peptides étudiés à agréger les membranes. La formation de ces structures de déformation pourrait favoriser l'entrée des CPP par voie vésiculaire, mais par un processus purement physique et ne dépendant pas de l'énergie, d'où le terme « endocytose physique ». Pour une description plus détaillée des différents mécanismes d'internalisation et incluant les références des études mentionnées en haut, le lecteur est invité à se référer au travail cité en référence [19].

### Interaction des peptides vecteurs avec la membrane : importance des interactions électrostatiques

Indépendamment du mécanisme d'internalisation employé par le peptide vecteur, endocytose ou translocation directe, la membrane cellulaire reste la première barrière à être rencontrée. Donc l'interaction initiale des peptides vecteurs avec les membranes est une étape cruciale et nous montrerons ci-après l'importance des interactions électrostatiques dans l'interaction peptide/lipide (P/L) et le rôle des résidus tryptophanes (Trp) dans la séquence des peptides vecteurs riches en arginines (Arg).

Pour cela, des approches biophysiques des interactions P/L ont été étudiées en utilisant divers systèmes lipidiques modèles, à la fois en termes de cinétique et de thermodynamique de l'interaction. La titration calorimétrique isotherme (ITC pour « isothermal titration calorimetry ») et la DSC ont été utilisées pour caractériser thermodynamiquement les interactions P/L. Des affinités de l'ordre du  $\mu\text{M}$  et même du  $\text{nM}$  ont été reportées par notre équipe et par d'autres laboratoires, souvent accompagnées d'une enthalpie favorable et d'une capacité calorifique positive mettant en évidence l'importance des interactions électrostatiques entre les peptides et les lipides. La présence de lipides anioniques est essentielle pour rendre les interactions P/L plus fortes, comme cela a été vérifié pour plusieurs peptides vecteurs (pénétratine, Tat, peptides riches en arginine). Des études de résonance plasmonique aux ondes guidées (PWR pour « plasmon waveguide resonance »), une technique développée et installée au laboratoire [20], ont indiqué une augmentation d'environ vingt à cent fois de l'affinité des peptides vecteurs pour les membranes en présence de lipides anioniques. Plusieurs peptides riches en Arg étudiés dans notre laboratoire par calorimétrie et PWR ont montré que dans certains cas, la présence de lipides anioniques était essentielle pour la reconnaissance P/L, et que dans d'autres, elle augmentait considérablement l'affinité (pour une revue sur le thème, voir [21]).

De nombreux CPP sont riches en résidus Arg et donc chargés positivement. L'interaction électrostatique entre lipides chargés négativement et peptide chargé positivement n'est pas la seule origine de la reconnaissance peptide/membrane. Les groupements guanidinium sont connus pour interagir fortement avec les phosphates *via* une liaison hydrogène bidentate (figure 4). Ainsi, Rothbard a montré que des peptides vecteurs riches en Arg étaient capables de se lier aux lipides zwitterioniques et anioniques par liaison bidentate. Ce type de reconnaissance très particulier entre phospholipides et guanidiniums pourrait expliquer en partie le rôle essentiel des arginines pour l'internalisation des CPP, parfois baptisés

« arginine magic ». Ceci induirait une courbure de la membrane et donc une perturbation pouvant conduire à son passage à travers la membrane (figure 5C). Cette interaction prend sans doute beaucoup d'importance au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique qui compte peu de lipides chargés négativement.

