

Des peptides cationiques pour une pharmacologie intracellulaire

Gérard Chassaing et Solange Lavielle

Résumé

Il y a une vingtaine d'années, il a été établi que des peptides cationiques, porteurs de plusieurs charges positives, pouvaient pénétrer dans une cellule et donc traverser la bicouche lipidique. Qui plus est, ces peptides, appelés peptides pénétrants, sont capables de véhiculer dans une cellule une autre molécule qui n'y pénétrerait pas par elle-même ; ces molécules transportées sont appelées cargos. Cette découverte, qui a bousculé le dogme de l'imperméabilité de la membrane plasmique aux espèces chargées, a ouvert la voie à une pharmacologie intracellulaire. Bien que le(s) mécanisme(s) de pénétration reste(nt) encore sujet à controverses, le potentiel de cette stratégie de vectorisation est explorée en parallèle de stratégies à base de nanoparticules (liposomes, polymères ou autres colloïdes...).

Mots-clés

Peptides, molécules cargos, pharmacologie intracellulaire, vectorisation, nanoparticules.

Abstract

Peptides for intracellular pharmacology

It was established some twenty years ago that cationic peptides, bearing several positive charges, could enter a cell meaning that they were capable to cross the lipid bilayer. Moreover, these peptides, called cell penetrating peptides (CPP), are able to convey in a cell another molecule, which by itself will not penetrate into the cell; these molecules are called cargoes. This discovery, which has knocked down the dogma on the impermeability of the plasma membrane to charged species, has opened an avenue to an intracellular pharmacology. While the penetration mechanism(s) is (are) still subject to controversy, the potential of this strategy is now explored in parallel to other vectorization strategies based on nanoparticles (liposomes, polymers or other colloids...).

Keywords

Peptides, cargoes molecules, intracellular pharmacology, vectorization, nanoparticles.

Pendant longtemps, la bicouche lipidique de la membrane plasmique a été considérée comme l'ultime rempart à l'entrée de molécules chargées dans une cellule. En 1978, il a été montré que la modification covalente de l'albumine et de la peroxydase du raifort par de la poly-L-lysine (30 acides aminés) augmentait considérablement leur internalisation dans des fibroblastes de souris [1]. Dix ans plus tard, il a été établi que la protéine tat (86 acides aminés) du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 [2] et l'homéodomaine d'*Antennapedia* (60 acides aminés) [3] étaient capables de pénétrer dans les cellules. Cette propriété a été associée à un domaine basique, bousculant non sans difficulté le dogme du rempart infranchissable. Ces domaines basiques varient d'une protéine à l'autre ; ils sont constitués de 13 à 16 acides aminés et contiennent majoritairement des acides aminés cationiques (protéine tat : GRKKRRQRRPPQ [4] et l'hélice III de l'homéodomaine d'*Antennapedia* : RQI-KIWFQNRMMKWKK, appelé pénétratine [5]). Qui plus est, ces domaines couplés par liaison covalente à une autre molécule « bioactive » permettent de convoier à l'intérieur d'une cellule la molécule, appelée cargo, incapable de traverser par elle-même. Depuis, de nombreux peptides pénétrants (ou CPP pour « cell penetrating peptides ») ont été proposés ; ce sont des fragments de protéines, des peptides de synthèse (par ex. la nonaarginine RRRRRRRRR [6]), des dérivés d'acides aminés, des sucres, des dendrimères ou des répartiteurs de fonctions projetant dans l'espace des fonctions guanidiniums [7]. Certains de ces dérivés, dont la structure de base dépasse largement le cadre de briques liées par des liaisons amide, sont cependant classés sous le terme générique de CPP. Ces découvertes ont ouvert la porte à une nouvelle pharmacologie intracellulaire, avec deux stratégies envisageables impliquant un couplage covalent résorbable à l'intérieur de la cellule entre les deux partenaires (par exemple un pont disulfure

