

Des polymères synthétiques bio-inspirés par les protéines

Résumé Les protéines sont des polymères naturels qui présentent de nombreuses caractéristiques encore inégalées par leurs homologues synthétiques. En chimie, la voie la plus économique et la plus efficace pour obtenir des polypeptides est la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) d'un monomère d'acide aminé N-carboxyanhydride (NCA). Bio-inspirées par les protéines, des approches récentes utilisant cette ROP montrent qu'une simple copolymérisation de NCA permet de mimer l'activité et la topologie des protéines, que les polypeptides de synthèse obtenus reproduisent la conformation et l'adaptation des protéines et que la ROP peut être mise en œuvre dans l'eau à l'instar de la traduction des protéines.

Mots-clés Chimie bio-inspirée, acides aminés, polypeptides, polymères biomimétiques.

Abstract Synthetic polymers bio-inspired by proteins

Proteins are natural building blocks that have many features still unrivaled by their synthetic counterparts. Interestingly, the most economical and efficient route to polypeptides is a chemical methodology: the ring-opening polymerization (ROP) of amino acid N-carboxyanhydride (NCA) monomer. Recent progress shows that a simple copolymerization of NCA gives access to macromolecules with protein-like activity and topology that reproduce protein conformation and adaptation, and that ROP can be carried out in water in the same way as protein translation.

Keywords Bioinspired chemistry, amino acids, polypeptides, protein-like polymers.

Dans la nature, les protéines fournissent un support physiologique aux cellules, aux tissus et aux organes, mais elles participent aussi à une myriade de processus métaboliques, notamment via la catalyse de réactions biochimiques, la régulation de signaux cellulaires et le transport de molécules. Dans ce contexte, utiliser des protéines pour la conception de nouveaux médicaments ou bien pour fabriquer de nouveaux matériaux devient extrêmement prometteur dans de nombreuses applications [1]. En particulier, et pour promouvoir la durabilité, ce sont des polymères de choix, à la fois dégradables et métabolisables.

Produire des protéines reste encore un défi

Les méthodologies qui utilisent le génie génétique ou la biologie synthétique sont souvent très coûteuses et nécessitent un développement important de plateformes biotechnologiques

spécifiques, ce qui limite encore l'échelle et la portée de ces voies de préparation [2]. La conception de « protéines synthétiques » via la chimie (synthèse *de novo*) est une approche alternative qui vise à reproduire, sans la biologie, la structure peptidique macromoléculaire de ces protéines. Il existe dans ce contexte deux voies majeures de préparation :

- La reproduction complète de la séquence primaire qui repose sur des méthodologies de synthèse multi-étapes dites de couplage itératif – par exemple, la synthèse supportée de Merrifield qui eut le prix Nobel en 1984 (SPPS, *figure 1*) [3]. Ces méthodes permettent la préparation d'oligomères à séquences contrôlées [4], mais l'utilisation d'un long processus combinant plusieurs étapes implique également que la taille des macromolécules est souvent limitée, que la production rentable à l'échelle du gramme est souvent un défi, et que la préparation de nouvelles structures synthétiques nécessite un schéma de synthèse spécifique qui doit être optimisé [5].

