

Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Afin de caractériser l'interaction entre les séquences HCV3, HCV6 et HCV7 sélectionnées et des membranes, différentes analyses ont été envisagées, toutes utilisant des liposomes de différentes compositions comme modèles. Des études de calorimétrie permettront ainsi de vérifier l'existence d'une telle interaction et d'essayer de la quantifier. De plus, la spectrofluorimétrie et la microscopie à épifluorescence permettront d'étudier le comportement des peptides au contact des membranes et éventuellement d'émettre une hypothèse quant à leur mécanisme d'action. Cette étude permettra ainsi de mieux comprendre le fonctionnement de ces peptides, assez peu étudiés dans la littérature, et de vérifier leur potentielle utilisation en tant qu'agents de pénétration cellulaire dans une stratégie de vectorisation.

Afin d'étudier l'interaction de la séquence « seule » avec la membrane, nous avons décidé de n'utiliser que les peptides de la Série 0 en calorimétrie et ceux des Séries 1' et 1'' dans les études de spectrofluorescence et microscopie à épifluorescence (Figure 92).

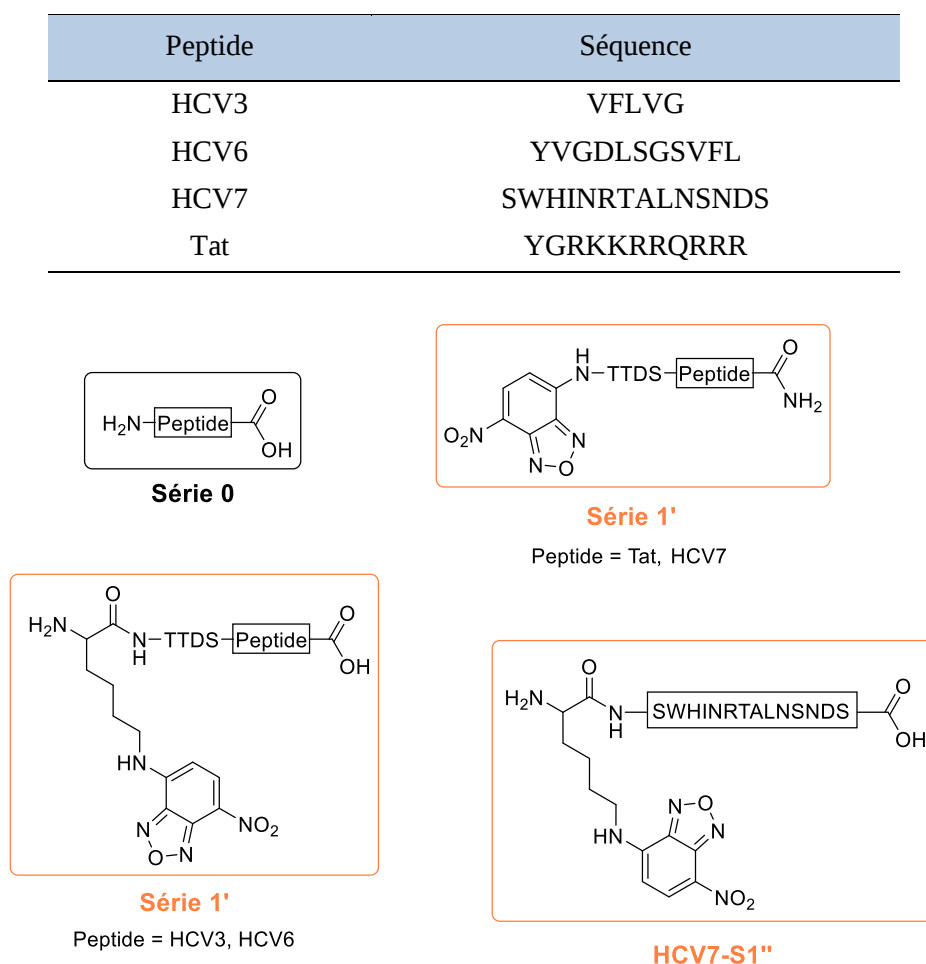


Figure 92 : Séquences et structures utilisées pour les études d'interactions peptide/membrane

1. Liposomes comme modèles de membrane cellulaire

Comme expliqué précédemment (*cf* chapitre II), la membrane biologique est un système complexe, composé de divers éléments tels que des lipides, des protéines et des oligosaccharides. Outre sa composition, la complexité de la membrane biologique provient aussi de sa structure et des

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

phénomènes dynamiques qu'elle subit. En 1972, Singer et Nicholson ont ainsi proposé le modèle de « mosaïque fluide » pour décrire la structure membranaire.²⁰⁶ Ce modèle est basé sur l'hypothèse selon laquelle les lipides et les protéines composant la membrane cellulaire, diffusent librement dans celle-ci. La diversité de la structure membranaire et le comportement dynamique de ses constituants rend l'étude biophysique de ses interactions avec différents composés, agents thérapeutiques ou vecteurs, difficile à appréhender. De fait, plusieurs membranes artificielles, ont été développées comme modèles de membranes cellulaires, particulièrement les modèles utilisant des lipides. En effet, les lipides sont des molécules amphiphiles capables, en milieu aqueux, de s'auto-assembler grâce à des liaisons hydrophobes, de manière à mettre en interaction leur chaînes grasses. Les structures ainsi formées, appelées bicouches lipidiques, peuvent être assimilées à un modèle simplifié de la membrane cellulaire. Quoique leur composition soit moins diverse (principalement des glycérophospholipides), les propriétés dynamiques y sont conservées. Les bicouches lipidiques ont ainsi été utilisées afin de modéliser l'interaction de certains composés thérapeutiques ou vecteurs avec une membrane en termes d'activité, de toxicité ou encore de mécanisme de pénétration cellulaire.²⁰⁷

On distingue trois principaux types de modèles de membranes cellulaires : les bicouches lipidiques supportées, les monocouches lipidiques et les liposomes (Figure 93).

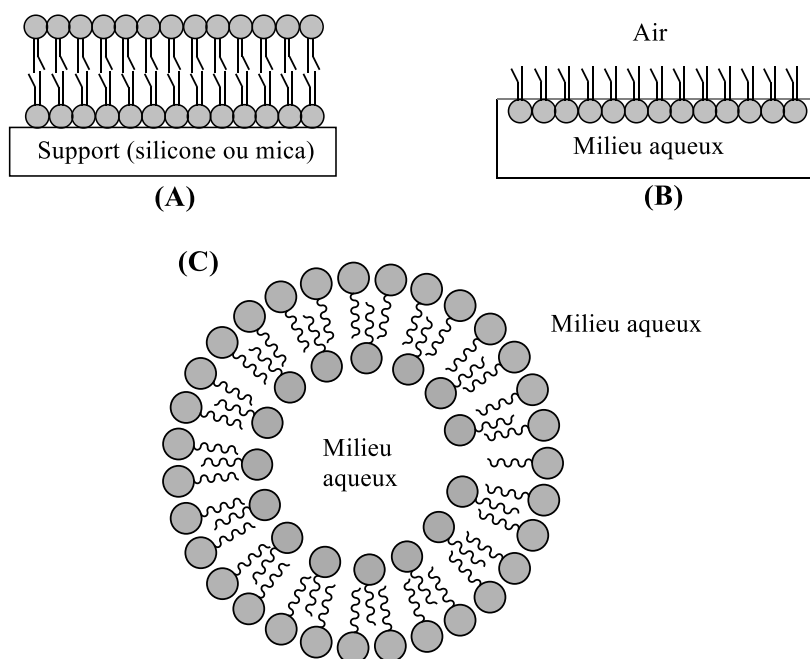


Figure 93 : Différents modèles lipidiques de membrane cellulaire
(A) Bicouche lipidique supportée ; (B) monocouche lipidique ; (C) liposomes.

Les liposomes sont des vésicules composées d'une bicouche lipidique séparant deux milieux aqueux et constituent un très bon modèle de membrane biologique. En effet, outre la composition lipidique et les propriétés dynamiques de la membrane, la courbure de cette dernière peut être importante pour divers phénomènes comme l'interaction avec les lipides ou l'internalisation.

Diverses propriétés caractérisent la bicouche lipidique des liposomes. En effet, selon sa composition, la membrane peut présenter des interactions fortes entre les chaînes grasses, donnant un caractère ordonné et rigide à l'empilement de lipides (état solide ordonné S_o ou L_β , « phase gel »). A l'inverse,

²⁰⁶ Singer, S. J.; Nicolson, G. L. *Science* **1972**, 175, 720–731.

²⁰⁷ Peetla, C.; Stine, A.; Labhasetwar, V. *Mol. Pharm.* **2009**, 6 (5), 1264–1276.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

certaines composés comme le cholestérol, déstabilisent les interactions entre les chaînes grasses et permettent ainsi plus de mouvements dans la membrane (état liquide désordonné L_d/L_α ou ordonné L_o , « phase fluide »). Une même membrane peut également exister sous plusieurs phases selon la température. Ainsi, à basse température la membrane existe à l'état gel S_o , où l'empilement des lipides est très ordonné et ces derniers présentent très peu de mouvements. Avec l'augmentation de la température, les interactions entre les lipides composant la bicouche s'affaiblissent et la membrane adopte un état fluide L_d , beaucoup plus sujet aux mouvements des lipides. Le passage d'une phase à l'autre s'effectue à une température particulière, dépendante des différents constituants de la membrane (phospholipides, Chol, SM), appelée température de transition de phase T_m . A une température proche de la T_m , les lipides adoptent, au sein d'une même membrane, des comportements différents avec des domaines en phase gel et des domaines en phase fluide (Figure 94).^{141,208} La séparation de ces deux domaines constitue un défaut de phase, particulièrement important pour la pénétration de certains composés ou la fusion membranaire.

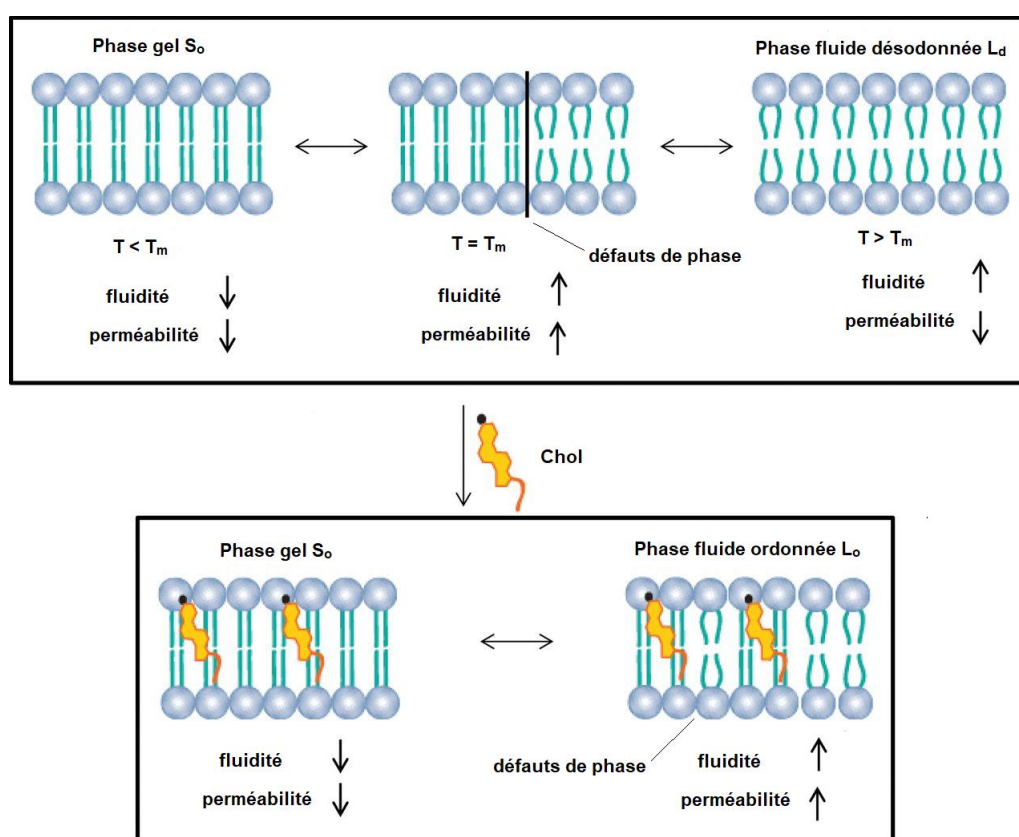


Figure 94 : Différentes phase et transitions d'une bicouche lipidique²⁰⁸

Certains phospholipides permettent à la membrane d'exister sous une autre phase, appelée phase « ondulée » ou *ripple-phase*, P_β . Dans cet état, la courbure de la membrane est alternée, lui conférant un caractère ondulé. Comme pour une température proche de la T_m , la bicouche lipidique présente alors à la fois des domaines où les lipides adoptent un comportement gel et des domaines fluides, la frontière entre ces domaines formant des défauts de phase. Le passage de la phase gel à la *ripple-phase* est défini par la température de pré-transition de phase, T_{pre} .

Comme expliqué précédemment, ces différentes phases et les transitions de l'une à l'autre dépendent des interactions entre les lipides constitutifs de la membrane, plus précisément entre leurs chaînes

²⁰⁸ Monteiro, N.; Martins, A.; Reis, R. L.; Neves, N. M. J. R. Soc. Interface **2014**, 11, 20140459.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

grasses qui définissent l'empilement lipidique. Chaque lipide, selon la nature de ses chaînes grasses (insaturations et nombre de carbones) et de ses têtes hydrophiles, est impliqué dans des interactions plus ou moins fortes et donc une température de transition T_m plus ou moins importante.

Outre les propriétés physiques de leur membrane, les liposomes diffèrent également selon leur lamellarité (nombre de bicouches lipidiques) et leur taille, paramètres qui dépendent généralement de leur méthode de préparation.²⁰⁹ On distingue ainsi les vésicules unilamellaires (ULVs pour *unilamellar vesicles*) constituées d'une unique bicouche lipidique, les vésicules multilamellaires (MLVs pour *multilamellar vesicles*) présentant plusieurs bicouches lipidiques concentriques, et les vésicules multivésiculaires (MVVs pour *multivesicular vesicles*) où plusieurs vésicules sont imbriquées les unes dans les autres (Figure 95). Au sein des ULVs, on distingue également plusieurs types de vésicule selon leur taille : les vésicules unilamellaires géantes (GUVs pour *giant unilamellar vesicles*) mesurant plus de 1 μm de diamètre, les vésicules unilamellaires larges (LUVs pour *large unilamellar vesicles*) avec un diamètre entre 100 et 200 nm, et les petites vésicules unilamellaires (SUVs pour *small unilamellar vesicles*) de taille inférieure à 50 nm.

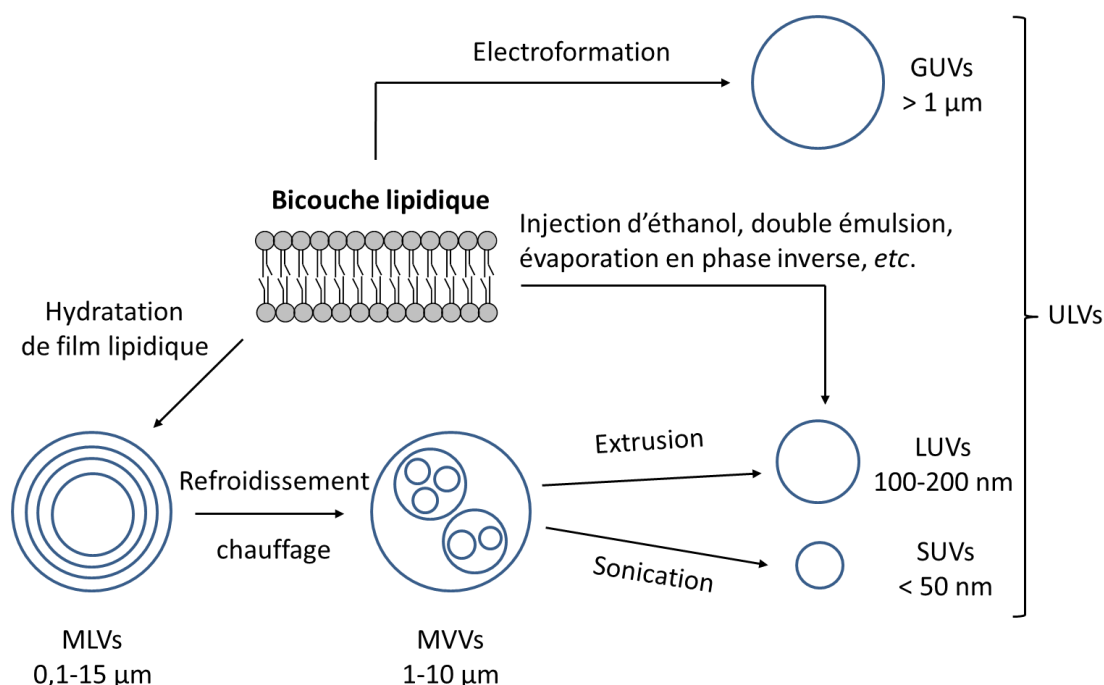


Figure 95 : Différents types de liposomes et leur méthode de préparation

Ces différents types de liposomes sont préparés par diverses méthodes. Les GUVs sont ainsi préparées par hydratation puis électroformation à partir d'un film lipidique. D'autres techniques, notamment l'injection d'éthanol ou l'évaporation des lipides en phase inverse permettent d'obtenir des LUVs à partir de lipides en solution. Néanmoins, la méthode généralement employée pour l'obtention de liposomes consiste à préparer une solution de MLVs par hydratation d'un film lipidique à une température supérieure à la T_m , éventuellement suivie d'une autre transformation. L'extrusion de ces solutions hétérogènes à travers des membranes de 100 ou 200 nm permet ainsi d'obtenir des LUVs alors que l'utilisation de la sonication permet d'accéder à des vésicules plus petites, les SUVs.²⁰⁹

²⁰⁹ Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, 1 (2), 147–168.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Pour des raisons de stabilité des vésicules, nous avons décidé d'utiliser des MLVs et des LUVs comme modèles de membrane. Les interactions entre les peptides des séries 0 et 1' et des liposomes ont ainsi été étudiées par différentes méthodes : des analyses en calorimétrie afin de les mettre en évidence, de les caractériser et de les quantifier, ainsi que des analyses par spectrofluorescence pour déterminer le comportement de ces séquences au contact de la membrane (internalisation et fusion).