### Importance des résidus Trp pour les peptides vecteurs riches en arginine

Les résidus hydrophobes présents dans les séquences des peptides vecteurs jouent un rôle majeur dans l'interaction avec la membrane et sont censés améliorer la translocation des peptides à travers la membrane. Par exemple, la mutation d'un seul résidu de la partie hydrophobe N-terminale du peptide pVec (LLILL) a conduit à une forte diminution de la capacité de ce peptide à s'internaliser. D'autre part, la fuite membranaire par la polyarginine R6 et le peptide Tat a été déclenchée lorsqu'un résidu hydrophobe ou une sonde fluorescente (aussi hydrophobe) ont été rajoutés aux peptides. Néanmoins, le caractère hydrophobe doit être traité avec précaution puisqu'une insertion plus profonde dans la membrane peut conduire à une plus faible capacité d'internalisation car les peptides resteront coincés dans le cœur hydrophobe de la membrane. C'est le cas du peptide RL9 (RLLRRLLRR) qui, comme l'a constaté Warrant, ne s'internalise ni dans les cellules ni dans les liposomes, contrairement au peptide RW9 (RRWWRRWR) [22]. Des études biophysiques approfondies de leur interaction, insertion et positionnement sur la membrane ont démontré, entre autres différences, que RL9 était plus enfoui que RW9 dans la membrane. Il a aussi été montré que lorsque les deux résidus Trp de la pénétratine étaient mutés par des phénylalanines Phe, cet analogue s'insérait aussi plus profondément dans le cœur hydrophobe des micelles anioniques que la pénétratine sauvage.

Parmi d'autres résidus hydrophobes, et au-delà de l'hydrophobie elle-même, les acides aminés aromatiques jouent un rôle particulier par interactions non covalentes des électrons  $\pi$ . Les résidus aromatiques, surtout la tyrosine et Trp, sont prédominants dans les protéines situées au niveau de la surface du feuillet externe de la membrane où elles s'insèrent avec une énergie favorable. Par ailleurs, les résidus Trp sont impliqués dans les processus de déstabilisation de la membrane et leur rôle est important dans l'interaction avec la membrane lipidique et l'internalisation des peptides vecteurs riches en Arg. Des études par RMN et modélisation moléculaire ont mis en évidence des interactions  $\pi$ -cations entre les résidus Trp et les arginines de certains CPP.

Des études plus récentes ont démontré le rôle du Trp dans le processus d'internalisation, rôle qui n'était pas très clair jusqu'à présent. L'équipe de Rydberg a montré qu'un nombre croissant de résidus Trp dans les séquences d'oligoarginines améliore l'internalisation elle-même alors que l'affinité pour les membranes n'est pas affectée. Nous avons révélé que le remplacement des résidus Trp par des Phe dans la séquence du peptide RW9 conduit à une forte diminution, voire une perte (quand tous les résidus sont remplacés) de la capacité d'internalisation cellulaire. Comme cela a aussi été démontré par Rydberg, les affinités pour les membranes sont du même ordre de grandeur pour tous les peptides, et cette absence de relation entre l'affinité du peptide vecteur pour la membrane et son efficacité d'internalisation a souvent été constatée par notre laboratoire (pour une revue, voir [19]). Bechara et Sagan ont réalisé une étude *in vitro* sur l'aspect thermodynamique de l'interaction P/L ainsi que l'internalisation cellulaire

de plusieurs peptides vecteurs contenant des Trp. Ces études indiquent une relation directe entre le nombre de résidus Trp, l'affinité pour les sucres – chondroïtine (CS) et héparane sulfate (HS) – et l'efficacité d'internalisation des peptides vecteurs basiques [23]. Ces peptides, en présence de ces sucres, adoptent une structure en feuillet bêta et forment de gros agrégats, qui jouent alors un rôle positif dans leur internalisation.