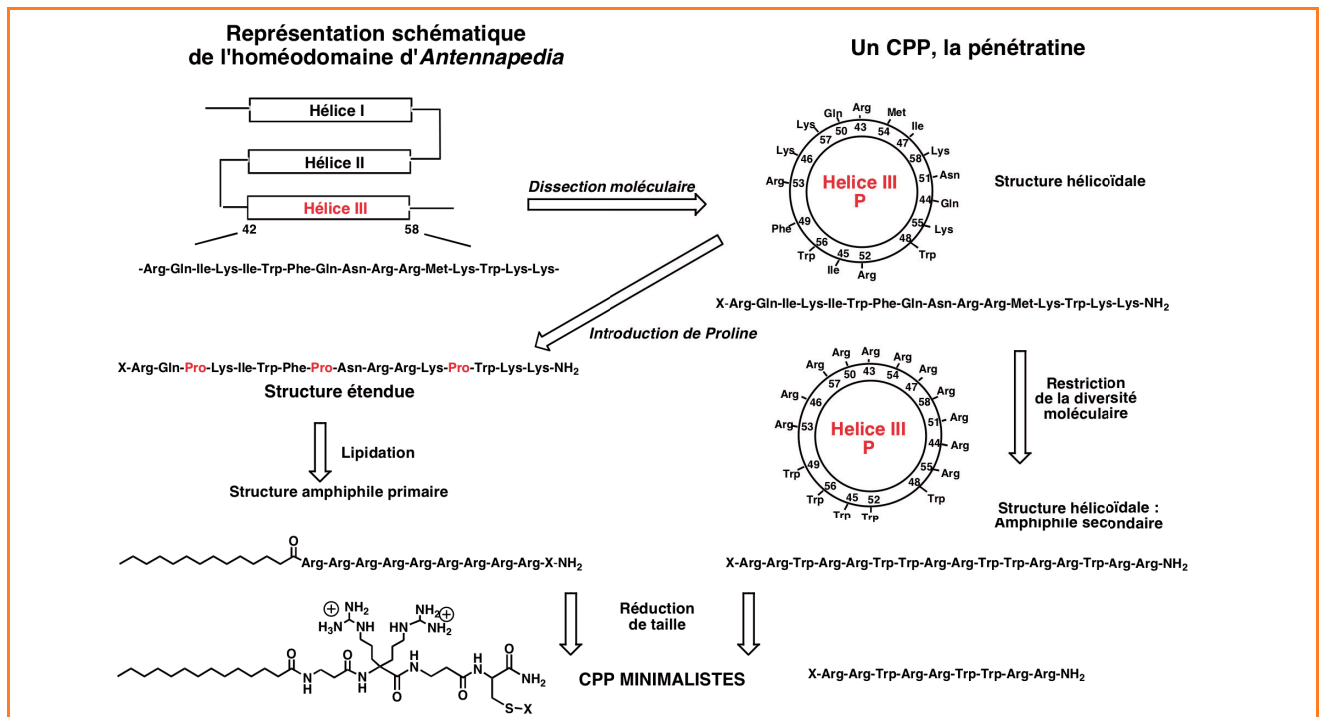
S-S) ou par assemblage non covalent des partenaires conduisant à des nanoparticules [8].

Dans cet article, nous décrivons la contribution de notre laboratoire dans le domaine des CPP, travaux initiés au début des années 90 en collaboration avec le groupe d'Alain Prochiantz.

Recherche de corrélations entre la structure des peptides pénétrants et leur capacité d'internalisation

Nous avons tout d'abord préparé différents analogues de la pénétratine incorporant tous une biotine pour permettre une détection sur gel d'électrophorèse par de la streptavidine couplée à de la peroxydase. Ce test, qualitatif mais de sensibilité limitée, nous a permis de révéler que l'internalisation n'était pas totalement bloquée à 4 °C. Notre démarche a alors consisté à moduler la structure des peptides en jouant sur la structure primaire (ordre des acides aminés pour introduire des domaines hydrophobes et basiques) et sur la structure secondaire (périodicité des acides aminés, chiralité des acides aminés, introduction de proline interrupteur de structure hélicoïdale).