Dans cette étude, les lipides utilisés étaient ainsi principalement des dioléoylphosphatidylcholine (DOPC) et dioléoylphosphatidylglycérol (DOPG), correspondant à une basse température de transition pour étudier le comportement de la membrane en phase fluide, ou des dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) et dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG) dont la transition s'effectue autour de la température ambiante, pour étudier le comportement des membranes à la T_m (Figure 96).

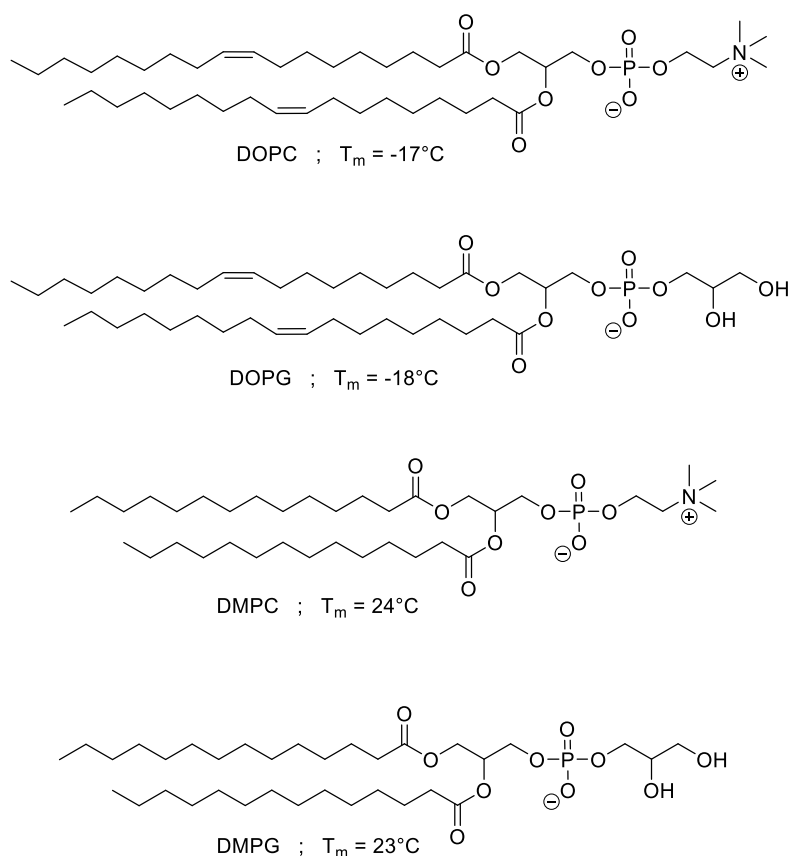


Figure 96 : Structure des différents lipides utilisés dans l'étude de l'interaction peptide/membrane

Enfin, pour permettre une visualisation du comportement des peptides, les séquences conjuguées au fluorophore NBD (S1') ont été étudiées par microscopie à épifluorescence avec des MLVs et des cellules épithéliales.

2. Analyse par calorimétrie

2.1. Principe de la calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC pour *differential scanning calorimetry*) est une technique de calorimétrie permettant de mesurer les paramètres thermodynamiques (température et enthalpie) de certaines transformations. Cette technique est généralement utilisée pour caractériser les changements d'état de certains matériaux (fusion, cristallisation, transition vitreuse). Pour cela, le calorimètre mesure les différences des échanges de chaleur (flux thermique) lors d'un balayage en

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

température, entre une cellule d'analyse contenant le composé d'intérêt et une cellule de référence (Figure 97).

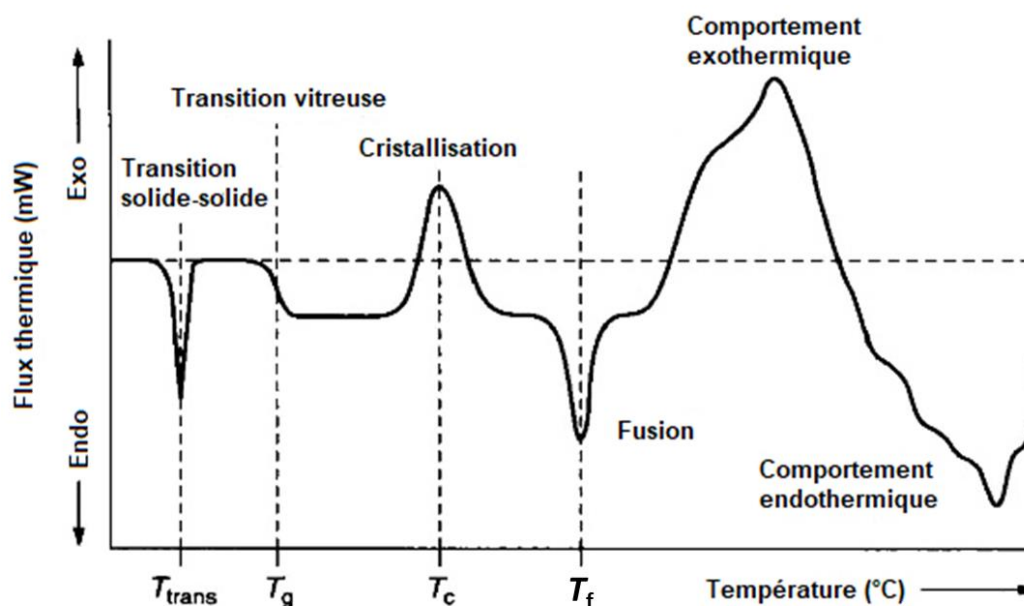


Figure 97 : Thermogramme présentant les différentes transitions observable par DSC lors d'un cycle de chauffage

Comme expliqué précédemment, les phospholipides s'auto-assemblent en milieu aqueux pour former des vésicules constituées d'une bicouche lipidique. Cette membrane peut exister sous deux formes : une phase « gel », très ordonnée, où les lipides interagissent fortement entre eux et subissent très peu de mouvement et une phase « fluide » à plus haute température. La transition entre la phase gel et la phase fluide est une transformation endothermique et s'effectue à une température appelée la température de transition T_m . Comme tout changement d'état, cette transition peut être visualisée par DSC lors d'un balayage en température. Lors de l'ajout de peptide à la solution de liposomes, l'interaction peptide/lipide va potentiellement modifier les propriétés de la membrane et donc la température de transition.

Cette technique a ainsi été utilisée pour mettre en évidence des interactions peptide/lipide dans plusieurs études.^{162,210,211} Dans le cas des peptides de fusion du VHC, nous avons choisi de travailler avec des lipides DMPC et DMPG. En effet, même si les chaînes grasses dimyristoyles (DM) sont peu représentées dans la membrane cellulaire comparées aux chaînes dioléoyles (DO) ou palmitoyloléoyles (PO), les lipides DMPC et DMPG ont une température de transition proche de la température ambiante (24 et 23°C respectivement). L'analyse s'effectuant en solution aqueuse, l'utilisation de chaînes DO ou PO est délicate puisque l'eau subit un changement d'état (cristallisation) à leur température de transition (autour de -18 et -2°C respectivement) gênant la visualisation de la température T_m . Enfin, si les lipides PC sont les constituants majeurs de la membrane cellulaire eucaryote, les lipides anioniques comme PS et plus particulièrement PG sont peu présents. Leur utilisation permet néanmoins de modéliser la présence d'éléments anioniques sur la membrane.

²¹⁰ Davies, S. M.; Epand, R. F.; Bradshaw, J. P.; Epand, R. M. *Biochemistry* **1998**, 37 (16), 5720–5729.

²¹¹ Joanne, P.; Galanth, C.; Goasdoué, N.; Nicolas, P.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Chassaing, G.; El Amri, C.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, 1788 (9), 1772–1781.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

2.2. Résultats des analyses DSC

Afin de caractériser uniquement l'interaction peptide/lipide, seules les séquences de la Série 0 ont été testées. Pour cela, différentes solutions de MLVs (DMPC ou DMPG) ont été soumises à des cycles de refroidissement et de chauffage entre 40 et 5°C. Ces analyses ont été effectuées en utilisant la même concentration en lipides mais des concentrations en peptides différentes de manière à étudier des ratios peptides/lipides (P/L) de plus en plus importants.

Le peptide Tat-S0, utilisé comme référence dans cette étude, est connu pour ses interactions fortes avec les lipides anioniques.^{170,212,213,214} Les différents thermogrammes obtenus avec des MLVs de DMPG lors des phases de refroidissement (Figure 98) montrent une diminution de la température de transition dès le ratio P/L de 1/25. Cette diminution montre non seulement l'existence d'une interaction peptide/lipide mais également que le peptide Tat a tendance à « fluidifier » la membrane puisqu'il est nécessaire de lui fournir moins d'énergie pour passer d'un état gel à un état fluide.

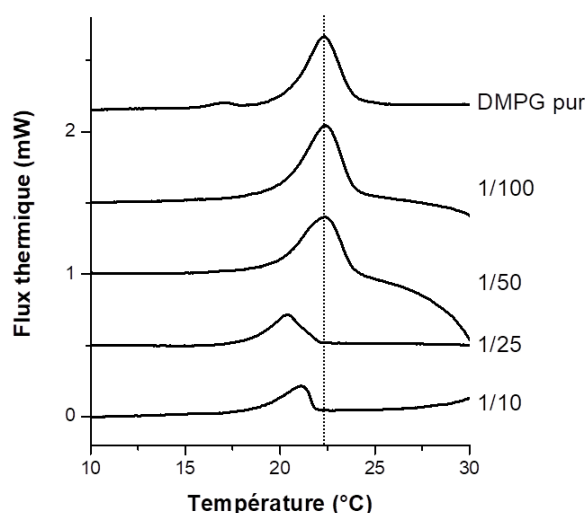


Figure 98 : Thermogrammes d'analyse de l'interaction Tat-S0/DMPG par DSC en phase de refroidissement

Par comparaison, le peptide HCV3-S0 s'est montré moins actif sur les lipides anioniques DMPG. En effet, il a été nécessaire d'atteindre un ratio P/L de 1/5 pour observer une modification de la T_m (Figure 99) avec une augmentation à 24,5°C. Comme précédemment, cette augmentation rend compte d'une modification des propriétés de la membrane sous la forme d'une « rigidification » puisqu'il est nécessaire de fournir plus d'énergie pour passer d'un état gel à un état fluide. On observe également une forte diminution du signal pour les ratios P/L 1/5 et 1/1. Si un précipité est apparu pour le ratio 1/1 et explique cette diminution, ce n'est pas le cas du ratio 1/5. Cette observation rend compte de la capacité du peptide à perturber les interactions entre les chaînes grasses des phospholipides et à modifier leur empilement. Compte tenu de la nature de HCV3-S0, comportant une séquence peptidique très hydrophobe et un motif TTDS très hydrophile, l'hypothèse d'un comportement type détergent pourrait expliquer ce phénomène puisque la quantité de lipides subissant la transition de phase, diminue lors de la décomposition de la membrane.

²¹² Seelig, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1331, 103–116.

²¹³ Ziegler, A.; Blatter, X. L.; Seelig, A.; Seelig, J. *Biochemistry* **2003**, 42, 9185–9194.

²¹⁴ Piantavigna, S.; McCubbin, G. A.; Boehnke, S.; Graham, B.; Spiccia, L.; Martin, L. L. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, 1808 (7), 1811–1817.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

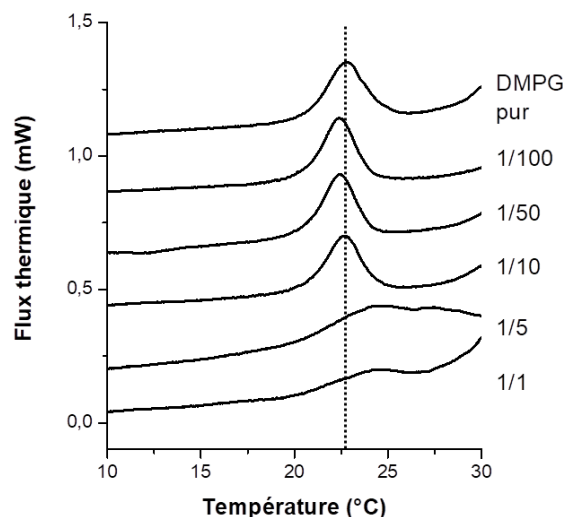


Figure 99 : Thermogrammes d'analyse de l'interaction HCV3-S0/DMPG par DSC en phase de refroidissement

Le peptide HCV6-S0 a été difficile à étudier puisque sa faible solubilité a nécessité l'utilisation de solutions contenant 5 % de DMSO pour atteindre les concentrations permettant les analyses à hauts ratios P/L. Dans ces conditions, le peptide a montré une activité inattendue sur les lipides anioniques DMPG (Figure 100A) en raison de la présence d'un résidu acide aspartique lui conférant une charge négative à pH 7,4, pH de l'analyse. Une augmentation de la T_m a tout de même été observée dès le ratio 1/50 (24,6°C) avec également l'apparition d'un autre changement d'état à 26,7°C. Ces modifications de la membrane pouvant également provenir de la présence de DMSO dans la solution, le ratio 1/50 a également été testé sans DMSO (Figure 100B).

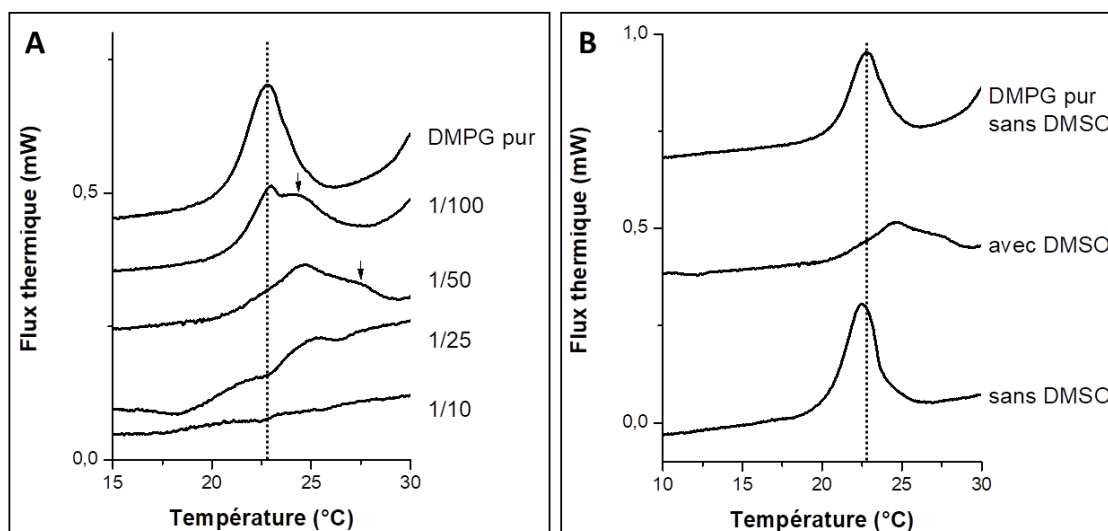


Figure 100 : Thermogrammes d'analyse de l'interaction HCV6-S0/DMPG par DSC avec 5 % DMSO (A) et du ratio 1/50 sans DMSO (B) en phase de refroidissement
Les flèches correspondent à l'apparition du deuxième changement d'état

Le thermogramme ainsi obtenu montre une seule transition beaucoup plus nette, avec une température très proche de celle des MLVs seules. Ce résultat montre donc que la modification de la membrane observée précédemment, provient du DMSO ou d'une action conjointe avec le peptide. Dans les conditions testées, il n'est donc pas possible de caractériser l'interaction HCV6-S0/DMPG puisque le peptide ne présente pas une solubilité suffisante pour atteindre un ratio 1/25 sans DMSO.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Le peptide HCV7-S0, quant à lui, s'est révélé capable d'interagir avec les lipides anioniques DMPG. En effet, les thermogrammes (Figure 101A) montrent une diminution de la température de transition jusqu'à 20°C pour un ratio P/L de 1/25 et 18,2°C pour 1/10. HCV7-S0 est donc capable d'interagir avec les lipides anioniques DMPG, certainement du fait de la présence d'un résidu arginine, cationique à pH 7,4. Comme pour Tat-S0, la diminution de la T_m rend compte d'une certaine fluidification de la membrane. Cette diminution étant plus marquée que pour Tat-S0, on peut raisonnablement penser que l'influence de HCV7-S0 sur les interactions lipide/lipide responsables de la fluidité de la membrane, est plus prononcée. De plus, on observe également la présence d'une seconde température de transition correspondant à la T_m des liposomes de DMPG seuls. Ce résultat laisse supposer que le peptide n'interagirait pas uniformément sur la membrane mais s'agrègerait de manière à former des domaines particuliers dans la bicouche lipidique, à la manière des « radeaux lipidiques ».

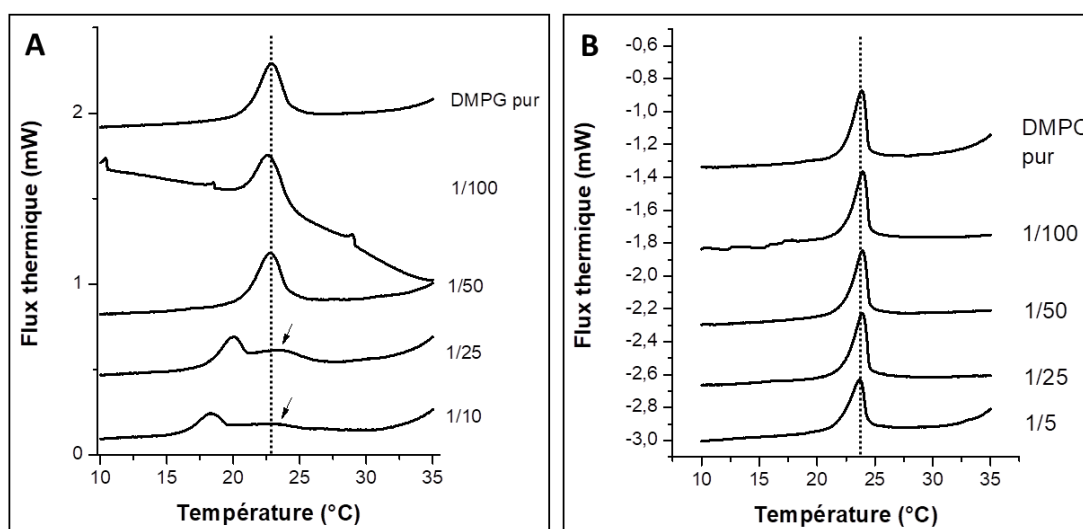


Figure 101 : Thermogrammes d'analyse DSC de l'interaction HCV7-S0/DMPG (A) et HCV7-S0/DMPC (B) en phase de refroidissement

Les flèches correspondent à l'apparition du deuxième changement d'état correspondant à la T_m des vésicules de DMPG seules

Des analyses ont également été effectuées avec les lipides zwitterioniques DMPC. Néanmoins, face aux problèmes de solubilité rencontrés avec les peptides HCV3-S0 et HCV6-S0, ces analyses n'ont été effectuées qu'avec la séquence HCV7-S0. Étonnamment, les thermogrammes montrent que le peptide n'a aucune influence sur les propriétés de la membrane, même à un ratio 1/5 et malgré le caractère très hydrophobe de cette séquence (Figure 101B). Il est tout de même important de souligner que ce résultat n'infirme pas l'existence d'une interaction HCV7-S0/DMPC, mais indique simplement que si cette interaction existe, elle ne modifie pas les propriétés de la membrane de manière significative.