## Objectif : de la sélectivité vers la cible

Un des problèmes récurrent dans le système de libération de molécules par les CPP ainsi que d'autres méthodes de vectorisation demeure la spécificité de ciblage de tissus, de cellules ou d'organelles intracellulaires spécifiques dans le but d'optimiser leur efficacité, leur rapidité d'internalisation et de diminuer ainsi les effets secondaires. Afin d'adresser spécifiquement des molécules vers des cellules spécifiques comme les cellules tumorales, il est possible d'exploiter une interaction avec des récepteurs de surface spécifiques de ce type de cellules. Néanmoins, un mécanisme pour faciliter l'internalisation cellulaire reste nécessaire, ce que complique la nature et augmente la taille de la molécule à concevoir. Ainsi, les CPP ont un potentiel intéressant en tant qu'agents non invasifs pour la libération de molécules thérapeutiques ou diagnostiques dans les cellules. Ils ont un caractère cationique très prononcé et cela leur confère des propriétés d'interaction avec les charges négatives de la membrane avec une forte affinité, comme vu ci-dessus. Parmi les CPP susceptibles d'être utilisés à des fins thérapeutiques, le peptide Tat et la pénétratine ont prouvé leur efficacité lors de nombreuses études et sur différents types de cellules, mais sans une spécificité particulière. Kondo et coll. ont identifié en 2012 une série de CPP capable de cibler les cellules tumorales [24]. Ces CPP sont composés d'une forte proportion en acides aminés basiques. La polyarginine (R9) est capable de s'internaliser dans tous les types de cellules (prouvant sa non-spécificité), tandis que dans la série de peptides conçus par Kondo, certains CPP sont capables de s'internaliser dans des lignées cancéreuses spécifiques. On les appelle les « tumor-homing peptides », peptides ciblant spécifiquement les tumeurs. Notre laboratoire a développé un conjugué peptidique composé de la pénétratine lié par un pont disulfure à KLA ((KLAKLAK)<sub>2</sub>), un peptide apoptotique. Ce conjugué est efficace et sélectif pour diminuer la viabilité de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses, comme l'a montré l'équipe de Diane Braguer. Il agit sur le réseau mitochondrial, conduisant à sa désorganisation et ceci seulement sur des cellules cancéreuses (figure 6) [25].

Des études biophysiques effectuées au sein du laboratoire sur des systèmes zwitterioniques et anioniques, dans le but de modéliser respectivement la membrane de cellules saines et cancéreuses, ont montré une interaction et une perturbation significative uniquement sur le modèle de cellule cancéreuse. Ceci suggère alors que le caractère anionique plus prononcé des cellules cancéreuses peut être une des causes de la sélectivité observée du conjugué.

La composition de la membrane joue un rôle particulier lors de l'internalisation cellulaire des CPP. Les lipides avec une tête polaire PS sont normalement présents en faible quantité du côté extracellulaire mais en quantité très élevée du côté intracellulaire de la membrane. Une redistribution de ce lipide sur la membrane plasmique a été cependant mise en évidence sur les cellules tumorales et apoptotiques. Ce lipide agirait comme une « alerte cellulaire » en passant du

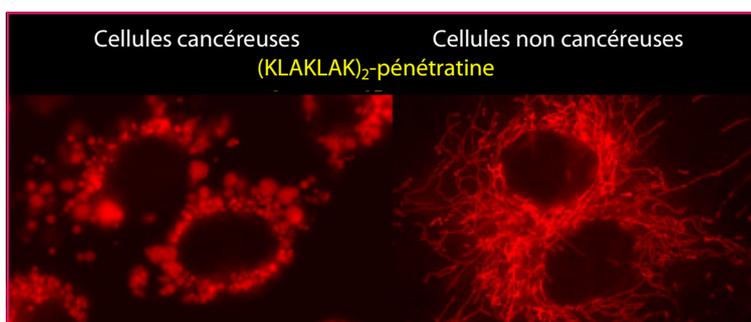


Figure 6 - Effet du peptide KLA-pénétratine sur le réseau mitochondrial de cellules saines et cancéreuses (d'après [25]).

côté interne au côté externe de la membrane des cellules et permettrait à la cellule d'être « repérée » par les phagocytes. Ce signal agirait comme un facteur efficace de reconnaissance une fois les phagocytes attirés près de la cellule. La PS, exprimée à la surface des cellules endothéliales prolifératives, est ainsi un marqueur pour les vaisseaux sanguins angiogènes. La PS est donc un élément important pour le diagnostic de cellules apoptotiques, mais aussi pour le ciblage de ces cellules. De plus, il a été démontré que l'expression d'HSPG (héparane sulfate protéoglycane, molécule de sucre complexe présente à la surface de certaines cellules) à la surface des cellules cancéreuses était plus prononcée. Il semble donc que les charges négatives s'accumulent à la surface d'une cellule malade ou en phase d'être détruite par l'organisme. Des études ont prouvé que les CPP présentent une affinité plus élevée pour les membranes chargées négativement, comme cela est décrit plus haut. Les arginines ont ainsi été mises en évidence comme résidus « magiques ». En effet, lorsque les résidus basiques des CPP sont des arginines, les CPP sont efficacement internalisés, tandis que le remplacement des arginines par des lysines abolit totalement l'internalisation des CPP (figure 6). De même, des cellules déficientes en certains carbohydrates comme les glycosaminoglycanes (GAG) à la surface de leurs membranes internalisent moins bien les CPP. Ainsi, le caractère anionique plus marqué du feuillet externe des cellules tumorales vis-à-vis de cellules saines peut être un point à exploiter pour une sélectivité de certains CPP vers des cellules tumorales.