Les propriétés structurales de ces analogues ont été analysées par RMN dans des milieux isotropes à faible constante diélectrique et avec des modèles membranaires simples (micelles de SDS). En utilisant différentes sondes paramagnétiques, nous avons montré que dans ces micelles, les peptides adoptent une orientation tangentielle à la surface de la sphère hydrophobe. Les peptides issus des hélices III de quatre homéoprotéines (*Antennapedia*, *Hox A2*, *Engrailed 2* et *Knotted*) se structurent en hélice sans forte auto-association (voir figure). Ils pénètrent peu dans la phase hydrophobe, le peptide correspondant à l'hélice III de *Knotted* restant le



Recherche de corrélations entre la structure des peptides pénétrants et leur capacité d'internalisation.

CPP : peptide pénétrant. X : biotine liée à une étiquette isotopique (forme isotopique H/D, glycine, α -diéthyl glycine) et/ou cystéine liée ou non à une molécule bioactive. Hélice III P : projection dans un axe perpendiculaire à l'axe de l'hélice qui permet de visualiser la répartition dans l'espace des chaînes latérales.

plus à la surface de la micelle. Paradoxalement, nous avons observé que les peptides qui pénètrent le moins dans la phase hydrophobe sont les mieux internalisés. Ces résultats peuvent être interprétés par la formation de phase hexagonale où le peptide resterait à l'interface durant le transport. De nombreuses études structure/internalisation sont reportées dans la littérature, mais l'utilisation dans de trop nombreux cas de protocole erroné ne permet pas d'identifier de règle(s) claire(s) d'internalisation.

Visualisation et quantification des peptides internalisés

La stratégie la plus rapide pour « estimer la quantité » de peptide internalisé et sa localisation intracellulaire est la fluorescence (FACS et microscopie confocale avec ou sans fixation des cellules). Cette méthode est à l'origine de nombreux résultats contradictoires qui nous ont conduits à développer une méthode de quantification basée sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF qui permet de distinguer sans ambiguïté la fraction de peptide adsorbée à la surface de la cellule de celle réellement internalisée. Nous pouvons ainsi doser le peptide ou le cargo internalisé. Nous avons montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la première étape d'adsorption à la surface externe de la cellule et la capacité d'internalisation du peptide [9]. Ce point est crucial, car résistant aux lavages, des quantités dix à cent fois plus importantes de peptide restent adsorbées en surface. Cependant, cette stratégie de quantification par spectrométrie de masse ne fournit aucune information sur la localisation subcellulaire, information importante si un compartiment intracellulaire et/ou une cible spécifique est visé. Seule la mesure d'une activité biologique associée au cargo internalisé permet d'apporter un élément de réponse. Dès 1996, nous avons montré que la pénétratine permettait d'internaliser dans des astrocytes en culture un inhibiteur spécifique de la protéine kinase C (PKC), conduisant à une inhibition sélective de phosphorylation d'une protéine dépendant de cette PKC [10].

Analyse des interactions peptides pénétrants/composants extracellulaires

Les oligosaccharides présents en surface de la cellule, tout particulièrement les saccharides sulfatés, jouent un rôle dans la fixation des peptides vecteurs cationiques en les concentrant par des interactions « guanidinium/sulfate » et participent à leur internalisation [11]. Les fonctions thiols des protéines de surface participent également à l'internalisation de conjugués vecteur-cargo liés par un pont disulfure [12]. Comment procède ce transfert à l'échelle moléculaire ? Cette question cruciale pour une meilleure utilisation de ces vecteurs reste entière, les très nombreuses études ayant conduit à des données souvent conflictuelles. À ce jour, il est admis que plusieurs mécanismes co-existent :

- formation d'endosomes qui dépend de l'énergie cellulaire (inhibition à 4 °C ou en présence de NaN₃) avec recrutement intracellulaire de différentes protéines (actine, cavéoline ou clathrine),
- processus de translocation directe qui sont énergie-indépendant (déstabilisation transitoire de l'organisation lamellaire des phospholipides, déformation des bicouches tubulation/vésiculation).

Le poids de ces mécanismes varie d'un peptide à l'autre, et probablement pour un même peptide est fonction du type cellulaire par la composition en phospholipides du feuillet externe de la membrane plasmique, de sa concentration locale et du cargo conjugué au vecteur.