Le peptide HCV7-S0 semble donc interagir préférentiellement sur les lipides anioniques DMPG, probablement à cause du résidu arginine présent dans la séquence. Afin de se rapprocher d'une composition lipidique moins riche en lipides anioniques, plus biologiquement pertinente, l'interaction de HCV7-S0 a été caractérisée avec des liposomes de composition DMPC/DMPG 9/1. Cette analyse a mené à la même conclusion, à savoir que le peptide n'a pas d'influence visible sur le comportement de ce type de membrane. Ce résultat montre que le ratio 9/1 entre lipides zwitterioniques et anioniques est insuffisant pour observer une modification de la membrane et donc que le peptide n'est, *a priori*, pas capable de ségréguer et/ou de recruter le DMPG du DMPC.

Ces analyses DSC montrent ainsi que les potentiels peptides de fusion sélectionnés HCV3 et HCV7 sont capables d'interagir avec des lipides et de modifier les propriétés de la membrane qu'ils

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

composent. Cette influence semble être plus importante avec HCV7-S0 et particulièrement sur les lipides anioniques DMPG. Ces analyses restant relativement qualitatives, il a été décidé d'utiliser une autre technique de calorimétrie, la titration calorimétrique isotherme, afin de quantifier les interactions peptide/membrane.

2.3. Principe de la titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme (ITC pour *isothermal titration calorimetry*) est une autre technique de calorimétrie largement employée dans des études d'interactions peptides/membrane. L'ITC consiste à titrer une solution d'un composé participant à une interaction, contenue dans une cellule d'analyse (généralement un récepteur ou une autre protéine), par une solution de l'autre composé impliqué dans cette interaction, contenue dans une seringue (le ligand, généralement une petite molécule ou peptide). L'addition répétée d'un volume connu de solution de ligand dans la solution de récepteur va entraîner une interaction et un dégagement (interaction exothermique) ou une consommation (interaction endothermique) d'énergie et donc de chaleur, faisant varier la température dans la cellule d'analyse. L'appareil fournit alors de l'énergie à la cellule d'analyse ou à la cellule de référence de manière à rétablir l'équilibre thermique (Figure 102A). Cette énergie va permettre de tracer la courbe d'évolution de l'énergie molaire de cette interaction en fonction du ratio molaire entre les composés en présence (Figure 102B). Cette courbe est généralement une sigmoïde où l'énergie diminue au fur et à mesure des injections jusqu'à atteindre un plateau correspondant à un phénomène de saturation (il n'existe alors plus de sites d'interaction disponibles sur le récepteur). Une modélisation utilisant un modèle d'interaction à un site permet ensuite de calculer les paramètres thermodynamiques de l'interaction : l'enthalpie de réaction (ΔH , ordonnée du premier plateau), la stoechiométrie (N, abscisse du point d'inflexion) et la constante d'interaction (K, pente de la tangente au point d'inflexion).

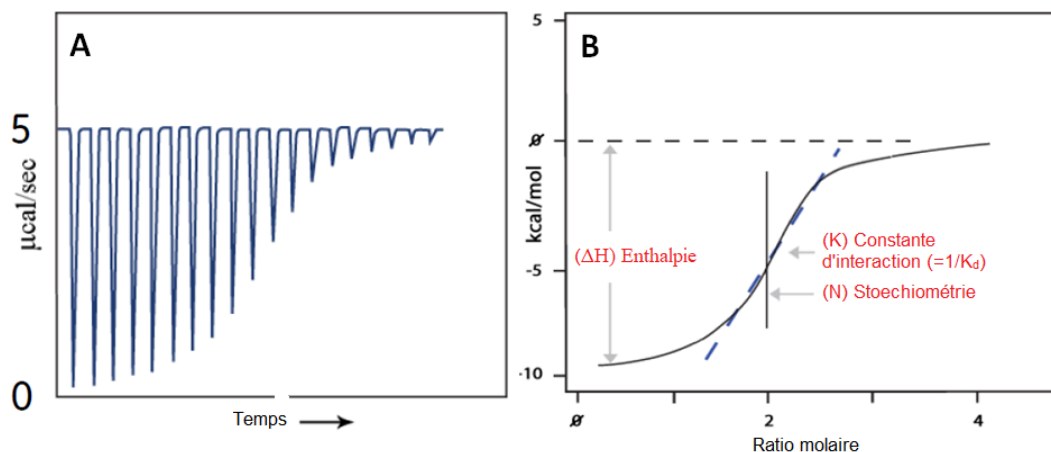


Figure 102 : Courbes d'analyses d'une expérience ITC

L'utilisation des liposomes en ITC peut paraître contre-intuitive. En effet, même si les liposomes peuvent être assimilés à des « récepteurs » dans une expérience d'ITC classique, leur concentration ne peut pas être connue, rendant impossible la détermination des paramètres thermodynamiques de l'interaction. Ce sont en fait les lipides qui sont considérés pour l'analyse d'interaction et puisque plusieurs lipides peuvent interagir avec une séquence peptidique, ces derniers sont assimilés à des ligands. Il existe ainsi deux types d'expériences ITC appliquées à l'interaction peptide/lipide, toutes deux donnant des informations différentes sur les caractéristiques thermodynamiques.²¹² La première expérience consiste à injecter une solution de peptide dans la cellule d'analyse contenant une solution

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

de liposomes. La concentration en lipides étant bien plus importante que celle du peptide, la saturation, c'est-à-dire l'absence d'interaction du fait d'un défaut en espèce réactive libre, n'est jamais atteinte. Cette expérience, appelée « expérience inverse » ou P-to-L (pour *peptide-to-lipid*) présente ainsi une énergie échangée identique quelle que soit l'injection. La courbe obtenue est alors une droite dont l'ordonnée permet de déterminer l'enthalpie de réaction. La deuxième expérience, dite L-to-P (pour *lipid-to-peptide*), correspond à l'expérience classique, avec saturation des sites d'interaction sur la séquence peptidique. La courbe alors obtenue est bien une sigmoïde permettant de retrouver les paramètres thermodynamiques ΔH , N , et K . La plupart des études portant sur l'analyse d'interactions peptide/lipide par ITC correspondent à des expériences de types L-to-P.

Ziegler et Seelig ont ainsi mis en évidence de nombreuses interactions peptide/lipide par ITC notamment entre l'octréotide, un analogue de la somatostatine, et des SUVs de POPG/POPC 75/25,²¹⁵ entre la cyclosporine A et des LUVs de POPC,²¹⁶ ou encore entre le peptide Tat et des SUVs ou LUVs de compositions croissantes en lipides anioniques POPG.²¹³ Il a ainsi été montré que l'interaction entre le Tat et une bicouche lipidique est d'autant plus forte que la teneur en lipide anionique est élevée. D'autres études ont également montré par ITC que des CPPs, comme RW₉, sont capables de se lier fortement aux GAGs par des interactions électrostatiques.¹⁶⁶ Turner *et al.* ont également utilisé l'ITC pour caractériser l'interaction d'un peptide inhibiteur de fusion, le Cbz-D-Phe-L-Phe-Gly, et des LUVs de DOPC.²¹⁷ Reshetnyak *et al.* ont caractérisé l'interaction du peptide pH-sensible pHLIP avec des LUVs de POPC à différents pH.²¹⁸ Leurs résultats tendent à montrer l'influence du pH sur l'activité de ce peptide puisque son affinité pour la bicouche lipidique s'est révélée 10 à 20 fois supérieure à pH 5 qu'à pH 8. Plus récemment, Walrant *et al.* ont étudié l'interaction de peptides polycationiques (R₉, RW₉ et RL₉) avec des LUVs de distéaroylphosphatidylcholine (DSPC) et distéaroylphosphatidylglycerol (DSPG). Leurs conclusions corroborent les observations réalisées précédemment, à savoir que l'interaction électrostatique de ces peptides polycationiques est primordiale pour l'activité membranaire.¹⁶²

2.4. Résultats des analyses ITC

Dans l'optique de caractériser et de quantifier les interactions de nos peptides avec des membranes lipidiques, nous avons effectué des expériences ITC dans les conditions décrites par Seelig en 1997.²¹² Les peptides ont ainsi été engagés dans des expériences L-to-P dans un tampon Tris à pH 7,4 et à 25°C. Afin d'étudier l'importance des interactions électrostatiques pour nos séquences, les analyses ont initialement été effectuées avec des LUVs ou des MLVs de DOPC, DOPG ou un mélange de ces deux lipides.

Comme décrit par Seelig,²¹³ de part sa nature extrêmement cationique, le peptide Tat-S0 a montré une interaction particulièrement dépendante du ratio de lipides anioniques utilisé. Ainsi, aucune interaction n'a pu être observée sur des LUVs de DOPC, DOPC/DOPG 75/25 alors qu'une interaction exothermique a été caractérisée lors des expériences avec des LUVs de DOPG pur. La courbe ainsi obtenue est bien une sigmoïde (Figure 103) permettant de déterminer les paramètres thermodynamiques suivants :

²¹⁵ Beschiaschvili, G.; Seelig, J. *Biochemistry* **1992**, 31 (41), 10044–10053.

²¹⁶ Schote, U.; Ganz, P.; Fahr, A.; Seelig, J. *J. Pharm. Sci.* **2002**, 91 (3), 856–867.

²¹⁷ Turner, D. C.; Straume, M.; Kasimova, M. R.; Gaber, B. P. *Biochemistry* **1995**, 34 (29), 9517–9525.

²¹⁸ Reshetnyak, Y. K.; Andreev, O. A.; Segala, M.; Markin, V. S.; Engelman, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105 (40), 15340–15345.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

$$\begin{aligned}N &= 8,35 \\K &= 4,76 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \\ \Delta H &= -714,7 \text{ cal/mol} \\ \Delta S &= 28,2 \text{ cal/mol/}^\circ\text{C}\end{aligned}$$

Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature ($N = 8,0$; $K = 10^4 \text{ M}^{-1}$; $\Delta H = -1\,200 \text{ cal/mol}$) ce qui valide notre méthode d'utilisation de cette technique.²¹³ Les valeurs de stœchiométrie et de constante d'interaction sont néanmoins légèrement supérieures à ce qui a déjà été décrit pour le peptide Tat-S0. Cela est certainement dû à l'utilisation de LUVs composées uniquement de lipides anioniques, facilitant l'approche du peptide par interactions électrostatiques, comparée à des vésicules composées d'un mélange lipides zwitterioniques/anioniques.

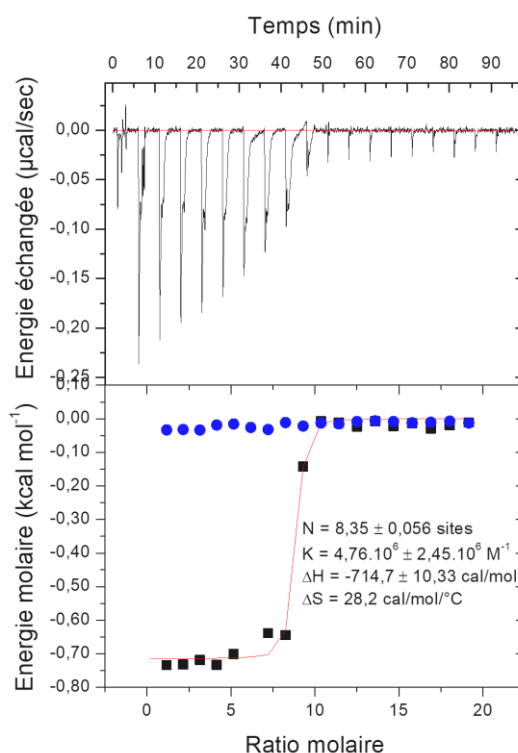


Figure 103 : Courbe de titrage ITC pour l'analyse de l'interaction Tat-S0/DOPG
En bleu : analyse du blanc (lipides dans tampon) ; en noir analyse de l'interaction après soustraction du blanc.

Des expériences ITC avec les séquences Tat-S1' et Tat-S3 ont permis de mettre en évidence une éventuelle importance du cargo introduit en position *N*-terminale. Les résultats ainsi obtenus (Tableau 12) montrent clairement une influence relativement importante de la présence du nucléoside SRO91 (Série S3). En effet, dans ce cas, la constante et l'enthalpie d'interaction avec des LUVs de DOPG ont diminué d'un facteur 40 et 2,5 respectivement. En revanche, la stœchiométrie a augmenté, laissant penser que le nucléoside pourrait interagir avec les lipides de la membrane, probablement du fait de liaisons hydrogène avec les groupements phosphate des lipides. La présence du nucléoside pourrait également avoir une influence sur la structure secondaire du peptide. L'interaction peptide/membrane se trouverait donc changée ce qui expliquerait les modifications des paramètres thermodynamiques obtenus en ITC.

L'ajout du fluorophore NBD (Série S1') n'a eu que très peu d'influence sur la stœchiométrie et la constante d'interaction, et a entraîné une faible diminution de l'enthalpie. Ces résultats laissent penser

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

que la présence du fluorophore NBD en position *N*-terminale ne gêne pas les interactions électrostatiques du peptide avec une membrane, en tout cas pas pour la séquence Tat.

Peptide	Fonctionnalisation en <i>N</i> -ter	N	K (M ⁻¹)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol/°C)
Tat-S0	H-	8,35 ± 0,056	4,76.10 ⁶ ± 2,45.10 ⁶	-714,7 ± 10,33	28,2
Tat-S1'	NBD-TTDS-	8,45 ± 0,058	1,1.10 ⁶ ± 4,44.10 ⁵	-486,7 ± 6,299	26,0
Tat-S3	SRO91-TTDS-	10,6 ± 0,4	1,23.10 ⁵ ± 7,48.10 ⁴	-287,4 ± 16,49	22,3

Tableau 12 : Tableau des résultats d'analyses ITC des peptides Tat avec des LUVs DOPG

Dans le cas des analyses réalisées avec le peptide HCV3-S0, il n'a pas été possible d'obtenir une sigmoïde avec cette séquence, et ce en testant plusieurs concentrations de peptide (entre 50 et 500 μ M) avec des LUVs de DOPG (5 mM) ou de DOPC (5 mM). Quelles que soient les conditions utilisées, l'énergie échangée lors de l'expérience était très faible (Figure 104A), de l'ordre de l'énergie de dilution dégagée lors de l'expérience contrôle (lipides dans tampon). Les analyses DSC présentées précédemment montrent pourtant que le peptide HCV3-S0 a une action sur la membrane, potentiellement de type détergent. Le ratio P/L relativement élevé nécessaire à la visualisation de cet effet en DSC et l'impossibilité d'obtenir une sigmoïde en analyse ITC pourrait signifier l'existence d'une interaction très faible entre le peptide et les lipides.

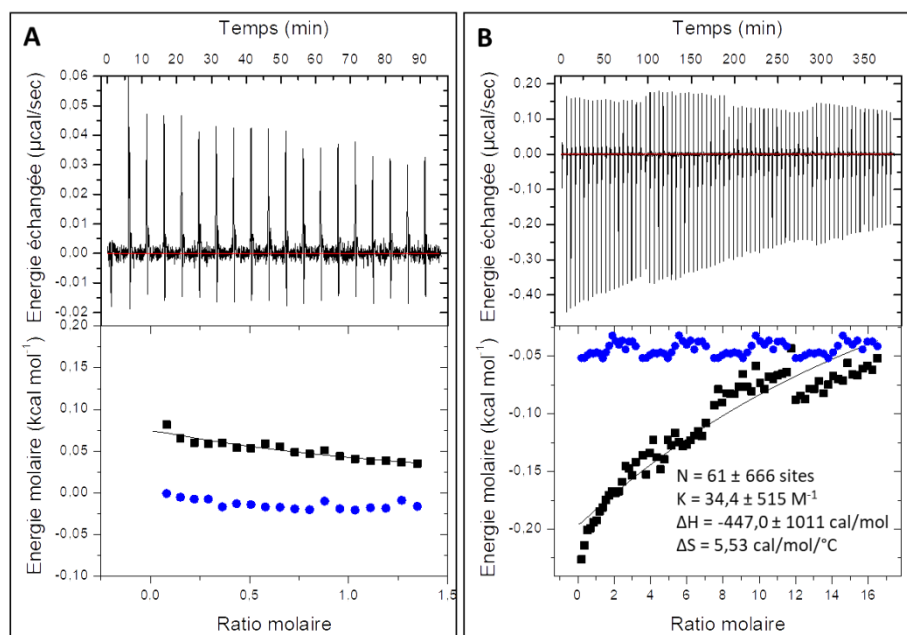


Figure 104 : Analyse par ITC des interactions HCV3-S0/DOPG (A) et HCV6-S0/DOPG (B)
Les carrés représentent l'analyse L-to-P et les ronds l'expérience contrôle (lipides dans tampon)

Les analyses ITC avec HCV6-S0 ont mené à la même conclusion. En effet, aucune des expériences menées avec des LUVs de DOPG ou DOPC à différentes concentrations en peptide (entre 100 et 500 μ M) n'ont permis d'obtenir une sigmoïde ou un signal exploitable. Dans l'éventualité de la présence d'une faible interaction, plusieurs seringues de DOPG ont même été ajoutées à la solution de peptide. Bien qu'une sigmoïde n'ait pas été obtenue, il est possible d'observer la diminution de l'énergie échangée lors de l'analyse, tendant vers un phénomène de saturation (Figure 104B). Néanmoins, la détermination des paramètres thermodynamiques par le modèle à un site d'interaction a donné des

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

valeurs totalement aberrantes. De plus, cette séquence étant très peu soluble, les solutions utilisées contenaient 5 % de DMSO pour permettre d'atteindre des concentrations d'analyse pertinentes. Il est donc possible que les résultats obtenus proviennent d'une action du DMSO sur la membrane ou d'un « buffer-mismatch » (analyse biaisée par l'énergie de dilution de tampon du fait de concentrations différentes dans la seringue et la cellule).