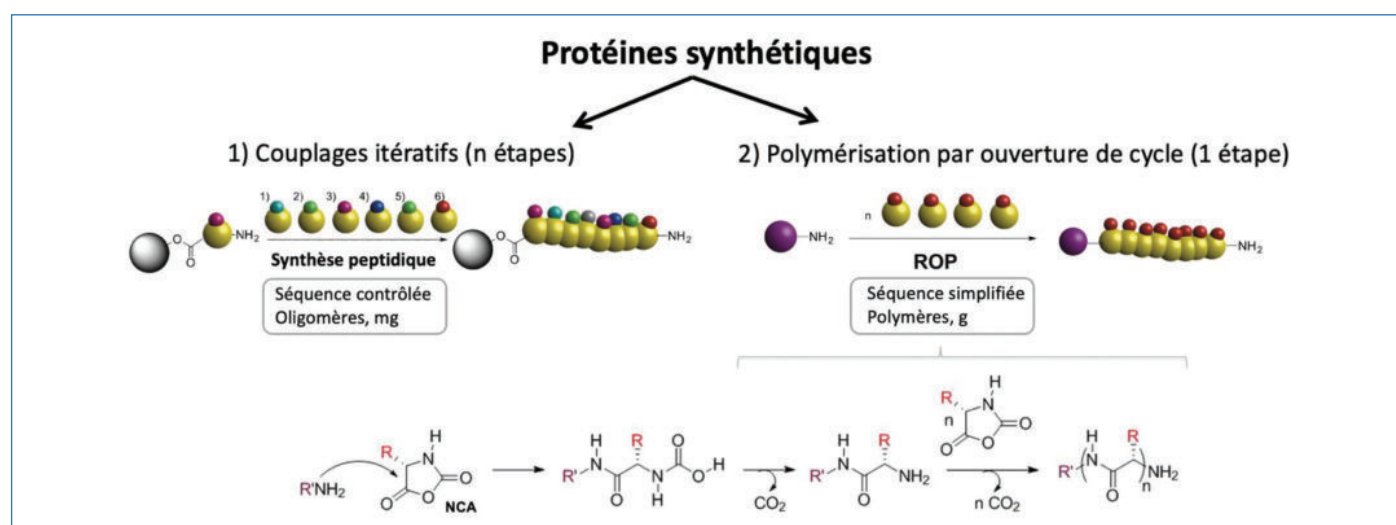


Figure 1 - La préparation de protéines synthétiques peut se faire via la synthèse peptidique (couplages itératifs) ou via la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) des N-carboxyanhydrides (NCA). Sur le schéma, les boules en jaune représentent les acides aminés, les plus petites boules d'une autre couleur leurs chaînes latérales.

