

# **Amélioration de la pénétration membranaire**

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Le deuxième axe développé dans ce projet porte sur l'amélioration de la pénétration cellulaire du nucléoside SRO91. De nombreux composés, notamment des peptides tels que les *cell-penetrating peptides* (CPPs), les peptides antimicrobiens (AMPs) et les peptides pH-sensibles peuvent ainsi permettre à des molécules thérapeutiques de traverser la membrane plasmique ou la membrane endosomale. Les peptides de fusion sont un autre type de peptides membranotropes pouvant être utilisés comme agents de pénétration cellulaire. En effet, ces séquences très hydrophobes présentes dans les protéines de fusion virales sont capables de s'insérer dans la membrane plasmique afin d'initier le processus de fusion en complément d'interaction avec des récepteurs de la cellule hôte. Afin de conférer une meilleure pénétration cellulaire au nucléoside SRO91, trois peptides de fusion ont été sélectionnés en se basant sur la littérature. Ces séquences ont ensuite été synthétisées puis fonctionnalisées par différents motifs tels qu'un fluorophore ou la molécule antivirale, SRO91.

#### 1. La membrane biologique

##### 1.1. Composition générale

La membrane biologique est une barrière protectrice entre le milieu extracellulaire et intracellulaire contenant les différents organites. Cette séparation est non-seulement nécessaire pour protéger les éléments constitutifs de la cellule mais également pour assurer son bon fonctionnement (reconnaissance, adhésion, signalisation, *etc.*).<sup>139</sup>

La membrane biologique est constituée de différents éléments tels que des lipides de différentes sortes (phospholipides, sphingolipides, stérols et glycolipides) et des protéines remplissant de nombreuses fonctions (Figure 61). Les glycosides sont également présents dans la membrane biologique mais toujours sous la forme de conjugués avec des protéines (glycoprotéines) ou des lipides (glycolipides).

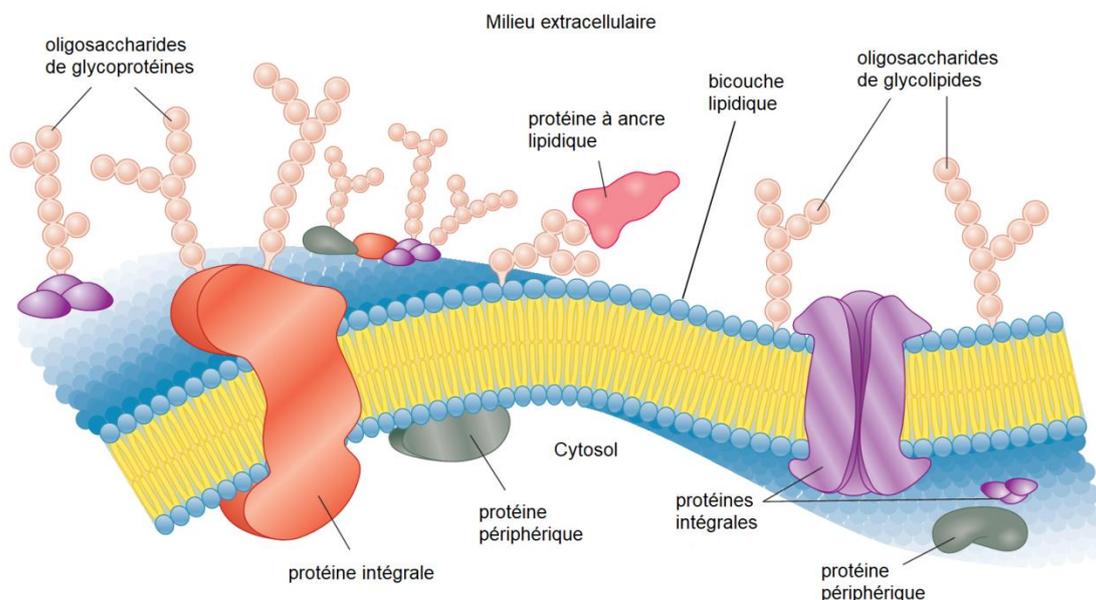


Figure 61 : Structure d'une membrane plasmique d'eucaryote<sup>139</sup>

<sup>139</sup> Moran, L. A.; Horton, H. R.; Scrimgeour, K. G.; Perry, M. D. In *Principles of Biochemistry*; Jaworski, A., Ed.; Pearson, 2011; pp 256–293.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Si tous les éléments constitutifs de la membrane remplissent un rôle indispensable pour assurer ses propriétés et sa stabilité, les glycérophospholipides sont responsables de sa construction. En effet, ces composés sont constitués d'un motif glycérol phosphorylé (« tête hydrophile ») et acylé par deux acides gras (« queue hydrophobe »), leur conférant un caractère amphiphile (Figure 62).