Dans le cas du peptide HCV7-S0, des analyses préliminaires ont d'abord été menées avec des MLVs de DOPC. Si les concentrations utilisées (57 μM en peptide et 5 mM en lipide) n'ont pas permis d'obtenir une sigmoïde, il a été possible de déterminer des paramètres thermodynamiques grâce au modèle d'interaction à un site (Figure 105). Ces résultats correspondent à une stœchiométrie de 3 et une constante d'interaction de l'ordre de 10^3 M^{-1} , ce qui est relativement moyen comparativement à l'interaction Tat-S0/DOPG. En revanche, l'enthalpie de réaction s'est révélée bien plus importante avec -4700 cal/mol contre -700 cal/mol pour l'interaction Tat-S0/DOPG.

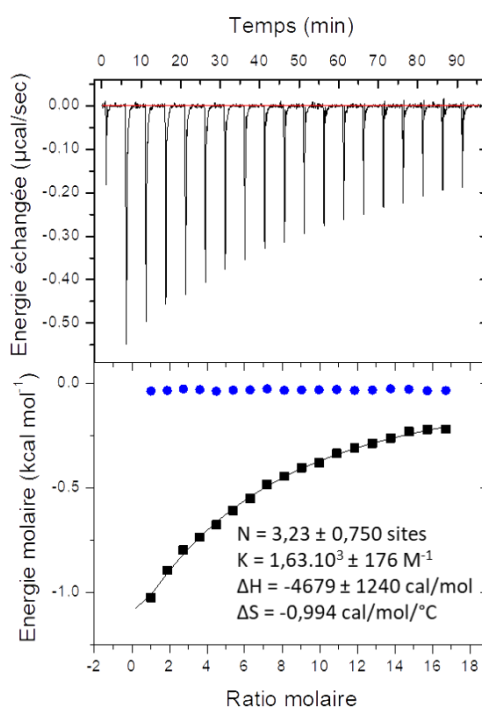


Figure 105 : Analyse par ITC de l'interaction entre HCV7-S0 et des MLVs de DOPC
Les carrés représentent l'analyse L-to-P et les ronds l'expérience contrôle (lipides dans tampon)

Afin de reproduire ce résultat, d'autres analyses de cette interaction dans les mêmes conditions avec des MLVs de DOPC ont été réalisées. Cependant, ces expériences n'ont pas permis d'obtenir le même résultat puisque l'énergie échangée était alors très faible, du même ordre que l'énergie de dilution des lipides dans le tampon. De même, les analyses dans les mêmes conditions avec des LUVs de DOPC n'ont pas permis d'obtenir des résultats exploitables. Dans l'hypothèse où l'interaction dépendrait de la taille et de la lamellarité des vésicules, différentes concentrations en peptide (entre 50 et 150 μM) ont été testées mais ont mené à la même conclusion. On ne peut donc pas exclure que les paramètres thermodynamiques déterminés proviennent d'artefacts dus à la forte hétérogénéité de la solution de MLVs.

Des résultats similaires ont été obtenus avec une solution de MLVs de DMPC/DMPG 9/1, composition plus pertinente biologiquement parlant et correspondant aux premières analyses d'internalisation par fluorescence présentées ci-après. Néanmoins, la détermination des paramètres

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

thermodynamiques s'est révélée délicate. En effet, il a été nécessaire de déterminer l'enthalpie d'interaction grâce à une expérience P-to-L de manière à utiliser cette valeur pour déterminer N et K par une modélisation non plus à 3 mais à 2 paramètres (Figure 106). De cette manière, l'interaction de HCV7-S0 a donné une stœchiométrie de 1 légèrement plus faible qu'avec des lipides DOPC et une constante d'interaction du même ordre, à savoir 10^3 M^{-1} .

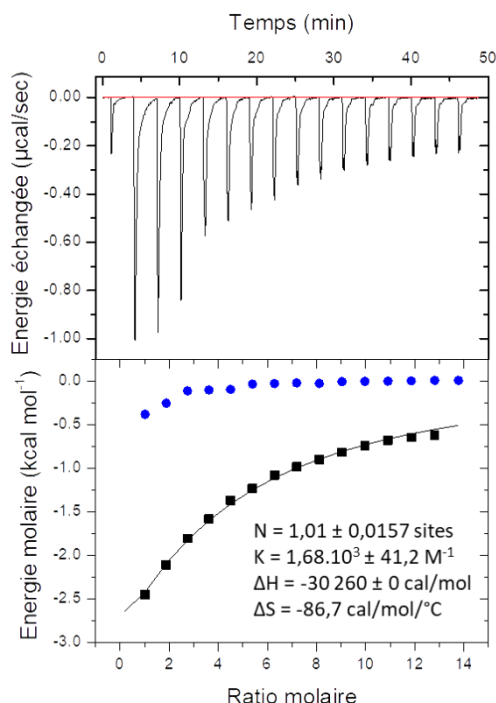


Figure 106 : Analyse par ITC de l'interaction entre HCV7-S0 et des MLVs de DMPC/DMPG 9/1
Les carrés représentent l'analyse L-to-P et les ronds l'expérience contrôle (lipides dans tampon)

Des expériences menées dans les mêmes conditions avec des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 n'ont pas permis de retrouver ces paramètres thermodynamiques, ce qui tend à confirmer la présence d'artéfacts lors de l'utilisation de solutions de MLVs, très hétérogènes.

Dans l'hypothèse où la composition à deux lipides de la membrane influerait sur l'analyse et puisque la DSC a montré des résultats intéressants lors de l'analyse de l'interaction HCV7-S0/DMPG, cette configuration a également été testée en ITC avec des LUVs. Les résultats ainsi obtenus ont montré une énergie très faible, de l'ordre de l'énergie de dilution des lipides dans le tampon. Des analyses dans un tampon phosphate (PBS 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4) n'ont pas permis d'améliorer ces résultats. De même, puisque les expériences ont été réalisées à une température proche de la température de transition des vésicules de DMPG (23°C), d'autres essais ont été réalisés à 30°C, dans l'optique de s'affranchir de possibles artéfacts dus au passage d'un état gel à un état fluide. Cependant, ces expériences n'ont pas non plus permis d'obtenir une énergie échangée suffisante pour être exploitable.

Ainsi, les expériences DSC ont permis de montrer que les peptides de fusion sélectionnés étaient capables d'interagir et de modifier le comportement de bicouches lipidiques utilisées comme modèles de membrane. Le peptide HCV7-S0 s'est d'ailleurs révélé particulièrement efficace sur les lipides anioniques DMPG. Néanmoins, il n'a pas été possible de quantifier correctement cette interaction avec des MLVs ou des LUVs de différentes compositions : zwitterioniques (DOPC, DMPC) ou anioniques (DOPG, DMPG). En effet, si des résultats intéressants ont pu être obtenus lors d'études préliminaires

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

sur des MLVs de DOPC, le comportement du peptide étudié n'a pas été retrouvé lors de la réalisation des triplicats et ce quelles que soient les conditions appliquées (concentrations, tampon, température).

Ce manque de reproductibilité pourrait provenir de l'utilisation de solutions MLVs en étude préliminaire, très hétérogènes et entraînant la visualisation d'artéfacts. Les analyses sur des LUVs, mieux définis en termes de taille et de lamellarité, n'ayant pas donné de résultats exploitables, l'interaction entre nos peptides et les lipides pourrait finalement être très faible, ce qui expliquerait que les différentes conditions testées n'ont pas permis de la caractériser.

3. Etude du comportement membranaire des peptides de fusion

Si les expériences de calorimétrie tendent à montrer l'existence d'une interaction faible entre nos peptides de fusion et des membranes lipidiques, elles ne donnent pas d'informations sur leur comportement au contact de la membrane. L'utilisation de la spectrofluorescence pourrait alors permettre de suivre l'internalisation ou l'insertion d'un peptide, marqué par un fluorophore, dans des vésicules lipidiques. De plus, l'utilisation des peptides libres et d'un système FRET pourrait rendre compte de la capacité de ces séquences à entraîner la fusion de liposomes.

3.1. Suivi de l'internalisation par spectrofluorescence

3.1.1. Principe

La pénétration de nos peptides dans des LUVs comme modèles de membrane a été étudiée sur les conjugués avec le fluorophore NBD (Série S1') en collaboration avec le Dr Gérard Chassaing au Laboratoire des Biomolécules (Université Pierre et Marie Curie). Cette technique a déjà été utilisée pour étudier l'internalisation de peptides polycationiques (Tat, pénétratine, R₉, RW₉ et RL₉) dans des liposomes de différentes compositions.^{174,219} Pour cela, une solution de peptide et une solution de LUVs sont mélangées à la température de l'analyse pendant un temps donné, de manière à atteindre un ratio P/L de 1/100. La température est ensuite diminuée à 10°C afin de bloquer toute pénétration. L'ajout d'un agent réducteur, le dithionite de sodium (DT), permet alors de réduire chimiquement le groupement nitro du NBD en amine, ce qui a pour effet de dissiper la fluorescence de la molécule (Figure 107).

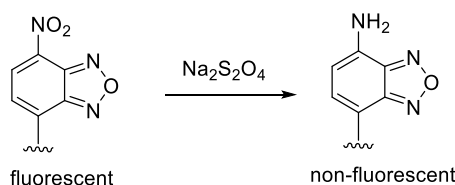


Figure 107 : Réaction de réduction du NBD par le dithionite de sodium (DT)

La membrane étant peu perméable à 10°C, le DT n'est pas capable de pénétrer dans la membrane et de la traverser. La réduction chimique du NBD, et donc la diminution de la fluorescence, n'est possible que sur les composés présents dans le milieu extravésiculaire. En suivant la fluorescence du NBD (555 nm) grâce à un spectrofluorimètre, il est possible d'en mesurer l'intensité et d'observer sa diminution lors de l'ajout du réducteur. Cette diminution étant due à la réduction du NBD dans le milieu extravésiculaire, la fluorescence résiduelle correspond alors au peptide inséré dans la membrane et/ou internalisé dans le milieu intravésiculaire (Figure 108). Connaissant la fluorescence des LUVs seules

²¹⁹ Swiecicki, J.-M.; Di Pisa, M.; Burlina, F.; Lécorché, P.; Mansuy, C.; Chassaing, G.; Lavielle, S. *Biopolymers* **2015**, *104* (5), 533–543.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

(blanc), il est possible de calculer les pourcentages de peptides dans le milieu extravésiculaire et de peptides insérés dans la membrane et/ou internalisés grâce au rapport entre l'intensité de fluorescence avant et après réduction :

$$\% (\text{peptide inséré ou internalisé}) = \frac{I_{\text{red}} - I_0}{I_{10^\circ\text{C}}} \times 100$$

où I_0 correspond à l'intensité de fluorescence des LUVs seules (blanc), $I_{10^\circ\text{C}}$ l'intensité de fluorescence à 10°C avant réduction et I_{red} l'intensité de fluorescence à 10°C après réduction.

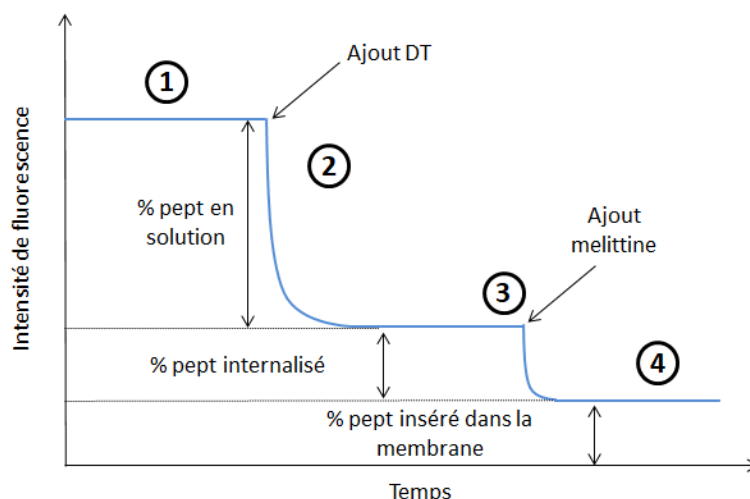


Figure 108 : Evolution de la fluorescence du NBD lors de l'expérience d'internalisation

(1) Fluorescence stable à 10°C ; (2) Ajout du réducteur DT et diminution de la fluorescence ; (3) Ajout de mélistine et formation de pores dans la membrane ; (4) Diminution de la fluorescence due à la pénétration du DT dans le milieu intravésiculaire.

La mélistine est un AMP capable de former des pores dans des bicouches lipidiques, même à basse température. Son utilisation, toujours à 10°C , permet de perméabiliser la membrane sans la détruire, entraînant la pénétration du réducteur dans le milieu intravésiculaire (procédure en cours de publication). De la même manière que précédemment, on observe alors une diminution de l'intensité de fluorescence due à la réduction du fluorophore présent dans le milieu intravésiculaire. La fluorescence résiduelle correspond alors uniquement au peptide inséré dans la membrane (Schéma 58).

A nouveau, le rapport des intensités de fluorescence permet de déterminer le pourcentage de peptide inséré dans la membrane et donc la proportion de peptide internalisé.

Ainsi cette technique présente l'avantage de pouvoir totalement discriminer les proportions de peptides dans les différents milieux (extravésiculaires, insérés dans la membrane et internalisés) par simple mesure de l'intensité de fluorescence. De plus, en travaillant en milieu thermostaté, il est possible d'étudier le comportement des séquences dans les différentes phases de la membrane (gel en dessous de T_m , défauts de phase autour de T_m et fluide au-dessus), pour des liposomes de compositions diverses.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

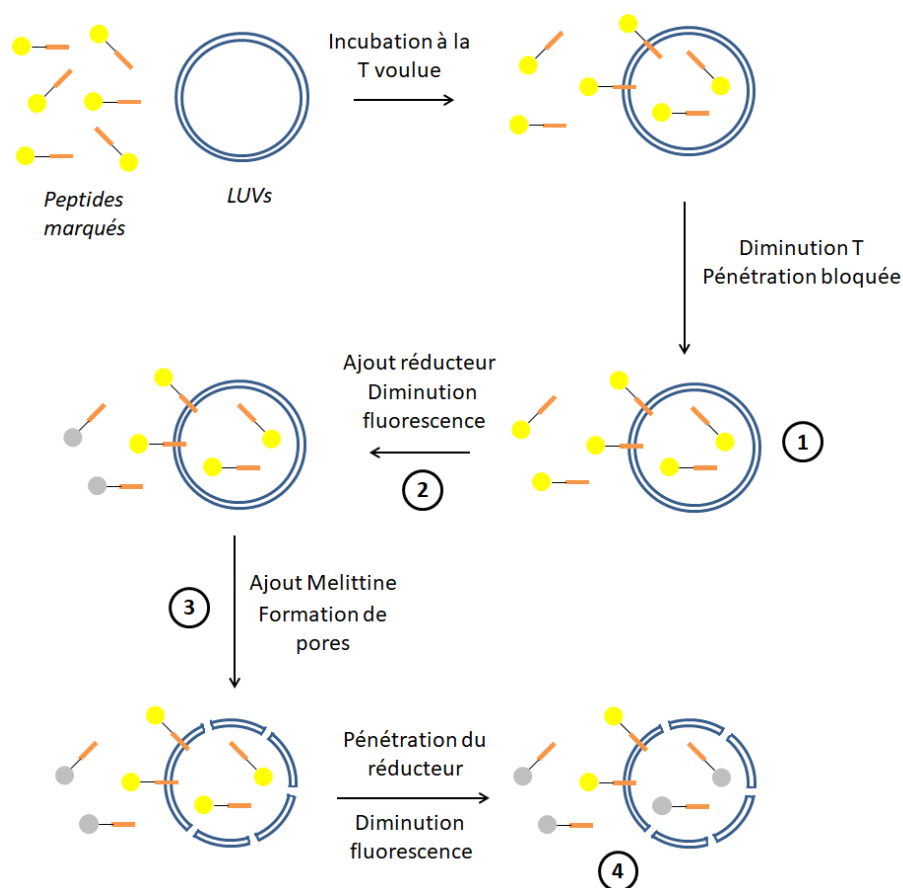


Schéma 58 : Schéma de l'expérience de suivi de l'internalisation par fluorescence

(1) Fluorescence stable à 10°C ; (2) Ajout du réducteur DT et diminution de la fluorescence ; (3) Ajout de méliittine et formation de pores dans la membrane ; (4) Diminution de la fluorescence due à la pénétration du DT dans le milieu intravésiculaire.

3.1.2. Résultats du suivi de l'internalisation des peptides de la Série 1'

Nous avons choisi de travailler avec des LUVs de DMPC et/ou de DMPG, puisque ces lipides ont été utilisés en DSC et ITC, mais également car leur température de transition proche de la température ambiante (24 et 23°C respectivement) permet une expérience plus simple à mettre en œuvre. De plus, de nombreuses études font état de l'importance des défauts de phase dans la bicouche lipidique quant à l'activité de certains peptides comme des polyarginines,²²⁰ ou le peptide de fusion gp41 du VIH.^{221,222} L'utilisation de lipides dont la température de transition est proche de la température ambiante permet ainsi de pouvoir étudier le comportement des différents peptides en phase gel, en phase fluide, ainsi qu'à la température de transition où les défauts de phase sont nombreux du fait de la coexistence de domaine en phase gel et en phase fluide.

Les premiers essais menés avec le peptide Tat-S1' et des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 ont permis de confirmer cette tendance avec une meilleure activité à la température de transition, puisque le pourcentage de peptides internalisés était de 18 % en phase fluide (37°C) et 25 % à 24°C, température de transition de la membrane étudiée (Figure 109).

²²⁰ Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani-Nakase, T.; Ida, H.; Takahashi, Y.; Fukuma, T.; Ulrich, A. S.; Futaki, S. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2017**, 56 (26), 7644–7647.

²²¹ Yang, S.-T.; Kiessling, V.; Simmons, J. A.; White, J. M.; Tamm, L. K. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 1–10.