Des études sont en cours afin de déterminer si effectivement des interactions électrostatiques plus prononcées entre les CPP ayant une activité sélective antitumorale et les membranes de cellules tumorales sont une propriété commune à ce type de chevaux de Troie.

*L'auteur remercie tous les membres de ses précédents (UMR 7203, Laboratoire des Biomolécules, Université Pierre et Marie Curie) et présent (UMR 5240, CBMN, Université de Bordeaux) laboratoires de leur confiance, leur inspiration et leur aide au quotidien pendant ces dernières années, et plus particulièrement Sandrine Sagan, Solange Lavielle, Gérard Chassaing, Étienne Harté et Sophie Lecomte. Elle remercie aussi les étudiants avec lesquels elle a eu le plaisir de travailler et qui ont partagé son enthousiasme pour la recherche (Astrid Walrant, Marie-Lise Jobin, Chen-Yu Jiao, Cherine Bechara et beaucoup d'autres), ainsi que les organismes qui ont financé ses activités de recherche : le CNRS, la Région Aquitaine, la Ligue contre le cancer et la société Biocodex. Un grand merci aussi au CNRS et à l'Institut de Chimie pour l'attribution de la Médaille de bronze.*

## Références

- [1] Frankel A.D., Pabo C.O., Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell*, **1988**, 55, p. 1189.
- [2] Green M., Loewenstein P.M., Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein, *Cell*, **1988**, 55, p. 1179.
- [3] Vives E., Brodin P., Lebleu B., A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, p. 16010.
- [4] Joliot A. et al., Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88, p. 1864.
- [5] Derossi D. et al., The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269, p. 10444.
- [6] Derossi D. et al., Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, p. 18188.
- [7] Elmquist A. et al., VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions, *Exp. Cell. Res.*, **2001**, 269, p. 237.
- [8] Wender P.A. et al., The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptidic molecular transporters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, p. 13003.
- [9] Futaki S. et al., Arginine-rich peptides: an abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery, *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, p. 5836.
- [10] Crombez L. et al., A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells, *Mol. Ther.*, **2009**, 17, p. 95.
- [11] Oehlke J. et al., Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1414, p. 127.
- [12] Langel U. et al., A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and reverses its inhibition by ouabain, *Regul. Pept.*, **1996**, 62, p. 47.
- [13] Pooga M. et al., Cell penetration by transportan, *FASEB J.*, **1998**, 12, p. 67.
- [14] Morris M.C. et al., A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells, *Nat. Biotechnol.*, **2001**, 19, p. 1173.
- [15] Deshayes S. et al., Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis, *Biochemistry*, **2004**, 43, p. 1449.
- [16] Morris M.C. et al., Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics, *Biol. Cell.*, **2008**, 100, p. 201.
- [17] Alves I.D., Goasdoué N., Correia I., Aubry S., Galanth C., Sagan S., Lavielle S., Chassaing G., Membrane interaction and perturbation mechanisms induced by two cationic cell penetrating peptides with distinct charge distribution, *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1780, p. 948.
- [18] Delaroche D., Aussedat B., Aubry S., Chassaing G., Burlina F., Clodic G., Bolbach G., Lavielle S., Sagan S., Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, p. 1932.
- [19] Alves I.D., Walrant A., Bechara C., Sagan S., Is there anybody in there? On the mechanisms of wall crossing of cell penetrating peptides, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2012**, 13, p. 658.
- [20] Harte E., Maalouli N., Shalabney A., Texier E., Berthelot K., Lecomte S., Alves I.D., Probing the kinetics of lipid membrane formation and the interaction of a nontoxic and a toxic amyloid with plasmon waveguide resonance, *Chem. Comm.*, **2014**, 50, p. 4168.
- [21] Jobin M.L., Alves I.D., On the importance of electrostatic interactions between cell penetrating peptides and membranes: a pathway toward tumor cell selectivity?, *Biochimie*, **2014**, S300-9084, p. 213.
- [22] Walrant A., Correia I., Jiao C.Y., Lequin O., Bent E.H., Goasdoué N., Lacombe C., Chassaing G., Sagan S., Alves I.D., Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides, *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1808, p. 382.
- [23] Bechara C., Pallerla M., Zaltsmar Y., Burlina F., Alves I.D., Lequin O., Sagan S., Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis, *FASEB J.*, **2012**, 27, p. 738.
- [24] Kondo E. et al., Tumour lineage-homing cell-penetrating peptides as anticancer molecular delivery systems, *Nat. Commun.*, **2012**, 3, p. 951.
- [25] Alves I.D., Carré M., Montero M-P., Castano S., Lecomte S., Marquant R., Lecorché P., Burlina F., Schatz C., Sagan S., Chassaing G., Braguer D., Lavielle S., A proapoptotic peptide conjugated to penetratin selectively inhibits tumor cell, *BBA Biom.*, **2014**, 1838, p. 2087.