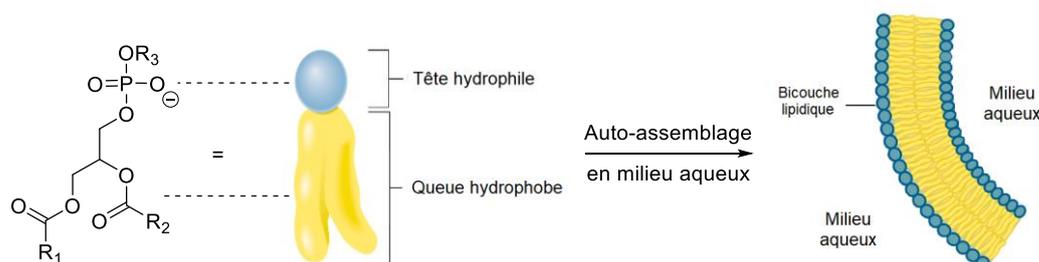


Figure 62 : Structure des glycérophospholipides et auto-assemblage<sup>139</sup>

En milieu aqueux, les glycérophospholipides sont capables de s'auto-assembler de manière à exposer leur tête hydrophile vers les molécules d'eau et d'en éloigner le plus possible leur queue hydrophobe. Ce processus, impliquant des interactions hydrophobes, permet ainsi de mettre en interaction les chaînes grasses des phospholipides de manière à créer une bicouche lipidique d'environ 5 à 6 nm d'épaisseur (Figure 62). Afin de minimiser le contact des queues hydrophobes avec des molécules d'eau, la bicouche s'oriente alors de manière à former une vésicule sphérique. Il existe de nombreux glycérophospholipides constitutifs des membranes biologiques qui diffèrent par la nature de leur tête hydrophile et de leur queue hydrophobe. En effet, le phosphate peut être fonctionnalisé par divers motifs comme la choline chargée positivement au pH physiologique donnant une tête hydrophile zwitterionique : la phosphatidylcholine (PC). La phosphatidyléthanolamine (PE) est un autre motif conférant un caractère zwitterionique aux glycérophospholipides du fait de la charge positive portée par l'amine et la charge négative du phosphate (Figure 63).

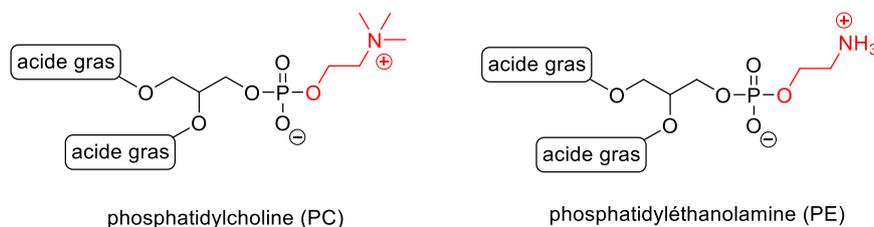


Figure 63 : Structure des glycérophospholipides zwitterioniques constitutifs de la membrane biologique

La tête hydrophile peut également être anionique comme le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylsérine (PS) le phosphatidylinositol (PI) et où la seule charge présente est la charge négative du phosphate (Figure 64).

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

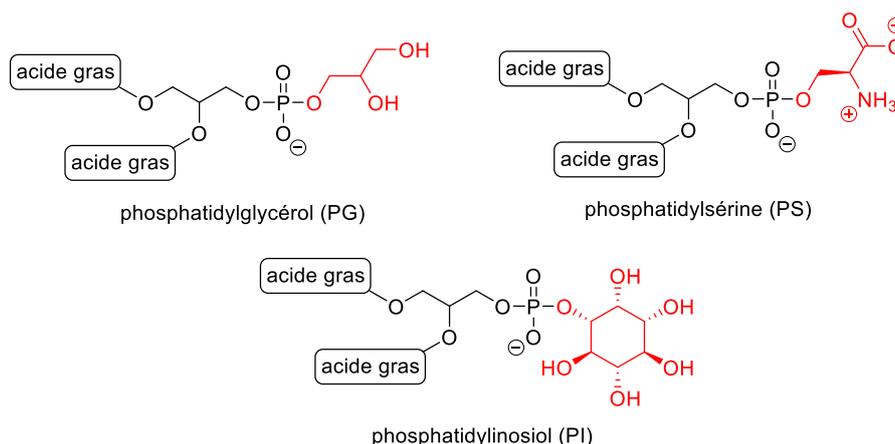


Figure 64 : Structure des glycérophospholipides anioniques constitutifs de la membrane biologique