²²² Yang, S.-T.; Kiessling, V.; Tamm, L. K. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 11401.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

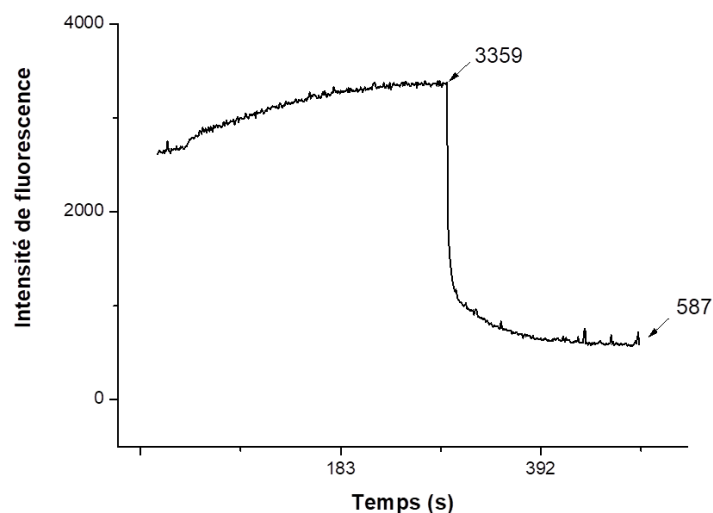


Figure 109 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors de l'expérience d'internalisation de Tat-S1' dans des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 à 37°C

En revanche, aucune internalisation n'a été observée pour HCV3-S1', HCV6-S1' et HCV7-S1' sur des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 et ce quelle que soit la température d'étude. En effet, l'intensité de la fluorescence a diminué jusqu'au niveau du blanc lors de la réduction au DT, indiquant que la totalité du NBD a été réduit et donc que ce dernier se trouve uniquement dans le milieu extravésiculaire (Figure 110).

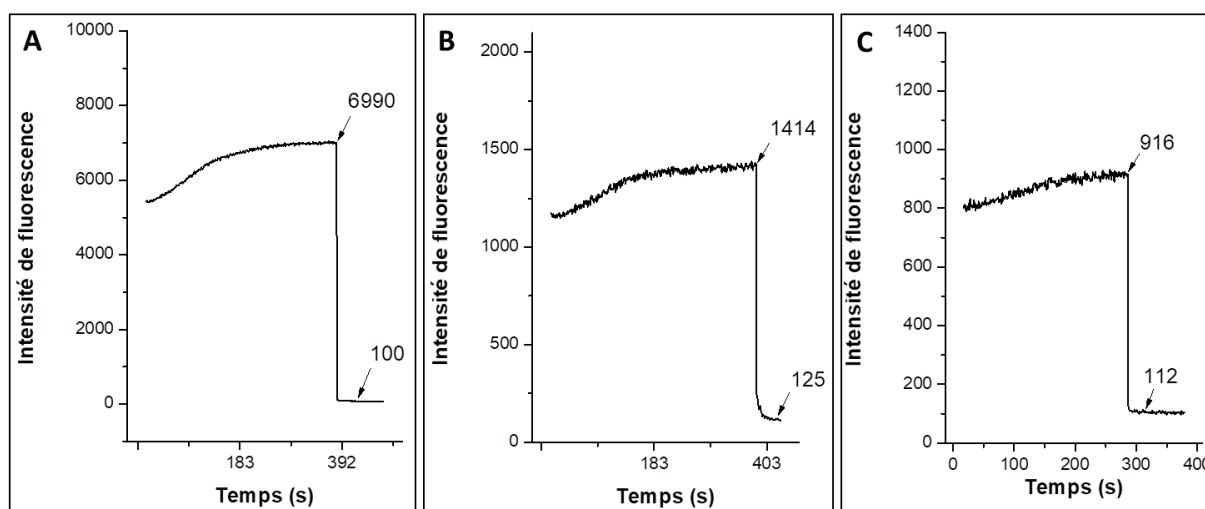


Figure 110 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors des expériences d'internalisation de HCV3-S1' (A), HCV6-S1' (B) et HCV7-S1' (C) avec des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 à 24°C

Ces résultats sont relativement inattendus, puisque les expériences DSC ont montré une action des peptides sur la membrane et que les peptides membranotropes ont tendance à exercer une activité à la T_m . Une hypothèse permettant d'expliquer ces résultats serait la formation de pores aux températures testées. En effet, si les peptides sont capables de former des pores dans la membrane, alors les milieux intravésiculaire et membranaire deviennent accessibles au réducteur DT ce qui expliquerait la diminution totale de l'intensité de fluorescence.

Afin de vérifier cette hypothèse, l'action de ces peptides a été étudiée après internalisation du Tat-S1' dans des LUVs de DMPC/DMPG 9/1. Pour cela, les solutions de Tat-S1' et de LUVs ont été incubées à 24°C, puis le DT a été ajouté après diminution de la température à 10°C. Comme expliqué

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

précédemment, on observe alors une diminution de l'intensité de fluorescence correspondant à la réduction du NBD présent dans le milieu extravésiculaire, les peptides insérés dans la membrane ou internalisés n'étant pas touchés. Les peptides HCV3-S0, HCV6-S0 et HCV7-S0 ont alors été ajoutés dans le milieu (ratio P/L final 1/50). Pour chaque séquence, aucune diminution de l'intensité de fluorescence n'a été observée, montrant que le milieu intravésiculaire n'est toujours pas accessible au DT et donc que les peptides ne sont pas capables de former des pores dans la membrane à 10°C (Figure 111).

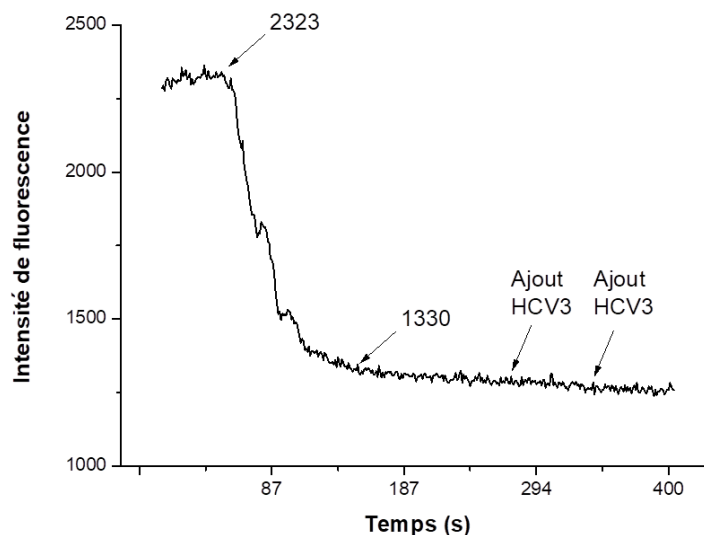


Figure 111 : Evolution de l'intensité de fluorescence du Tat-S1' après ajout de HCV3-S0 sur des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 à 10°C

Dans les mêmes concentrations, l'ajout des peptides HCV3-S0, HCV6-S0 ou HCV7-S0 à 24°C, suivi d'une réduction classique au DT à 10°C a donné le même pourcentage d'internalisation de Tat-S1' que lors de l'expérience sans peptides de fusion. A nouveau, ce résultat montre que les peptides sélectionnés ne sont pas capables de former des pores à 24°C, température de transition des LUVs étudiées.

Outre l'absence d'interaction avec la membrane, d'autres hypothèses pourraient expliquer la réduction totale observée avec HCV3-S1', HCV6-S1' et HCV7-S1'. En effet, ces séquences comportent un motif TTDS permettant d'espacer le fluorophore NBD de la séquence peptidique. Il est donc possible que la présence de ce motif très hydrophile gêne l'interaction avec la membrane et l'internalisation. Une autre possibilité serait que les peptides soient capables de s'insérer dans la membrane, mais le TTDS apporterait suffisamment d'espace pour éloigner le NBD de la bicouche lipidique, le rendant accessible à la réduction de la même manière que s'il était en solution.

Pour vérifier ces hypothèses, le peptide NBD-Tat, comportant un NBD conjugué en position N-terminale mais sans la présence de l'espacer TTDS (fourni par le LBM de l'UPMC), a été testé dans les mêmes conditions sur des LUVs de DMPC/DMPG 9/1. Le pourcentage de peptide internalisé à 24°C était alors de 55 % c'est-à-dire plus du double de celui obtenu avec Tat-S1' (25 %). Le TTDS n'est donc clairement pas un motif adapté à l'utilisation de cette technique pour visualiser l'internalisation de nos peptides.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

3.1.3. Suivi de l'internalisation du peptide HCV-S1''

Afin de s'affranchir des complications entraînées par la présence du motif TTDS, une autre série de peptides (Série S1'') a été envisagée, ne comportant plus de motif TTDS mais un résidu lysine sur lequel le NBD est introduit sur l'amine de la chaîne latérale. Compte tenu des difficultés de synthèse rencontrées avec HCV3 et HCV6 sans TTDS, cette série n'a été préparée que dans le cas du peptide HCV7 (HCV7-S1'', cf Chapitre III). Cette séquence a ensuite été étudiée pour son internalisation dans des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 dans les conditions présentées précédemment. Les résultats obtenus montrent une diminution de la fluorescence lors de la réduction jusqu'à un niveau de fluorescence correspondant à 33 % de la fluorescence initiale (Figure 112). L'ajout de méliittine ne modifie pas la fluorescence, signifiant que ces 33 % ne correspondent pas au peptide internalisé mais uniquement inséré dans la membrane.

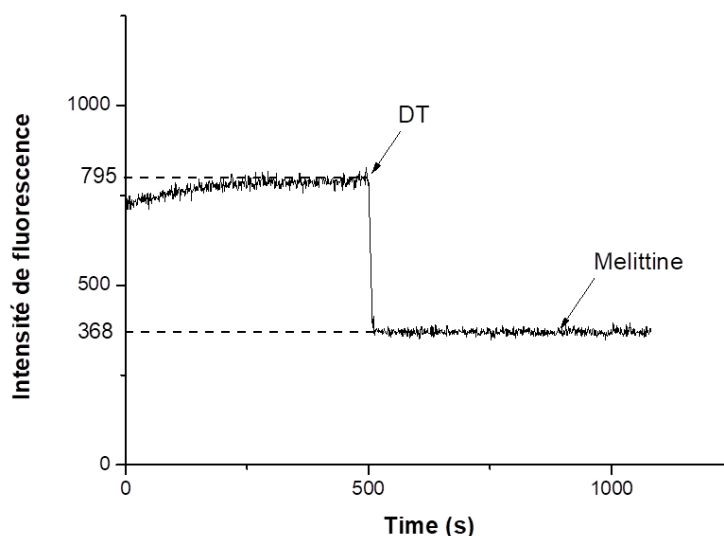


Figure 112 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors de l'expérience d'internalisation de HCV7-S1'' dans des LUVs de DMPC/DMPG 9/1 à 24°C

Lors de la réalisation des triplicats, ces résultats n'ont toutefois pas été retrouvés. Les solutions de LUVs utilisées ayant été préparées à des instants différents, l'hypothèse d'une composition variable en DMPC ou DMPG pourrait éventuellement expliquer ce phénomène. Pour cette raison, des analyses ont également été effectuées sur des LUVs de DMPC et DMPG purs à 24°C (Figure 113).

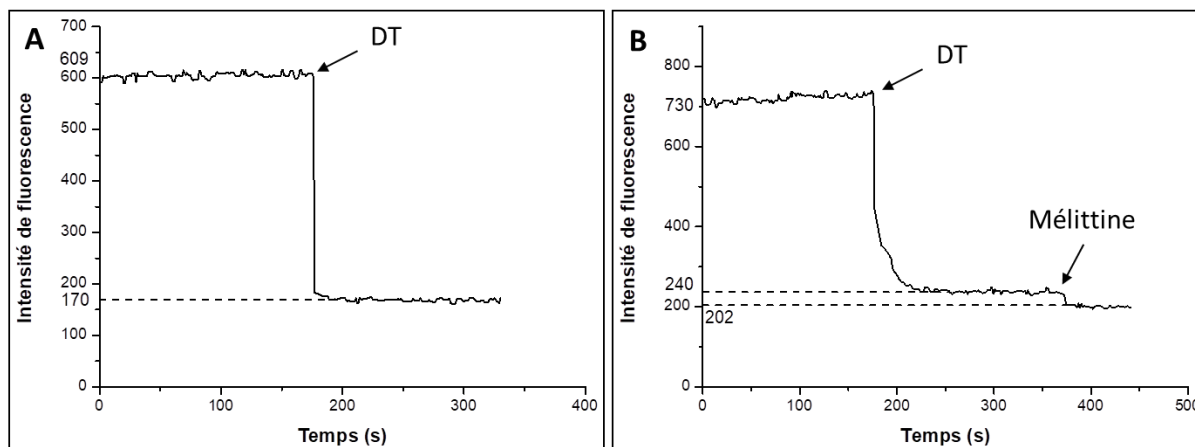


Figure 113 : Evolution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors des expériences d'internalisation de HCV7-S1'' sur des LUVs de DMPC (A) et de DMPG (B)

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

L'expérience avec les LUVs de DMPC n'a montré aucune internalisation ou insertion du peptide, puisque le niveau de fluorescence a diminué jusqu'à atteindre celui des LUVs seules, et ce à 24°C ou à 37°C. En revanche, l'essai avec des LUVs de DMPG s'est révélé plus concluant. En effet, l'intensité de fluorescence a atteint un niveau légèrement supérieur à celui du blanc après réduction au DT. L'ajout de méliittine a ensuite entraîné un retour du niveau de fluorescence à celui du blanc montrant que la fluorescence résiduelle correspondait au peptide internalisé et non pas inséré dans la membrane. La réalisation de cette expérience en triplicat (en utilisant les mêmes solutions de peptide et de LUVs) a permis de calculer une internalisation de $8 \% \pm 2,5 \%$ à 24°C et de $4,7 \% \pm 3,7 \%$ à 37°C. Cependant, l'utilisation de nouvelles solutions dans ces mêmes conditions n'a pas permis de retrouver ces résultats.

Le manque de reproductibilité des expériences menées avec les LUVs de DMPC/DMPG 9/1 et les LUVs de DMPG pures, tend à montrer que le problème ne provient pas de la composition des LUVs. De plus, pour chacune de ces solutions de LUVs, la taille et la monodispersité des vésicules formées après extrusion ont été vérifiées par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *dynamic light scattering*). Enfin, dans l'optique de réaliser une expérience contrôle positive, les solutions de LUVs ont également été testées avec Tat-S1' ou NBD-Tat et chacune s'est révélée capable d'internaliser le peptide.

Le problème de reproductibilité pourrait donc provenir de l'étape de réduction au DT qui est cruciale pour le résultat obtenu. En effet, le DT en solution a tendance à se dégrader en subissant une oxydation au contact de l'air (Figure 114). Pour s'affranchir de cette limitation, la solution de DT habituellement utilisée dans la procédure est fortement concentrée (environ 1M) afin de toujours avoir un large excès d'agent réducteur. Dans le cas de notre peptide HCV7-S1'', l'utilisation d'un tel excès pour permettre une réduction rapide n'est peut-être pas adaptée.

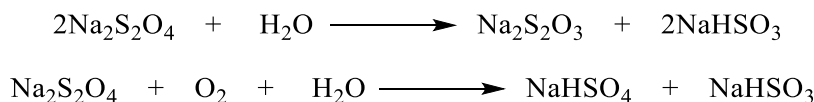


Figure 114 : Equations de dégradation du dithionite de sodium en solution aqueuse

Afin de vérifier cette hypothèse, l'internalisation du peptide HCV7-S1' a été testée sur des LUVs de DMPC/DMPG 7/3 mais en utilisant des ajouts répétés de solution diluée de DT (100 mM) pour réaliser la réduction à 10°C. L'évolution de l'intensité de fluorescence montre alors que l'efficacité de la réduction est dépendante de la quantité de DT utilisée, bien que celui-ci soit toujours en excès par rapport au peptide. On constate alors, qu'à partir d'un certain seuil, la réduction entraîne une diminution brutale de la fluorescence, jusqu'à un plateau correspondant à 8 % de la fluorescence avant réduction (Figure 115). L'ajout de méliittine ne modifie pas le signal montrant que la fluorescence résiduelle correspond uniquement au peptide inséré dans la membrane, ce qui est cohérent avec les premiers résultats obtenus sur des LUVs DMPC/DMPG 9/1. L'ajout de DT supplémentaire continue de diminuer l'intensité de fluorescence jusqu'au niveau du blanc. Cette observation montre que, dans le cas de l'étude du peptide HCV7-S1'', l'utilisation d'un excès trop important de DT entraîne une diminution totale de l'intensité de fluorescence lors de la réduction, et ce alors même que le peptide est capable de s'insérer dans la membrane.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

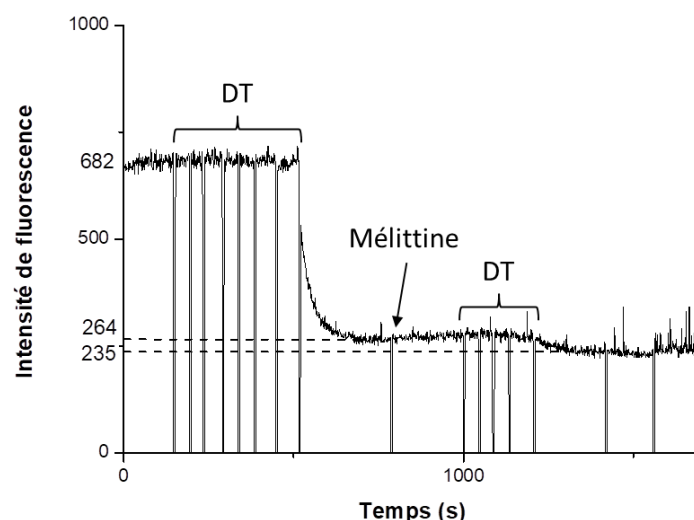


Figure 115 : Evolution de l'intensité de fluorescence lors de l'utilisation d'une solution diluée de DT pour réaliser la réduction dans l'expérience entre HCV7-S1'' et DMPC/DMPG 7/3

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. En effet, il est possible que le peptide ne soit pas réellement inséré dans la bicouche lipidique mais simplement adsorbé à la surface des LUVs grâce à des interactions électrostatiques. Ce comportement expliquerait qu'un très grand excès de DT soit capable de diffuser au travers de la double couche électrique proche de la membrane et ainsi de réduire le NBD comme s'il n'était pas protégé. Une deuxième possibilité serait que le peptide est en équilibre entre différents états dans la membrane ce qui expliquerait que des réductions effectuées à des instants différents permettent de calculer des pourcentages d'insertion très variés. Cette hypothèse supposerait une interaction relativement faible entre le peptide et la membrane et pourrait correspondre soit à différentes structures secondaires au contact de la membrane, soit à un phénomène de partition entre la membrane et le milieu aqueux, ce qui reste cohérent avec les conclusions tirées des expériences de calorimétrie (Figure 116). Malgré le manque de reproductibilité, ces résultats confirment l'existence d'une interaction entre HCV7 et des membranes et tendent à montrer sa faculté à s'y insérer ou à la traverser.