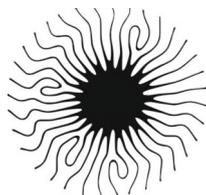


Isabel D. Alves

est chargée de recherche au CBMN (Institut de chimie et biologie des membranes et des nano-objets), Université de Bordeaux\*.

Elle a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2013.

\* CBMN, UMR 5248 CNRS, Université de Bordeaux, Bât. B14, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, F-33600 Pessac. Courriel : i.alves@cbmn.u-bordeaux.fr



## MATIÈRE et SYSTÈMES COMPLEXES

### UMR 7057



université  
**PARIS DIDEROT**  
PARIS 7

**Ouverture d'un poste d'ingénieur d'étude en Chimie par mobilité interne (NOEMI) pour le laboratoire MSC (UMR 7057 CNRS Université Paris Diderot)**

**Profil de poste : Ingénieur en techniques de synthèses chimiques BAP B** : Sciences chimiques et sciences des matériaux, nomenclature Referens MESR : B2D24

**Contexte.** Le laboratoire MSC (UMR 7057) est une unité mixte de recherche CNRS – Université Paris Diderot. Il est localisé sur le site de Paris Rive Gauche (Bâtiment Condorcet) et est composé de 140 personnes (dont une équipe technique d'une quinzaine de membres). Le laboratoire MSC est un laboratoire pluridisciplinaire menant des recherches aux interfaces de la physique, de la biologie, de la physico-chimie de la matière molle (polymères, nanoparticules) et de la science des matériaux, avec des applications en nanomédecine.

**Missions.** L'ingénieur(e) recruté(e) aura la responsabilité de la gestion et de la maintenance des laboratoires et des équipements de chimie de l'unité ainsi que du budget correspondant. Il ou elle travaillera en collaboration avec les chercheurs chimistes du laboratoire et sera l'interlocuteur des chercheurs amenés à utiliser les laboratoires de chimie pour des synthèses chimiques et des préparations dans le domaine des polymères, des nanoparticules, de la fonctionnalisation de surface, de l'élaboration de matériaux actifs et du marquage fluorescent. Il ou elle servira de référence en matière d'hygiène et sécurité chimique en relation avec l'assistant de prévention.

**Contact :** Loïc Auvray, Directeur, [loic.auvray@univ-paris-diderot.fr](mailto:loic.auvray@univ-paris-diderot.fr)