Analyse des interactions des peptides pénétrants/bicouche lipidique

Dès 1996, nous avons postulé que l'internalisation de peptides cationiques pouvait passer par la formation transitoire de phase inverse en étudiant les effets de la pénétratine sur le polymorphisme lipidique par RMN du ³¹P [13]. L'analyse moléculaire des interactions CPP/lipides a ensuite été

réalisée par microcalorimétrie (ITC et DSC) et par résonance plasmonique de surface aux ondes guidées (PWR), un appareil unique en Europe, qui s'avère très bien adapté aux études d'interaction avec des bicouches lipidiques et qui a été installé dans l'UMR par Isabel Alves [14]. Avec des modèles de bicouche, il a été montré une spécificité de recrutement de lipides, les CPP préférant les phases désordonnées. Il a été aussi possible d'observer des déformations des bicouches lipidiques conduisant à la formation de tubules et de vésicules quand les phospholipides se trouvaient dans des phases désordonnées par microscopie à contraste de phase sur des GUV (« geant unilamellar vesicle ») [15]. Nous avons également observé que certains de ces CPP induisaient des courbures positives ou négatives de la membrane en fonction de la nature des têtes polaires des phospholipides, déformations qui peuvent être associées à la formation de pores transitoires. Il a aussi été mis en évidence une spécificité de recrutement de lipides chargés négativement porteurs de chaînes grasses courtes et d'insaturation(s) par des études de photomarquage entre ces peptides et des lipides [16]. En conclusion, suivant la nature des phospholipides recrutés par les CPP, différents types d'assemblages supramoléculaires CPP/phospholipides peuvent se former, conduisant à la formation de phase inverse, de tubules, de vésicules ou de pores.

Contrôle de l'internalisation et adressage cellulaire

Après avoir établi que des peptides cationiques peuvent pénétrer dans des cellules par plusieurs mécanismes, peut-on maintenant envisager d'en sélectionner un pour cibler un type cellulaire (par ex. cellule tumorale vs. cellule saine) ? Peut-on contrôler aussi sa localisation finale dans la cellule (par ex. mitochondries, vs. noyau vs. cytosol) ? Vingt ans après la découverte des CPP, il est acquis que le peptide vecteur universel n'existe pas. Il apparaît nécessaire d'en moduler les structures pour les adapter à l'internalisation de cargos aux propriétés physicochimiques très variées : des polymères hydrophobes (ex. peptides nucléiques acides, PNA), des polymères anioniques (ex. ARN, ADN), des polymères polaires (ex. oligosaccharides, peptides bioactifs), ou des protéines. Toutefois, les « propriétés » du cargo peuvent l'emporter sur les propriétés du peptide vecteur.

L'adressage cellulaire requiert un contrôle des propriétés d'internalisation qui a été observé soit par introduction d'un domaine acide capable de neutraliser les charges positives du domaine basique des peptides pénétrants, soit par glycosylation. Le groupe de Tsien a montré que l'introduction de séquences clivables par des métalloprotéase de la matrice (MMP) entre le domaine basique et un domaine basique « complémentaire » permettait un adressage tumoral spécifique [17]. Nous avons récemment montré que la glycosylation de certains CPP pouvait inhiber l'internalisation [18] ; la présence de glycosidase à la surface des cellules pourrait ainsi permettre un adressage spécifique. Il reste donc à introduire sur ces peptides vecteurs des éléments structuraux permettant de créer des spécificités d'adressages intra- et extracellulaires.

Perspectives

La frontière entre les peptides antibactériens et les peptides pénétrants est étroite, car certains peptides pénétrants présentent des activités antibactériennes. Les structures des peptides antibactériens ont été optimisées pour induire la lyse

plus ou moins spécifique des membranes d'un type de bactérie. Les CPP sont optimisés eux pour minimiser les effets lytiques sur les membranes de cellules de mammifères. Certains neurotransmetteurs amphiphiles basiques comme la substance P se lient fortement aux membranes tout en présentant des activités pénétrantes ou lytiques négligeables. Il existe probablement un continuum entre la fixation sur la membrane externe d'une cellule, l'apparition de propriétés pénétrantes et l'apparition de propriétés lytiques. Seule la synthèse de multiples analogues liés à des tests biologiques fiables et à des études biophysiques à l'échelle atomique et nanométrique permettront de comprendre les bases moléculaires de ces différentes propriétés biologiques.