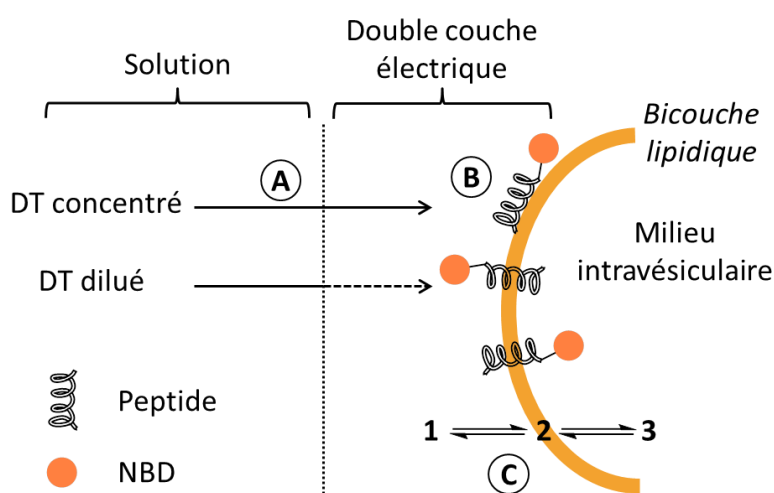


Figure 116 : Différentes hypothèses permettant d'expliquer le manque de reproductibilité des expériences d'internalisation

(A) Diffusion du DT au travers de la double couche électrique à forte concentration ; (B) Différents états du peptide associé à la membrane ; (C) Partition entre la membrane et le milieu aqueux.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

3.2. Etude de l'activité fusogénique

Si l'interaction entre les peptides sélectionnés et des membranes ne semble pas suffisamment forte pour entraîner une internalisation ou une insertion franche dans des liposomes, elle pourrait être suffisante pour entraîner la fusion des vésicules. Il a donc été décidé de caractériser l'activité fusogénique de nos peptides par deux méthodes complémentaires : de la spectrofluorescence utilisant des lipides marqués par un système FRET et le suivi de l'évolution des tailles des liposomes par diffusion dynamique de la lumière.

3.2.1. Visualisation de la fusion des liposomes par FRET

3.2.1.1. Principe

Grâce à un spectrofluorimètre, il est possible de mettre en évidence la fusion de liposomes marqués en utilisant le phénomène de transfert d'énergie de résonance de type Förster (FRET pour *Förster resonance energy transfert*). Ce phénomène correspond à un transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes : un « donneur » d'énergie et un « accepteur ». Deux conditions doivent être remplies pour que le transfert ait lieu : la bande d'émission du composé donneur et la bande d'absorption de l'accepteur doivent se chevaucher au moins partiellement, de manière à ce que l'énergie dégagée suite à l'excitation du donneur soit en partie transmise à l'accepteur ; les fluorophores doivent être spatialement proches (distance inférieure à 10 nm) afin de permettre le transfert d'énergie. Ainsi, lorsque l'on excite le fluorophore donneur par une source lumineuse et si les conditions précédentes sont remplies, ce dernier va transférer son énergie à l'accepteur, qui va alors émettre de l'énergie sous la forme de fluorescence à sa longueur d'onde d'émission. En revanche, si les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur ne se chevauchent pas ou si les molécules sont trop éloignées l'une de l'autre, le transfert d'énergie n'aura pas lieu et seule la fluorescence du donneur à sa longueur d'onde d'émission sera observée (Figure 117).

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

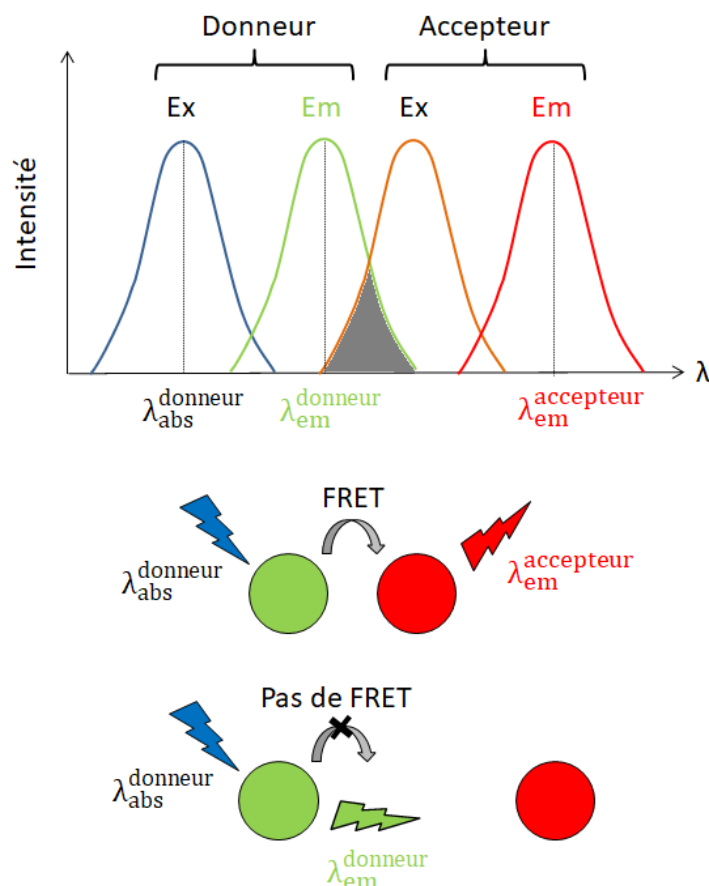


Figure 117 : Conditions nécessaires au transfert d'énergie d'un système FRET

Struck *et al.* ont ainsi utilisé ce phénomène pour mettre en évidence la fusion de liposomes marqués.²²³ Dans cette étude, des vésicules partiellement marquées (2 % molaire) avec les fluorophores NBD (donneur) et rhodamine B (Rho, accepteur) sont mélangées à des vésicules non-marquées. Les auteurs montrent ainsi qu'il est possible d'utiliser le système FRET formé par les deux fluorophores pour suivre la fusion des vésicules sous l'action de concentration croissante de chlorure de calcium.

En effet, lors de la fusion ou de l'hémifusion, les lipides des feuillettes externes des vésicules marquées et non-marquées vont se mélanger. Les lipides portant les fluorophores vont donc s'écarter les uns des autres, ce qui entraînera une diminution de l'efficacité du FRET. Il est ainsi possible d'observer la fusion des vésicules en suivant l'augmentation de la fluorescence du NBD à 530 nm et la diminution de l'émission de la rhodamine à 590 nm (Figure 118). D'autres phénomènes (agrégation, dégradation des LUVs) peuvent également entraîner une diminution de l'efficacité du FRET, mais le suivi de la fluorescence reste une bonne indication de l'activité fusogénique de la séquence.

²²³ Struck, D. K.; Hoekstra, D.; Pagano, R. E. *Biochemistry* **1981**, 20 (14), 4093–4099.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

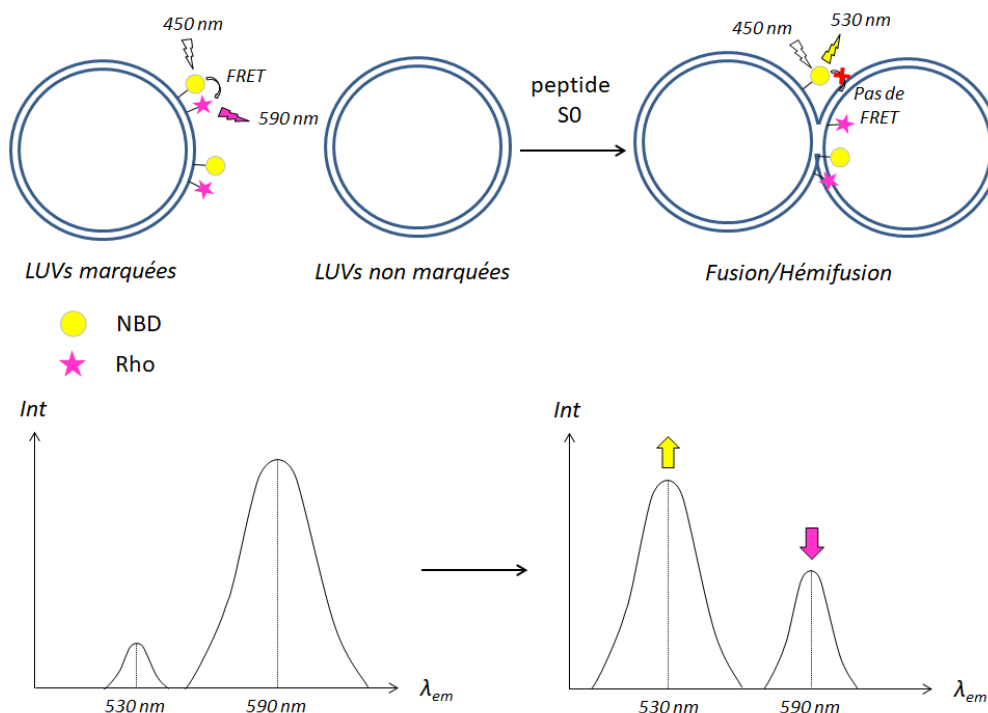


Figure 118 : Utilisation du FRET NBD-Rho pour mettre en évidence la fusion de liposomes

Expérimentalement, seule l'émission du NBD est mesurée en fonction du temps. Cela est dû au fait que le spectre d'émission et d'absorption de la rhodamine se chevauchent, entraînant une perte de fluorescence par un phénomène appelé auto-extinction de fluorescence (ou *self-quenching*). Puisque la fusion entraîne un éloignement des lipides marqués, elle a aussi pour conséquence une diminution du *self-quenching* de la rhodamine. La diminution de l'émission de la rhodamine due à une baisse de l'efficacité du FRET peut alors être contrebalancée par son augmentation due à l'affaiblissement du *self-quenching*.^{224,225}

Cette technique a largement été utilisée pour observer la fusion de liposomes induite par des peptides. Pérez-Berná *et al.*, dont le travail a été présenté précédemment, ont étudié l'activité fusogénique des peptides de fusion du VHC sur des LUVs de PC/PG et cholestérol (Chol) ou sphingomyéline (SM) en appliquant la procédure décrite par Struck.²⁰⁰

Plus récemment, Ulrich *et al.* ont étudié l'activité fusogénique de différents peptides membranotropes (CPPs, AMPs et le peptide de fusion FP23 du VIH) sur des LUVs de composition LM3 (POPC/POPE/POPS/SM/Chol 10/5/2/2/10), généralement utilisée comme modèle de membrane biologique. Il a ainsi été possible de montrer que les CPPs tels que la pénétatine sont capables d'entraîner autant, voire plus de fusion sur les LUVs en 20 min, que le peptide de fusion FP23. En revanche, les AMPs se sont révélés relativement inactifs dans ces conditions.²²⁶

²²⁴ MacDonald, R. I. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265 (23), 13533–13539.

²²⁵ Loura, L. M.; Fedorov, A.; Prieto, M. J. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, 104 (29), 6920–6931.

²²⁶ Wadhwani, P.; Reichert, J.; Bürck, J.; Ulrich, A. S. *Eur. Biophys. J.* **2012**, 41 (2), 177–187.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

3.2.1.2. Résultats de suivi de fusion par FRET

Nous avons ainsi étudié la capacité de nos peptides à engendrer de la fusion dans les conditions décrites par Ulrich à savoir sur des LUVs de LM3 comportant des lipides DPPE-NBD et DPPE-Rho (2 % molaire) et des LUVs de LM3 non-marquées pour atteindre un ratio 1/10 entre LUVs marquées et LUVs non-marquées et une concentration totale de 150 μM en lipides. La solution de peptide (S0) est alors ajoutée pour atteindre une concentration finale de 3 μM (ratio P/L de 1/50) et la fluorescence du NBD à 530 nm est mesurée au cours du temps.

Le premier essai dans ces conditions avec le Tat-S0 a montré une augmentation de fluorescence dès l'ajout de peptide, puis une diminution après 5 min et une détérioration du signal (Figure 119). Visuellement, une précipitation a été observée dans la cuve d'analyse ce qui explique le signal obtenu. L'augmentation de la fluorescence du NBD à 530 nm indique que le peptide a bien une activité fusogénique mais cette dernière entraîne la formation de particules de tailles importantes qui finissent par précipiter.

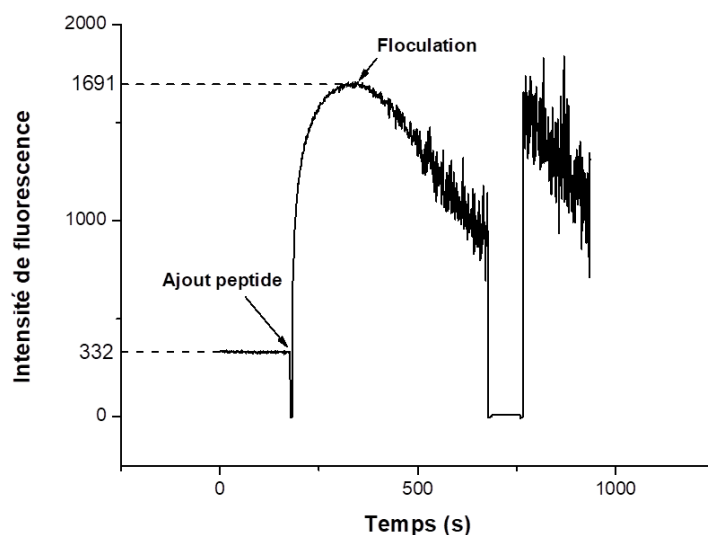


Figure 119 : Evolution de la fluorescence du NBD en fonction du temps lors de l'essai de fusion entre Tat-S0 et des LUVs de LM3

Compte tenu de ce résultat, il paraît évident que le peptide Tat n'est pas une référence adaptée à l'étude de fusion envisagée. Pour cette raison, l'activité fusogénique de la pénétatine (Ac-Pen, fournie par le LBM de l'UPMC) a également été étudiée dans ces conditions. Les ajouts de la solution de peptide ont été répétés jusqu'à atteindre un ratio de 1/12, pour montrer l'influence du ratio P/L sur l'activité (Figure 120). L'intensité de fluorescence à 530 nm augmente ainsi légèrement avec les premiers ratios P/L (1/100 et 1/50) puis brutalement lorsque le ratio 1/12 est atteint. L'intensité atteint ainsi 842 en environ 1h30 contre 330 pour les LUVs seules. Même après 1h30, l'intensité de fluorescence n'est toujours pas stabilisée indiquant que le processus de fusion a toujours lieu. L'échantillon est alors laissé sous agitation à 37°C (bain thermostaté) pour atteindre une intensité de fluorescence de 1280 après 4h et 1340 après une nuit. Le processus de fusion semble donc bien induit par la Ac-Pen et cette activité fusogénique dépend du ratio P/L mais également du temps, puisque 4h d'incubation ont été nécessaires pour atteindre une intensité de fluorescence relativement stable.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

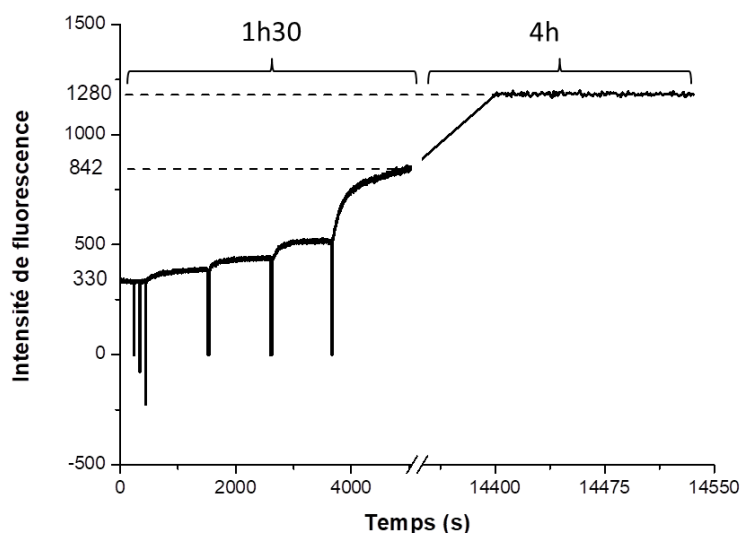


Figure 120 : Evolution de la fluorescence du NBD en fonction du temps lors de l'étude de fusion de Ac-Pen sur des LUVs de LM3

Les différentes séquences sélectionnées (HCV3-S0, HCV6-S0 et HCV7-S0) ont ensuite été testées dans ces conditions. Aucune augmentation de fluorescence n'a été observée à l'ajout des solutions de peptides alors qu'une augmentation significative a eu lieu après incubation sur une nuit (Figure 121).

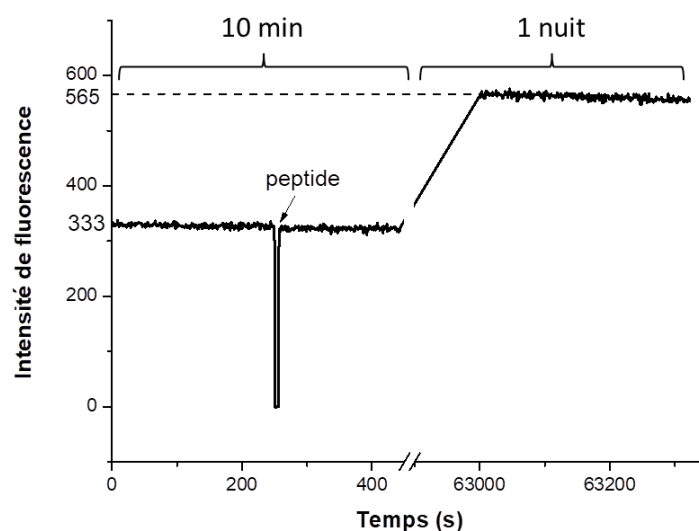


Figure 121 : Evolution de la fluorescence du NBD en fonction du temps lors de l'étude de fusion de HCV7-S0 sur des LUVs de LM3

Afin de vérifier que cette augmentation n'est pas due à un artéfact ou à de la fusion, voire de l'agrégation des LUVs seules, une expérience contrôle sans peptide a été réalisée dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus (Tableau 13) montrent effectivement que l'intensité de fluorescence des LUVs seules augmente pendant une nuit. Si ce résultat laisse supposer que les vésicules sont capables de fusionner ou de s'agréger d'elles-mêmes à 37°C et sur un temps d'expérience aussi long, on peut néanmoins constater que l'incubation des peptides de fusion du VHC sur une nuit entraîne une augmentation de fluorescence légèrement plus marquée. Ces séquences seraient donc légèrement fusogéniques mais impliquées dans un processus lent.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Expérience	Intensité après 10 min	Intensité après une nuit
Ac-Pen	842	1340
HCV3-S0	324	506
HCV6-S0	323	581
HCV7-S0	326	565
LUVs seules	324	480

Tableau 13 : Valeurs d'intensité de fluorescence à 530 nm obtenues lors des expériences de fusion dans les conditions d'Ulrich

Afin de vérifier que le phénomène de fusion ne perturbe pas les expériences d'internalisation réalisées précédemment, des essais utilisant le FRET NBD-Rho ont été réalisés dans les conditions d'internalisation (concentration en lipide totale de 10 μ M) sur des LUVs de composition LM3.