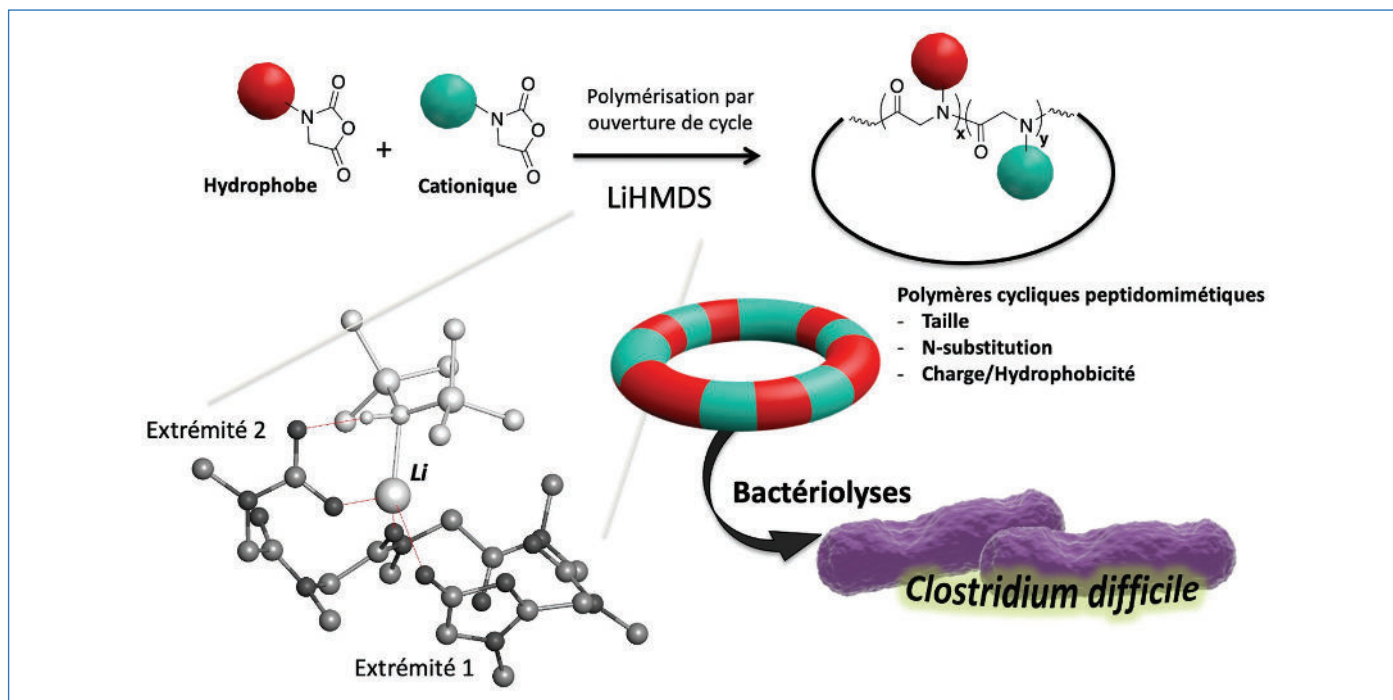


Figure 2 - Les copolymères peptidiques peuvent être des analogues simplifiés des peptides antimicrobiens. Leur synthèse très simple à mettre en œuvre permet de combiner plusieurs fonctions, tout en mettant en œuvre une ingénierie macromoléculaire permettant de mimer la topologie cyclique des modèles naturels.

Ces trois limitations sont des inconvénients significatifs qui freinent souvent l'utilisation de la synthèse peptidique à large échelle, par exemple pour concevoir des matériaux.

- Un procédé plus efficace pour préparer des structures peptidiques macromoléculaires via un procédé de polymérisation en une étape : la polymérisation par ouverture de cycle (ROP, figure 1) de monomères N-carboxyanhydrides (NCA) dérivés d'acides aminés [6]. Les polymères peptidiques ou polypeptides issus de cette polymérisation sont des macromolécules plus simples que les protéines naturelles : ce sont des homopolymères ou des copolymères avec des séquences primaires statistiques, etc. Comparés à d'autres polymères, les polypeptides combinent les caractéristiques avantageuses des macromolécules synthétiques (solubilité, traitement, élasticité, etc.) avec celles des protéines naturelles (structure secondaire, fonctionnalité, biocompatibilité, etc.) [7]. Un enjeu de recherche important pour cette famille de polymères consiste à mieux reproduire les propriétés structurales et fonctionnelles de leurs modèles naturels : les protéines (par exemple, pour leur conférer des activités thérapeutiques ou catalytiques spécifiques).

La copolymérisation pour mimer l'activité et la topologie des peptides naturels

Pour de nombreux systèmes vivants, la réponse à une infection implique la sécrétion de peptides antimicrobiens (AMP). Ces macromolécules à séquence contrôlée ont des structures chimiques très diverses et possèdent des caractéristiques structurales clés qui leur confèrent leurs propriétés biologiques : la nature des acides aminés qui constituent le squelette peptidique, l'hydrophobie globale, la charge globale de la macromolécule, sa topologie, sa structuration, etc. [8]. En particulier, les peptides antimicrobiens sont souvent cycliques (c-AMP) : comparés à leurs analogues linéaires, ils présentent une toxicité plus faible et ciblent plus sélectivement certaines bactéries.

C'est dans ce contexte que nous avons mis au point une méthode de copolymérisation en une étape permettant de mimer la séquence et la topologie de ces c-AMP. Nous avons d'abord développé la synthèse de différents monomères dérivés de la glycine qui sont N-substitués avec des groupes hydrophobes (figure 2, en rouge) et cationiques (figure 2, en bleu). Dans une deuxième étape, nous avons mis en œuvre leur polymérisation par ROP : nos travaux nous ont permis de révéler une voie d'accès nouvelle à des macromolécules cycliques grâce à l'utilisation d'un amorceur particulier, le di-amidure de lithium (LiHMDS). Durant la polymérisation, ce dernier favorise un mécanisme dans lequel l'amorceur et les extrémités du polymère sont stabilisés par un même complexe grâce à l'atome de Li (figure 2). Cette méthodologie nous a permis de moduler la taille et la composition du polymère en ajustant la stœchiométrie des monomères NCA et celle du LiHMDS [9].

Dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut Pasteur, nous avons finalement évalué le potentiel antibactérien de nos copolymères sur *C. difficile*, un agent pathogène à l'origine de maladies nosocomiales très graves, surtout chez les personnes âgées. Une étude approfondie des relations structure/activité a été réalisée en modulant certains paramètres macromoléculaires : contenu hydrophobe, nature du monomère (chaînes latérales hydrophobes et cationiques), degré de polymérisation, etc. Cette étude nous a permis de définir des pharmacophores macromoléculaires permettant de tuer sélectivement cette bactérie [9]. Un brevet a été déposé et nous développons en ce moment cette approche avec un partenaire industriel dans la perspective de valoriser les résultats de nos travaux [10].