Remerciements

Les auteurs remercient les permanents de l'UMR qui ont contribué au cours des années à ces travaux sur les CPP et qu'ils associent à cet article – I. Alves, G. Bolbach, A. Brunissen, F. Burlina, O. Convert, I. Correia, N. Goasdoué, O. Lequin, J.-M. Mallet, E. Sachon, S. Sagan –, les doctorants et post-doctorants – S. Aubry, B. Aussehat, S. Balayssac, J.-P. Berlose, D. Delaroche, L. Dutot, C.-Y. Jiao, P. Lécorché –, ainsi que A. Prochiantz et son groupe (D. Derossi, A. Joliot, E. Dupont), H. Chneiveiss, et G. Trugnan et son groupe (J. Ayala-Sanmartin, F. Illien, A. Lamazière) et dans le cadre de cette dernière collaboration, le Ministère de la Recherche pour le financement de l'ANR « Prob-DOM » (coord. : G. Trugnan).

Références

- [1] Shen W.-C., Ryser H.J.-P., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1978**, *75*, p. 1872.
- [2] Frankel A.D., Pabo C.O., *Cell*, **1988**, *55*, p. 1189.
- [3] Joliot A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H., Prochiantz A., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, p. 1864.
- [4] Vivès E., Brodin P., Lebleu B., *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, p. 16010.
- [5] Derossi D., Joliot A.H., Chassaing G., Prochiantz A., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, p. 10444.
- [6] Rothbard J.B., Kreider E., Van Deusen C.L., Wright L., Wylie B.L., Wender P.A., *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, p. 3612.
- [7] Wender P.A., Gallier W.C., Goun E.A., Jones L.R., Pillow T.H., The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2008**, *60*, p. 452.
- [8] Heitz F., Morris M.C., Divita G., *British J. of Pharmacology*, **2009**, *157*, p. 195.
- [9] Burlina F., Sagan S., Bolbach G., Chassaing G., *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **2005**, *44*, p. 4244.
- [10] Theodore L., Derossi D., Chassaing G., Chneiveiss H., Llibat B., Prochiantz A., *J. of Neurosciences*, **1995**, *15*, p. 7158.
- [11] Jiao C.-Y., Delaroche D., Burlina F., Alves I.D., Chassaing G., Sagan S., *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, p. 33957.
- [12] Joanne P., Galanth C., Goasdoué N., Nicolas P., Sagan S., Lavielle S., Chassaing G., El Amri C., Alves I.D., *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, **2009**, *1788*, p. 1772.
- [13] Aubry S., Burlina F., Dupont E., Delaroche D., Joliot A., Lavielle S., Chassaing G., Sagan S., *FASEB J.*, **2009**, *23*, p. 2956.
- [14] Berlose J.-P., Convert O., Derossi D., Brunissen A., Chassaing G., *Eur. J. Biochem.*, **1996**, *242*, p. 372.
- [15] Lamazière A., Wolf C., Lambert O., Chassaing G., Trugnan G., Ayala-Sanmartin J., *PLoS One*, **2008**, *3*(4), p. e 1938.
- [16] Jiao C.-Y. et al., **à soumettre**.
- [17] Jiang T., Olson E.S., Nguyen Q.T., Roy M., Jennings P.A., Tsien R.Y., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, p. 17867.
- [18] Dutot L., Lécorché P., Burlina F., Marquant R., Point V., Sagan S., Chassaing G., Mallet J.-M., Lavielle S., *J. Chem. Biol.*, **2010**, *3*, p. 51.



G. Chassaing

Gérard Chassaing est directeur de recherche émérite et **Solange Lavielle** (auteur correspondant) est professeur des Universités et directrice du Laboratoire des BioMolécules, Université Pierre et Marie Curie*.



S. Lavielle

* Laboratoire des BioMolécules, UMR 7203 UPMC/CNRS/ENS, Département de Chimie, École Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, F-75252 Paris Cedex 05.
Courriel : solange.lavielle@upmc.fr