A nouveau, la fusion de l'Ac-Pen a été testée en réalisant des ajouts successifs de solution de peptide. Les résultats obtenus montrent une augmentation brutale de la fluorescence relative au phénomène de fusion à partir d'un ratio P/L de 1/3, bien plus important que le ratio 1/100 utilisé lors des expériences d'internalisation (Figure 122).

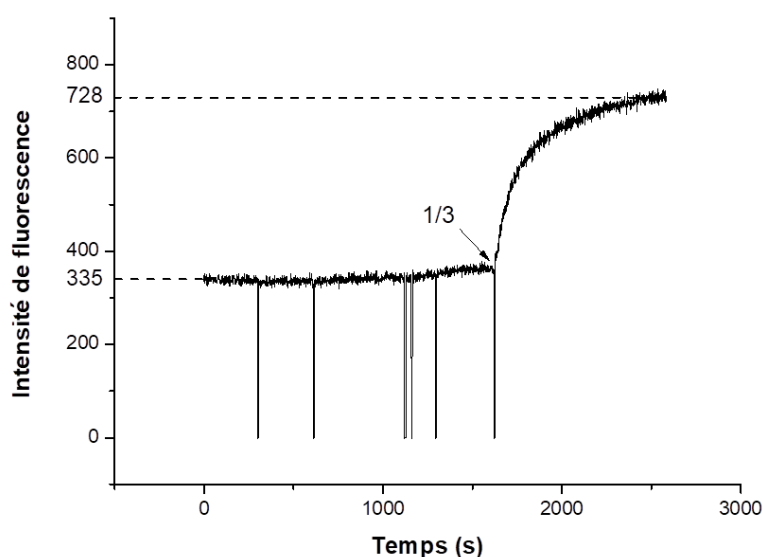


Figure 122 : Evolution de la fluorescence du NBD en fonction du temps lors de l'étude de fusion d'Ac-Pen sur des LUVs de LM3 dans les conditions d'internalisation

Différentes séquences ont alors été testées dont des CPPs (R₉, RW₉), un AMP, la magainine 2 (Mag-2) et le peptide de fusion HCV6-S0 semblant être la séquence la plus active parmi celles qui ont été choisies. Les solutions de peptide ont été ajoutées à la solution de LUVs de manière à atteindre un ratio P/L de 1/3, puis les intensités de fluorescence du NBD ont été mesurées après 10 min, 3h et une nuit d'incubation à 37°C. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature dans la mesure où les CPPs semblent effectivement être fusogéniques mais pas l'AMP étudié (Tableau 14). Néanmoins, la Mag-2 entraîne une augmentation de fluorescence significative après une nuit, indiquant une diminution de l'efficacité du FRET. Cette observation n'est pas nécessairement en contradiction avec les conclusions d'Ulrich²²⁶ sur l'activité fusogénique des AMPs, dans la mesure où la diminution de l'efficacité du FRET peut être attribuée à d'autres phénomènes que la fusion. En effet, l'AMP pourrait

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

avoir une activité type « détergent » et détériorer la membrane, ce qui entraînerait également l'éloignement des fluorophores et donc une diminution de l'efficacité du FRET.

HCV6-S0, quant à lui, n'a pas entraîné d'augmentation de fluorescence, même après incubation sur une nuit. Le peptide ne semble donc pas fusogénique, en tout cas dans les conditions utilisées pour les tests d'internalisation. Les manques de reproductibilité observés dans ces derniers ne proviennent donc pas d'une perturbation de l'analyse par un processus de fusion ou d'agrégation des vésicules.

Expérience	Intensité après 10 min	Intensité après 3h	Intensité après 1 nuit
Ac-Pen	730	768	1142
RW ₉	702	310	550
R ₉	746	334	476
Mag-2	362	385	631
HCV6-S0	332	342	450
LUVs seules	333	-	420

Tableau 14 : Valeurs d'intensité de fluorescence à 530 nm obtenues lors des expériences de fusion dans les conditions d'internalisation

3.2.2. Suivi de la fusion des liposomes par DLS

Dans l'optique de vérifier la tendance observée en spectrofluorescence utilisant un système FRET, le processus de fusion a été suivi par diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *dynamic light scattering*). Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que le suivi de fusion par fluorescence : une concentration totale en LUVs de LM3 (uniquement non-marquées) de 150 μ M et une incubation de la solution de peptide à 37°C. Après un premier ajout de la solution de peptide pour atteindre un ratio 1/50, la taille des LUVs est mesurée par DLS après 20 min, puis une nuit d'incubation. Un nouvel ajout de peptide est réalisé pour atteindre le ratio de 1/12, puis la taille des vésicules est analysée après 8 h, puis 24 h supplémentaires.

L'analyse des LUVs de LM3 seules a ainsi infirmé l'existence d'un phénomène de fusion ou d'agrégation des vésicules dans ces conditions, puisque la taille de ces dernières n'a pas augmenté, même après deux jours d'incubation à 37°C (Figure 123). L'augmentation de fluorescence observée lors des expériences de fusion faisant intervenir le FRET NBD-Rho est donc certainement due à une concentration des solutions à 37°C, puisque ce phénomène n'a été observé que pour des temps relativement longs (une nuit). On peut donc raisonnablement considérer que l'augmentation légèrement plus marquée de la fluorescence lors de l'utilisation des différents peptides est bien due à un phénomène de fusion

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

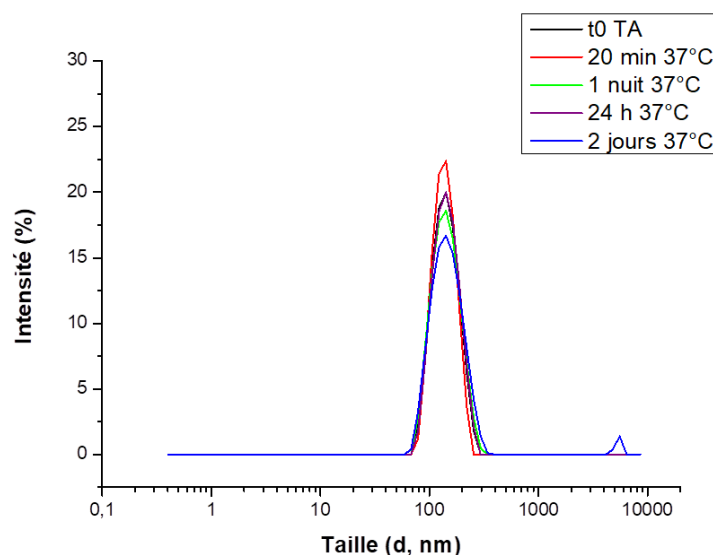


Figure 123 : Evolution de la taille des LUVs de LM3 lors du suivi de fusion sans peptide par DLS

Le suivi de la fusion par DLS des LUVs de LM3 par l'Ac-Pen a confirmé les résultats obtenus précédemment. En effet, une augmentation en taille significative (d'environ 135 nm à 185 nm) a été observée après 20 min d'incubation à 37°C traduisant une activité fusogénique du peptide. Les ajouts supplémentaires de peptide et des temps d'incubation plus longs ont confirmé cette tendance avec des tailles de plus en plus importantes (jusqu'à 242 nm, Figure 124).

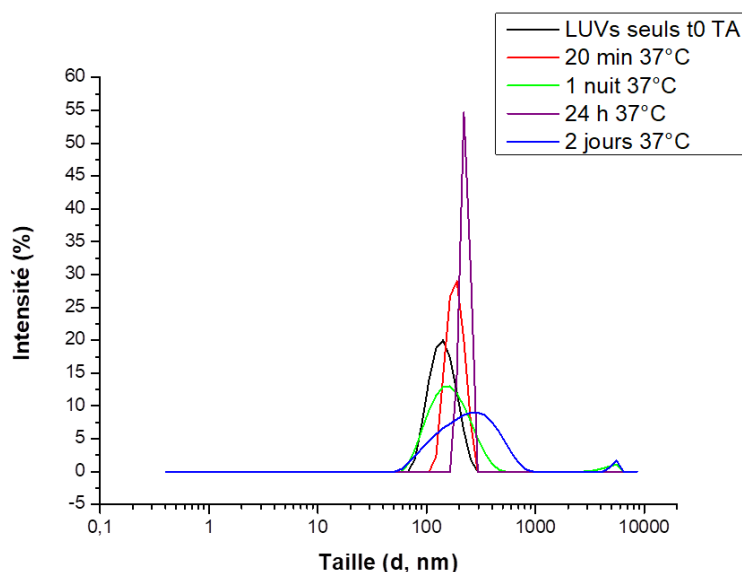


Figure 124 : Evolution de la taille des LUVs de LM3 lors du suivi de fusion induite par Ac-Pen par DLS

Enfin, si les peptides HCV3-S0 et HCV7-S0 n'ont pas entraîné une augmentation significative de la taille des LUVs, le peptide HCV6-S0 s'est révélé plus efficace. En effet, comme pour les expériences de FRET, le peptide n'a pas induit d'augmentation de taille et donc de fusion 20 min ou une nuit après le premier ajout. Néanmoins, une légère augmentation a été observée 8 h après le deuxième ajout (de 139 nm à 148 nm), qui s'est révélée beaucoup plus significative (jusqu'à 215 nm) après 24h (Figure 125).

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

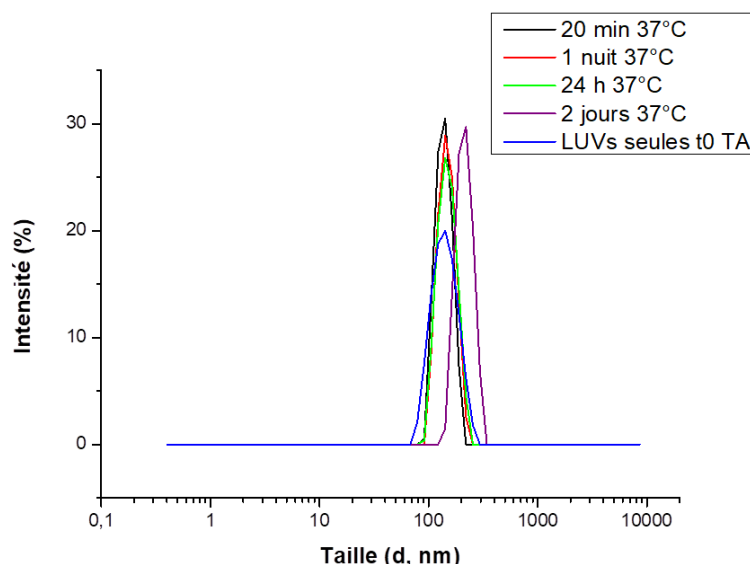


Figure 125 : Evolution de la taille des LUVs de LM3 lors du suivi de fusion induite par HCV6-S0 par DLS

Ces résultats confirment donc les conclusions tirées des expériences FRET, à savoir que les peptides HCV3, HCV6 et HCV7 étudiés engendrent peu de fusion, que ce processus est lent et que le peptide HCV6-S0 semble être le peptide le plus fusogénique des séquences choisies.

Lors des études menées par Ulrich, des analyses en dichroïsme circulaire ont permis de corréler l'activité en fusion avec la capacité du peptide à se structurer au contact de la membrane, sans que la structure secondaire adoptée ne semble avoir d'importance.²²⁶ Cette observation et nos résultats de suivi de fusion sont à rapprocher des études structurales par dichroïsme circulaire, menées par le Pr. Carotenuto de l'université de Naples. En effet, si les peptides HCV6-S0 et HCV7-S0 sont non-structurés en solution, ils sont capables d'adopter certaines conformations au contact de micelles (Figure 126). Ainsi, HCV6-S0 adopte majoritairement une structure β au contact de micelle de dodécylphosphocholine (DPC) alors que HCV7-S0 forme des structures en hélices (entre 2 et 7%), en coude β (entre 20 et 30 %), mais reste majoritairement non-structuré (environ 70 %) au contact de micelles de DPC et de dodécylsulfate de sodium (SDS). La difficulté du peptide HCV7-S0 à se structurer au contact de membranes pourrait être la cause d'une interaction faible, difficilement caractérisable par les techniques utilisées (ITC, spectrofluorescence).

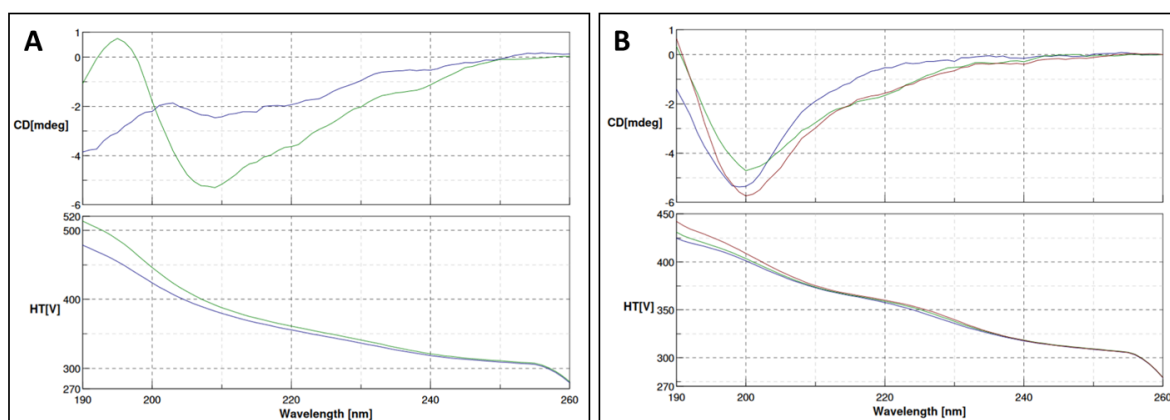


Figure 126 : Spectres de dichroïsme circulaire des peptides HCV6-S0 (A) et HCV7-S0 (B)
Spectre du peptide dans l'eau (bleu), au contact de micelles de DPC (vert) et de SDS (rouge)

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Les résultats de suivi de fusion en spectrofluorescence et en DLS confirment donc les observations réalisées par Ulrich puisque, parmi les séquences sélectionnées, HCV6-S0 se structure fortement au contact de membrane et montre par ailleurs la meilleure activité fusogénique.

4. Analyse par microscopie à épifluorescence

Dans l'optique de confirmer le comportement membranaire de nos peptides mis en évidence par des expériences de fluorescence, des analyses en microscopie à épifluorescence ont été menées en collaboration avec le Pr. Franck Carreiras et le Dr Sabrina Kellouche (laboratoire ERRMECe, UCP). Lors de cette étude, le comportement des peptides Tat-S1', HCV3-S1', HCV6-S1' et HCV7-S1' a été étudié sur des liposomes de différentes compositions. Puisque le peptide HCV7 semble être la séquence la plus active, les capacités de pénétration de ce dernier et de notre peptide référence Tat ont également été caractérisées par microscopie à épifluorescence sur des cellules cancéreuses CHO (*Chinese Hamster Ovarian cells*).

4.1. Visualisation de l'action des peptides sur des liposomes

Afin de réaliser les expériences de microscopie sur des liposomes, des solutions 100 μ M de peptides ont été ajoutées à des solutions 5 mM de MLVs de différentes compositions (DMPG et DMPC/DMPG 9/1) de manière à atteindre un ratio P/L de 1/50. En effet, du fait des limitations de résolution du microscope, des MLVs (0,1-15 μ m) ont été préférées à des LUVs, trop petites pour être observées (100-200 nm). Après 20 min d'agitation à température ambiante, une goutte du mélange est déposée sur une lame surmontée d'une lamelle puis observée au microscope.

Les résultats obtenus avec le peptide de référence Tat-S1' ont ainsi confirmé la capacité du peptide à pénétrer dans le milieu intravésiculaire de MLVs de DMPG ou de DMPC/DMPG 9/1 puisque la fluorescence du NBD a été observée dans le coeur de la vésicule (Figure 127). L'analyse reste cependant très qualitative puisque les MLVs sont de tailles et de lamellarités différentes ce qui explique que plusieurs comportements peuvent être observés lors d'une même analyse. De plus, les liposomes n'étant pas fixés à la plaque, le manque de netteté de certains clichés et la fluorescence diffuse traduisent le mouvement brownien des liposomes en solution.

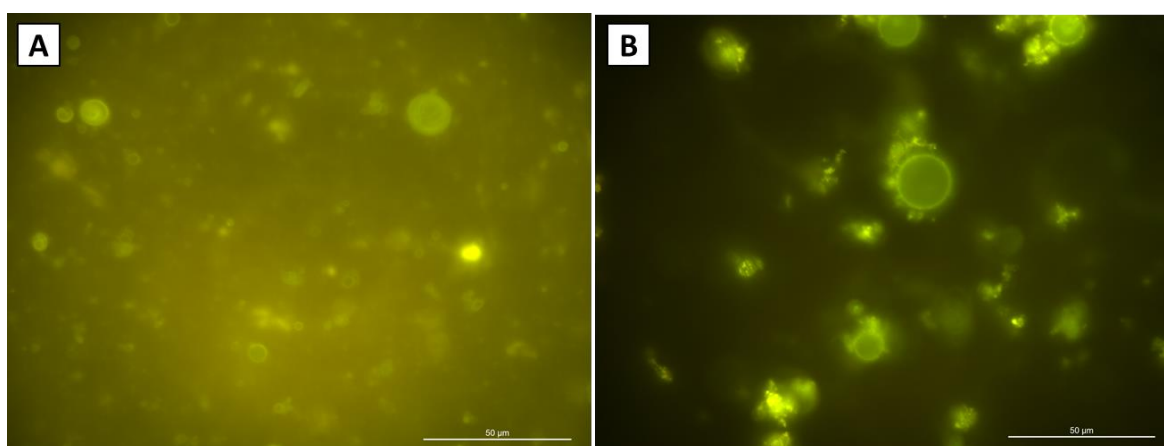


Figure 127 : Microscopie à épifluorescence de Tat-S1' sur des MLVs de DMPC/DMPG 9/1 (A) et DMPG (B)

Les premiers essais réalisés avec le peptide HCV7-S1'' et des MLVs de DMPC/DMPG 9/1 se sont montrés très prometteurs dans la mesure où ils confirment les résultats obtenus pour ce peptide et ce type de membrane par spectrofluorescence. En effet, le premier cliché obtenu montre clairement qu'aucune fluorescence n'est visible à l'intérieur des vésicules, mais qu'un liseret se forme autour de

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

la membrane (Figure 128A). Cette observation confirme donc la capacité du peptide HCV7-S1'' à s'insérer dans une membrane de cette composition, sans la traverser. Malheureusement, comme pour les expériences d'internalisation, ce résultat n'a pas été retrouvé lors de la réalisation des triplicats. En effet, les analyses qui ont suivi ont montré de la fluorescence du NBD à l'intérieur des vésicules étudiées (Figure 128B). Ces dernières semblent toutefois de plus petites tailles que lors des premières expériences, rendant la fluorescence relativement diffuse et donc les observations peu fiables.