Avec cette approche de copolymérisation, l'intérêt est le fait qu'une simple copolymérisation nous permet de mimer l'activité biologique normalement associée à la topologie et à la séquence primaire complexes de protéines/peptides naturels, ici les c-AMP. Cette simplification dans la conception ouvre de nombreuses perspectives comme le fait de produire

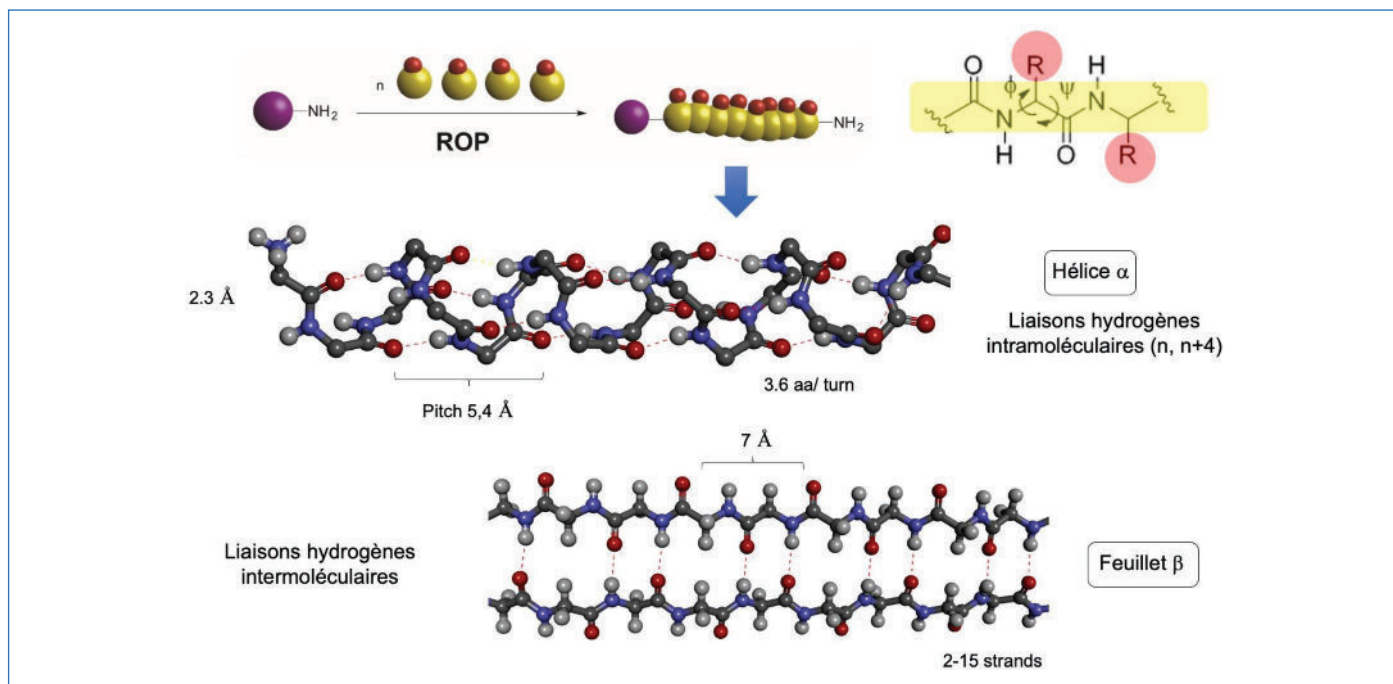


Figure 3 - Les polypeptides sont des analogues simplifiés des protéines qui reproduisent leurs structurations naturelles. Ici, deux exemples représentatifs de structuration : l'hélice α , conformation stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires, et le feuillet β , une conformation stabilisée par des liaisons hydrogènes intermoléculaires.

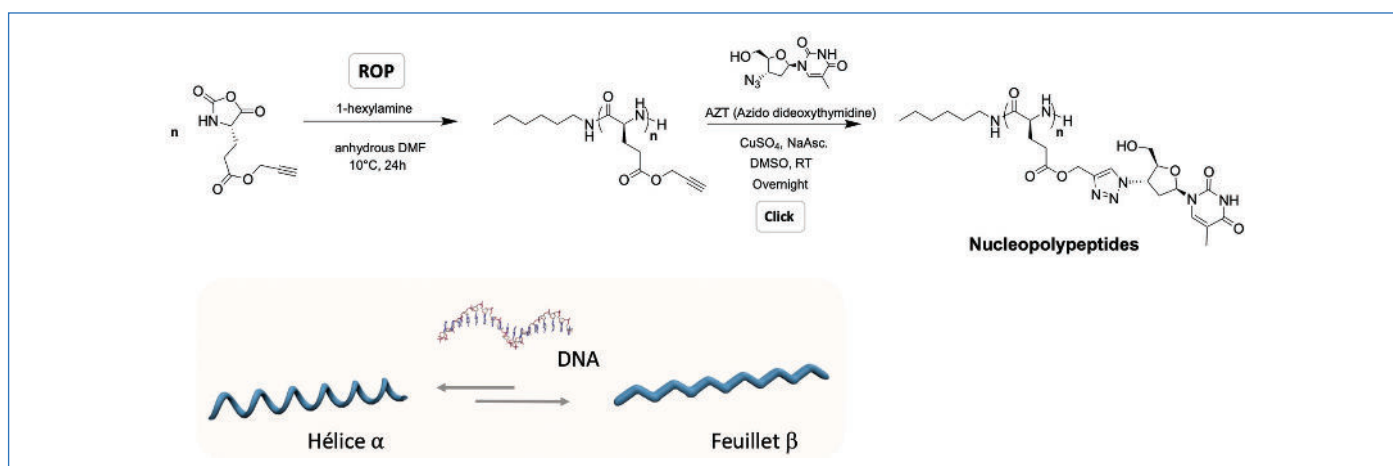


Figure 4 - Les nucléopolypeptides sont des analogues simplifiés des nucléoprotéines (ex. leucine zipper). Ce sont des polymères préparés en deux étapes simples : polymérisation (ROP) et cycloaddition de Huisgen (click). En présence de certaines séquences d'ADN, ces polymères peuvent adapter leurs structures pour mieux interagir avec des adénosines, une interaction qui a été étudiée en solution et à la surface de nanomatériaux.

beaucoup plus facilement des structures peptidiques d'intérêt pour l'infectiologie (traitement oral, etc.).

Les polymères peptidiques pour mimer la conformation et l'adaptation des protéines

Les polymères peptidiques sont plus simples que les protéines : un ou plusieurs acides aminés sont répétés plusieurs fois dans une séquence primaire qui n'est pas contrôlée. Malgré cela, les polymères peptidiques conservent la propriété de former des structures secondaires, des blocs rigides stabilisés localement par des liaisons hydrogènes aboutissant à une conformation privilégiée [7]. Historiquement, les polymères peptidiques ont ainsi servi de modèles pour éluder la structure des protéines : les structurations secondaires en hélice α et en feuillet β qui ont été découvertes par Pauling et Corey à l'Institut de technologie de Californie en 1951, deux ans avant la résolution de la structure de l'ADN par Watson et Crick (figure 3) [11].

Grâce à leurs structurations, les polymères peptidiques sont des candidats idéaux pour imiter les systèmes protéiques adaptatifs qui subissent des changements conformationnels en réponse à divers stimuli externes (température, pH, etc.). Nous avons démontré que des stimuli biologiquement pertinents tels que le pH, les changements redox ou encore la complexation à des métaux permettent de déclencher une transition conformationnelle réversible de ces polymères, comme on peut l'observer dans la nature avec les métalloprotéines [12].