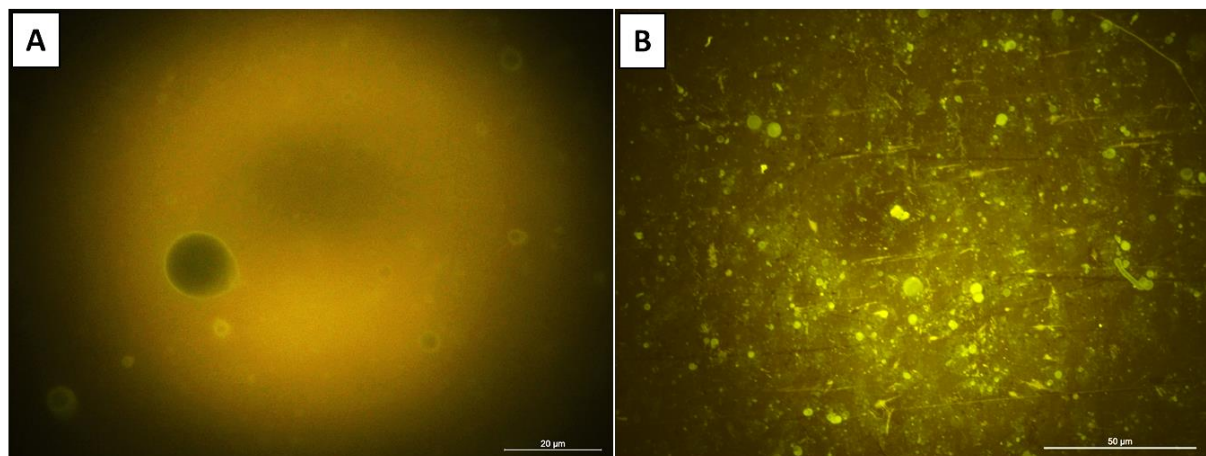


Figure 128 : Microscopie à épifluorescence de HCV7-S1'' sur des MLVs de DMPC/DMPG 9/1.
(A) Visualisation du liséré de fluorescence autour de la membrane et absence de fluorescence dans la vésicule ; (B) Deuxième expérience contradictoire montrant l'internalisation dans de plus petites vésicules.

Si ce manque de reproductibilité pouvait être attribué à des artefacts de mesure ou une trop faible interaction peptide/lipide dans le cas des expériences d'internalisation, le problème semble ici provenir de l'utilisation de solutions de MLVs, fortement hétérogènes en termes de taille et de lamellarité. Il pourrait donc être intéressant de travailler avec des vésicules mieux définies comme des GUVs, puisque les LUVs sont de trop petite taille pour être visualisées au microscope optique.

L'expérience réalisée avec HCV7-S1'' et des MLVs de DMPG semble également confirmer les résultats obtenus par spectrofluorescence. En effet, la fluorescence visible à l'intérieur des vésicules de DMPG montre que le peptide est capable de s'internaliser dans les conditions de l'analyse (Figure 129).

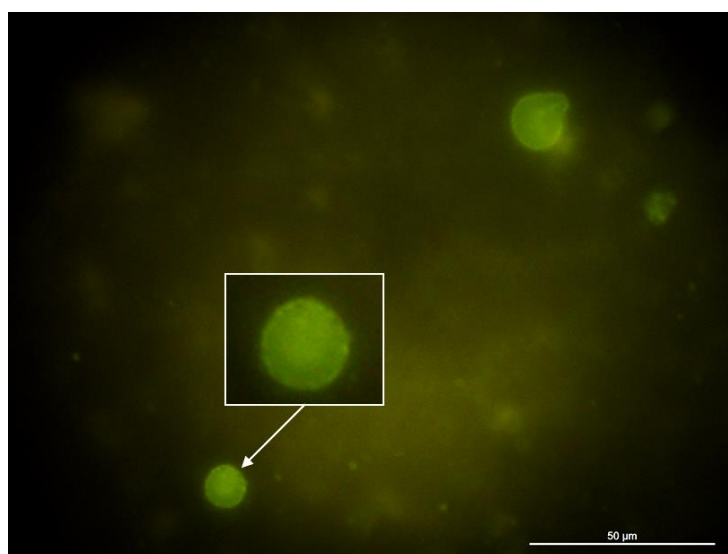


Figure 129 : Microscopie à épifluorescence de HCV7-S1'' sur des MLVs de DMPG

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

En revanche, les analyses des peptides HCV3-S1' et HCV6-S1' sur des MLVs de DMPC/DMPG 9/1 ou de DMPG se sont révélées moins concluantes. En effet, lors de l'utilisation de ces peptides, les vésicules observées au microscope ont présenté deux différences majeures avec celles des expériences impliquant Tat-S1' ou HCV7-S1'' : une taille globalement réduite, sauf quelques amas d'environ 20-30 μm , et aucun objet en mouvement. Ces informations laisseraient penser que les séquences HCV3-S1' et HCV6-S1' seraient capables de s'agréger ou d'agréger les vésicules et donc de les faire précipiter.

4.2. Visualisation de l'action des peptides sur des cellules

Dans la mesure où le peptide HCV7-S1'' semble présenter la meilleure pénétration membranaire, ce dernier ainsi que le peptide de référence Tat-S1' ont été testés sur des cellules épithéliales animales (CHO). Pour cela, les solutions de peptides (100 μM pour le Tat-S1' et 25 μM pour HCV7-S1'') ont été ajoutées à des cellules cultivées sur lamelle. Les cellules ont ensuite été placées à 37°C pendant 30 min ou 1h de manière à permettre l'incorporation du peptide. Après 30min ou 1h d'incubation, les cellules sont fixées 10 min au paraformaldéhyde (PFA) 3%, puis l'ADN des noyaux est marqué au DAPI (4,6-diamino-2-phenyliindoldihydrochloride, D9542, Sigma) (composé fluorescent se liant fortement aux bases constitutives de l'ADN, permettant ainsi de visualiser le noyau). Enfin, les cellules sont lavées une fois au PBS et à l'eau distillée. Les lamelles sont montées à l'aide du Prolong Gold et observées au microscope à épifluorescence Leica DMLB. Les images obtenues sont traitées avec le logiciel ImageJ.

L'observation des cellules montre clairement une internalisation du peptide dans le milieu intracellulaire dans le cas du Tat-S1' dès 30 min d'incubation. En effet, la fluorescence du NBD (jaune) est visible dans le cytosol et le marquage ponctiforme (points de fluorescence) suggère une pénétration par endocytose (Figure 130A). Après 1h d'incubation, la fluorescence est aussi présente dans le milieu intracellulaire, mais semble se concentrer autour du noyau (Figure 130B). Cette observation est en accord avec la littérature, puisque de nombreuses études montrent que le Tat est capable d'assurer la pénétration cellulaire de différents cargos par endocytose, voire même de les délivrer autour du noyau (transfection).^{168,169,227,228,229}

On constate également une diminution du nombre de cellules sur plaque entre 30 min et 1h d'incubation due à l'élimination des cellules mortes (qui n'adhèrent donc plus à la plaque) lors du lavage. La toxicité du peptide Tat étant faible sur les cellules CHO,²³⁰ la cytotoxicité observée correspond certainement à l'action du fluorophore NBD. L'observation d'une concentration de fluorescence autour du noyau des cellules est donc à relativiser, puisqu'elles adoptent un état « rétracté » du fait de l'action cytotoxique du NBD. Bien que ce dernier permette de faire le parallèle avec les expériences d'internalisation par spectrofluorescence, il serait intéressant d'utiliser un autre marqueur fluorescent, peut-être même de réaliser un immunomarquage.

²²⁷ Meng, S.; Wei, B.; Xu, R.; Zhang, K.; Wang, L.; Zhang, R.; Li, J. *Intervirology* **2009**, 52 (3), 135–140.

²²⁸ Moschos, S. A.; Jones, S. W.; Perry, M. M.; Williams, A. E.; Erjefalt, J. S.; Turner, J. J.; Barnes, P. J.; Sproat, B. S.; Gait, M. J.; Lindsay, M. A. *Bioconj. Chem.* **2007**, 18 (5), 1450–1459.

²²⁹ Lo, S. L.; Wang, S. *Biomaterials* **2008**, 29 (15), 2408–2414.

²³⁰ El-Andaloussi, S.; Järver, P.; Johansson, H. J.; Langel, Ü. *Biochem. J.* **2007**, 407 (2), 285–292.

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

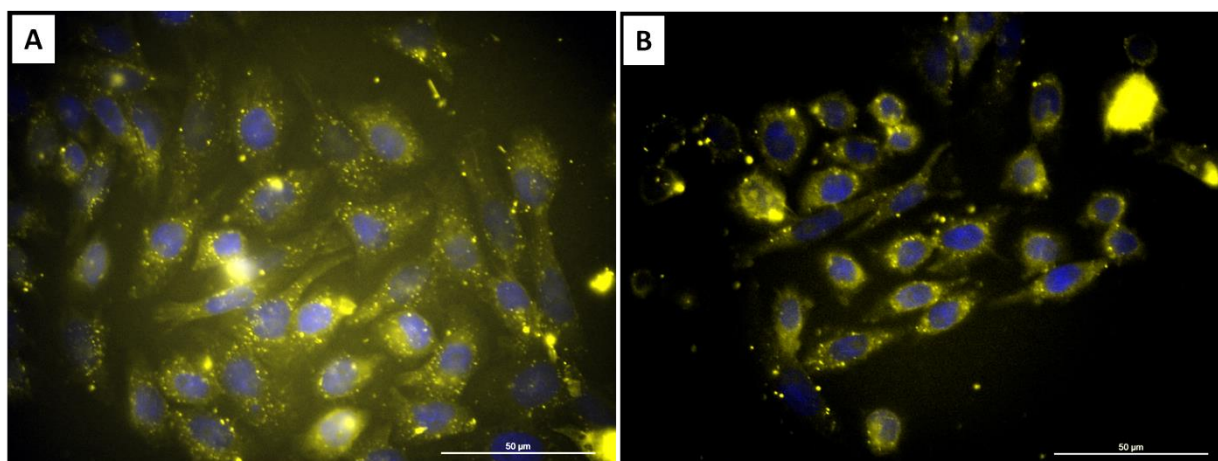


Figure 130 : Microscopie à épifluorescence de Tat-S1' sur des cellules CHO après 30 min (A) et 1h (B) d'incubation à 37°C

Les expériences avec le peptide HCV7-S1'' ont également montré sa capacité à pénétrer dans le milieu intracellulaire. En effet, la fluorescence du NBD est également visible dans le cytoplasme après 30 min d'incubation, et semble se concentrer autour du noyau après 1h (Figure 131).

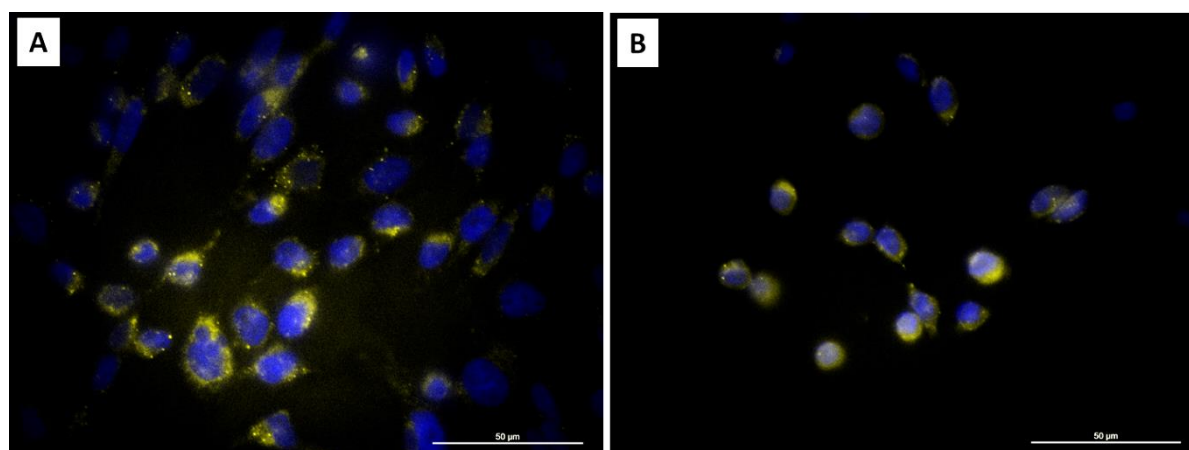


Figure 131 : Microscopie à épifluorescence de HCV7-S1'' sur des cellules CHO après 30 min (A) et 1h (B) d'incubation à 37°C

Comme dans le cas de Tat-S1', un marquage ponctiforme est observé lors de l'internalisation du peptide HCV7-S1'' traduisant une pénétration par endocytose. Cette observation n'est cependant pas suffisante pour conclure quant au mécanisme général de pénétration du peptide. Il pourrait donc être pertinent de réaliser ces mêmes expériences avec une incubation à plus basse température (4°C) dans la mesure où les transports actifs comme l'endocytose seraient bloqués. Une pénétration du peptide signifierait alors que le mécanisme fait également intervenir une diffusion passive au travers de la membrane.

5. Conclusion sur la caractérisation de l'interaction peptide/membrane

Les techniques de calorimétrie ont permis de mettre en évidence l'interaction entre les séquences HCV3, HCV6 et HCV7 sélectionnées et des bicouches lipidiques (Tableau 15). L'utilisation de la DSC a notamment démontré l'activité membranaire du peptide HCV7-S0 sur des vésicules de DMPC, probablement due à la présence d'un résidu arginine dans la séquence. Le peptide s'est ainsi révélé

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

capable de fluidifier une telle membrane par une action « localisée », certainement due à la formation d'agrégats au contact des lipides. En revanche, les analyses ITC n'ont pas permis de quantifier ces interactions, du fait d'une interaction trop faible ou de conditions d'analyse difficiles à maîtriser. Dans ce cas, il pourrait être intéressant de caractériser l'interaction P/L par d'autres techniques comme la résonance des plasmons de surface (SPR pour *surface plasmon resonance*) ou des analyses d'ondes acoustiques de surface (SAW pour *surface acoustic waves*) initialement prévues. De plus, des analyses sur des constituants membranaires anioniques plus pertinents tels que les PS, PI ou des GAGs pourraient également permettre de mieux appréhender le comportement du peptide.

Analyse	Composition lipidique	HCV3	HCV6	HCV7
DSC	DMPC	-	-	Pas d'influence
	DMPG	Détériore la membrane	Pas d'influence	Fluidifie la membrane
ITC	DOPC	Pas d'interaction	Pas d'interaction	Interaction mais non quantifiée
	DOPG	Pas d'interaction	Pas d'interaction	Pas d'interaction
	DMPG	-	-	Pas d'interaction
Internalisation	DMPC/DMPG	Pas d'internalisation Pas de formation de pores	Pas d'internalisation Pas de formation de pores	Insertion dans la membrane
	DMPC	-	-	Pas d'internalisation
	DMPG	-	-	Légère internalisation
Fusion	LM3	Pas de fusion	Fusion lente	Pas de fusion
Microscopie	DMPC/DMPG	Non concluant	Non concluant	Insertion dans la membrane
	DMPG	Non concluant	Non concluant	Internalisation
	CHO	-	-	Internalisation

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des résultats d'analyses d'interaction P/L

L'étude du comportement des peptides par spectrofluorescence a également permis de constater que si les séquences HCV3-S0 et HCV6-S0 ne semblent pas montrer d'activité membranotrope particulière, HCV7-S0 est capable de s'insérer dans des membranes de DMPC/DMPG 9/1 et de faiblement s'internaliser dans des LUVs de DMPG à la température de transition. En dépit d'un manque de reproductibilité probablement dû à une trop faible interaction ou à l'existence du peptide sous plusieurs états au contact de la membrane (conformations ou équilibre de partition), ces résultats confirment les observations réalisées en calorimétrie, à savoir que la séquence HCV7-S0 semble être la plus membranotrope. Son activité reste néanmoins bien moins importante que d'autres CPPs comme le Tat ou RW₉.

Les expériences de fusion suivies par spectrofluorescence grâce à un système FRET NBD-Rho ou par DLS ont montré que les peptides sélectionnés entraînent peu de fusion sur des LUVs de LM3, par un

Chapitre IV : Caractérisation de l'interaction peptide/membrane

processus lent et dépendant du ratio P/L utilisé. Si son activité fusogénique n'est pas comparable à celle de la pénétratine ou du Tat, HCV6 s'est révélé être la séquence la plus active parmi les trois sélectionnées.

Enfin, l'étude du comportement des peptides de fusion sur des MLVs par microscopie à épifluorescence a également permis de confirmer les observations précédentes. Cette expérience reste néanmoins qualitative dans la mesure où les solutions de MLVs utilisées sont très hétérogènes et induisent nécessairement des comportements différents. Par ailleurs des expériences avec des cellules CHO ont prouvé la capacité de la séquence HCV7 à pénétrer dans le milieu intracellulaire. Bien que la cytotoxicité observée semble être induite par le fluorophore NBD, l'utilisation de HCV7-S1'' apparaît plus néfaste pour les cellules qu'avec Tat-S1'. Il pourrait donc être intéressant d'étudier la cytotoxicité ou le potentiel antimicrobien de la séquence seule. De plus, l'utilisation d'un autre fluorophore ou d'un immunomarquage pourrait permettre de réduire la toxicité induite par les peptides et donc de tirer des conclusions plus fiables quant à l'activité de nos séquences.