Nous avons aussi développé une nouvelle classe de polypeptides intelligents, appelés nucléopolypeptides, qui sont des analogues des nucléoprotéines, des protéines qui interagissent spécifiquement avec les acides nucléiques dans le noyau cellulaire des systèmes vivants [13]. Nos polymères ont des chaînes latérales fonctionnalisées avec des nucléobases de façon à promouvoir un appariement spécifique avec les chaînes latérales de l'ADN (figure 4). En présence de certaines séquences d'ADN, l'adaptation conformationnelle de nos

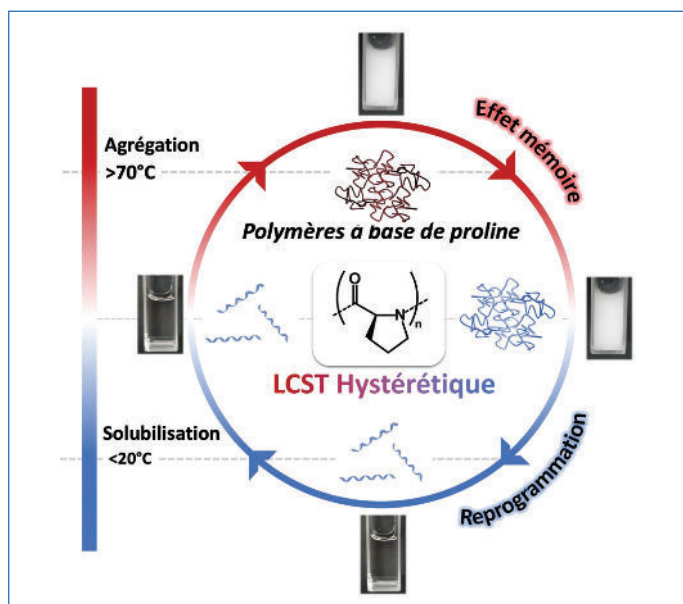


Figure 5 - Les polymères synthétiques constitués d'unités monomères de L-proline présentent une agrégation dans l'eau induite par la température avec une hystérèse sans précédent. Ce comportement semblable à celui de certaines protéines est robuste et est régi par la chiralité des unités de proline. Il ouvre la voie à de nouveaux procédés/matériaux qui seront pilotés par de simples changements de température ou de force ionique.

polymères permet d'optimiser leur interaction avec les nucléobases, une propriété peu commune en dehors des systèmes protéiques.

La polymérisation des NCA dans l'eau : une traduction simplifiée pour préparer des polypeptides

Former efficacement des liaisons peptidiques en milieu aqueux reste encore un défi pour la chimie de synthèse, alors que la traduction des protéines est un processus biologique aqueux très performant [14]. La réactivité particulière des NCA dérivés d'acides aminés dans cette même phase aqueuse, si l'on sait contrôler leur hydrolyse, permet de simplifier la traduction des protéines par une simple réaction de polymérisation dans l'eau. En suivant ce principe, nous avons par exemple développé la ROP des NCA en adaptant les procédés dits PISA (polymérisation induite par auto-assemblage) à l'obtention de polypeptides amphiphiles [15]. Ce procédé, appelé ROPISA, permet la formation de copolymères à blocs en phase aqueuse possédant une partie hydrophile et une autre hydrophobe qui forment des nanostructures qui ont la particularité d'être non sphériques (anisotropes). Cela signifie que leurs propriétés, par exemple optiques, changent selon leur orientation collective, ce qui est rarement observé avec des nanoparticules de polymère. Un brevet a été déposé et nous avons établi que la structuration secondaire des polymères peptidiques est à l'origine de l'efficacité du procédé, ainsi que de la forme spécifique des nano-objets [16]. Très récemment, en étudiant la polymérisation dans l'eau d'un monomère spécifique, la proline NCA – dans ce cas sans auto-assemblage –, nous avons aussi découvert que la conformation des polypeptides donnait lieu à une sensibilité thermique originale grâce à la phase aqueuse. Les macromolécules que nous avons synthétisées gardent la mémoire de leur agrégation (figure 5), une propriété pour l'instant observée en biologie avec des systèmes protéiques plus complexes (protéines dérivées de l'élastine par exemple),

mais qu'il était difficile de reproduire avec des polymères de synthèse, obtenus par exemple par chimie radicalaire (PNIPAM). L'utilisation de ce phénomène d'hystérèse pourrait permettre de concevoir de nouveaux procédés/matériaux pouvant tirer profit de cet effet mémoire [17].

Ces quelques exemples représentatifs montrent comment les polymères synthétiques à base d'acides aminés représentent une classe unique de macromolécules biomimétiques car : ils présentent le même squelette macromoléculaire que les protéines ; ils peuvent être obtenus à grande échelle (g, kg) et en une seule étape en utilisant la méthodologie de polymérisation par ouverture de cycle ; la combinaison aléatoire des acides aminés permet de reproduire certaines propriétés des protéines que l'on attribue à leurs séquences contrôlées ; la polymérisation est un moyen simple d'accéder à des topologies complexes (non linéaires : cycliques, branchées, etc.) ; et ils peuvent se replier en différentes structures secondaires comme le font les protéines, ce qui leur donne des propriétés physico-chimiques originales.

- [1] H. Zhang *et al.*, Fabrication and mechanical properties of engineered protein-based adhesives and fibers, *Adv. Mater.*, **2020**, 32(6), 1906360 ; A.J.D. Silvestre *et al.*, Protein-based materials: from sources to innovative sustainable materials for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 2, 3715.
- [2] J.K. Montclare *et al.*, Protein-engineered functional materials, *Adv. Health. Mater.*, **2019**, 8(11), 1801374.
- [3] R.B. Merrifield, Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, p. 2149-54.
- [4] J.F. Lutz *et al.*, Synthesis of non-natural sequence-encoded polymers using phosphoramidite chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, p. 5629-85.
- [5] C.H. Wong, S.C. Zimmerman, Orthogonality in organic, polymer, and supramolecular chemistry: from Merrifield to click chemistry, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, p. 1679-95.
- [6] G. Qiao *et al.*, Ring opening polymerization of α -amino acids: advances in synthesis, architecture and applications of polypeptides and their hybrids, *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, 49, p. 4737-4834.
- [7] C. Bonduelle, Secondary structures of synthetic polypeptide polymers, *Polym. Chem.*, **2018**, 9, p. 1517-29.
- [8] C. Bonduelle *et al.*, Synthetic polypeptide polymers as simplified analogues of antimicrobial peptides, *Biomacromolecules*, **2021**, 22(1), p. 57-75.
- [9] C. Bonduelle *et al.*, Cyclic poly(α -peptoids) by lithium bis(trimethylsilyl)amide (LiHMDS)-mediated ring-expansion polymerization: simple access to bioactive backbones, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, p. 3697-3702 ; www.inc.cnrs.fr/en/node/2990
- [10] Antimicrobial cationic peptoid and *N*-substituted peptidic copolymers, preparation and uses thereof, WO2022175319A1.
- [11] D. Eisenberg, The discovery of the α -helix and β -sheet, the principal structural features of proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100, p. 11207-210.
- [12] C. Bonduelle *et al.*, Cd^{2+} coordination: an efficient structuring switch for polypeptide polymers, *Polym. Chem.*, **2018**, 9(30), 4077.
- [13] C. Bonduelle *et al.*: Nucleopolypeptides with DNA-triggered α helix-to- β sheet transition, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, p. 7501-04 ; Ionic polypeptide polymers with unusual β -sheet stability, *Biomacromolecules*, **2018**, 19, p. 4068-74 ; Amphiphilic nucleobase-containing polypeptide copolymers-synthesis and self-assembly, *Polymers*, **2020**, 12, 1357.
- [14] J.W. Bode *et al.*, Rethinking amide bond synthesis, *Nature*, **2011**, 480, p. 471-479.
- [15] C. Bonduelle *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 622 ; www.inc.cnrs.fr/fr/cnrsinfo/une-synthese-et-un-auto-assemblage-verts-pour-les-polypeptides
- [16] Method for preparing controlled peptide-based polymers and copolymers in an aqueous solution, WO2021043865A1 ; C. Bonduelle *et al.*, Aqueous ROPISA of α -amino acid *N*-carboxyanhydrides: polypeptide block secondary structure controls nanoparticle shape anisotropy, *Polym. Chem.*, **2021**, 12, p. 6242-51.
- [17] C. Bonduelle *et al.*, Memory effect in thermoresponsive proline-based polymers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, e202209530 ; Synthetic polymers and copolymers with hysteresis properties EP22306210.0 ; www.inc.cnrs.fr/fr/cnrsinfo/un-effet-memoire-exceptionnel-dans-des-gels-polymers-thermosensibles-base-de-proline

Colin BONDUELLE,
Chercheur au CNRS, Laboratoire de chimie des polymères organiques (LCPO), Université de Bordeaux/CNRS/Bordeaux INP.

* colin.bonduelle@enscbp.fr