Les différents acides gras liés au glycérol par un lien ester pour former les glycérophospholipides apportent énormément de diversité à la membrane. Par exemple, la membrane des érythrocytes contient au moins 21 espèces différentes de PC, constituées de divers acides gras estérifiés en position C<sub>1</sub> (R<sub>1</sub>) ou C<sub>2</sub> (R<sub>2</sub>) du glycérol. Ces chaînes très hydrophobes diffèrent par leur nombre d'atomes de carbone mais également par la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons C=C de configuration Z (Figure 65). Du fait des interactions hydrophobes entre les chaînes grasses des phospholipides, ces différences confèrent des propriétés particulières à la membrane. La dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) présente ainsi des interactions de Van der Waals relativement fortes entre les chaînes palmitoyles de deux lipides consécutifs. Cette propriété permet à une membrane constituée de DPPC d'adopter un comportement de type « gel » à température ambiante, à savoir une faible fluidité et peu de mouvement dans la membrane.<sup>140</sup> En revanche, la palmitoyloléoylphosphatidylcholine (POPC) présente une interaction bien moins importante entre une chaîne palmitoyle et une chaîne oléoyle, ce qui entraîne un comportement plus fluide à température ambiante.<sup>140</sup> De même, la présence d'une ou plusieurs doubles liaisons C=C de configuration Z influe fortement sur la conformation adoptée par le lipide dans la membrane, ce qui modifiera l'empilement des lipides et donc les propriétés de la bicouche lipidique.

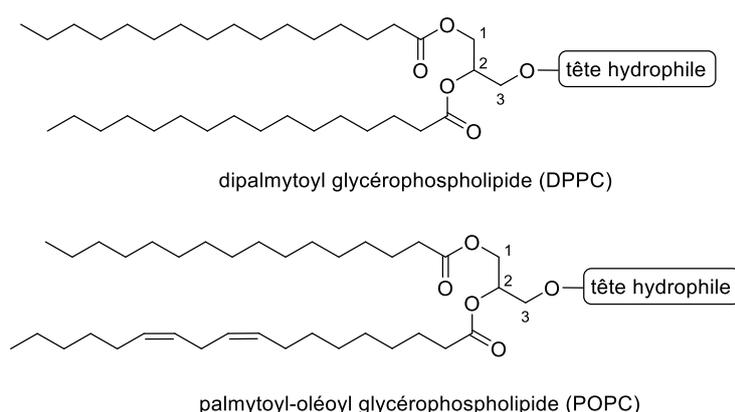


Figure 65 : Différentes structures de chaînes grasses constituant les glycérophospholipides

D'autres lipides composent la membrane et lui confèrent différentes propriétés (Figure 66). Par exemple, le cholestérol affaiblit les interactions de Van der Waals entre les chaînes grasses, empêchant ainsi le phénomène de ségrégation des lipides dans la membrane.<sup>140</sup> Il est ainsi un constituant majeur

<sup>140</sup> Goodman, S. R. In *Medical Cell Biology*; Goodman, S. R., Ed.; Elsevier, 2007; pp 27–57.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

de la membrane biologique qui permet de maintenir une certaine fluidité bien qu'il ne participe pas à l'auto-assemblage.

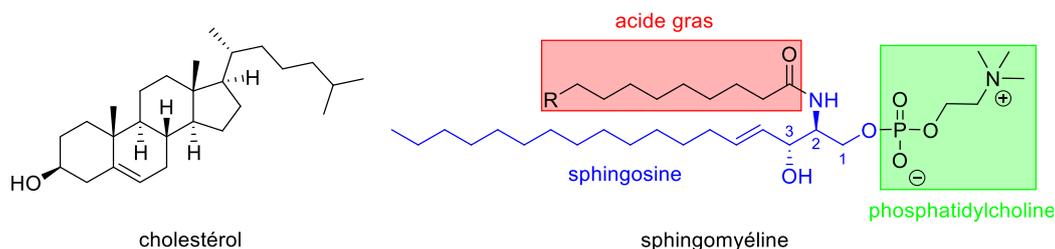


Figure 66 : Structures des autres lipides constitutifs de la membrane biologique

Les sphingomyélines (SM) sont d'autres constituants majeurs de la membrane biologique. Contrairement aux glycérophospholipides, les sphingomyélines ne sont pas formées à partir d'un motif glycérol mais d'une sphingosine, qui est acylée par un acide gras sur la fonction amine et phosphorylée sur la fonction alcool en position 1 (Figure 66). Les sphingomyélines et le cholestérol sont impliqués dans la formation de « radeaux lipidiques » dans la membrane cellulaire. Ces microdomaines sont enrichis en protéines membranaires et présentent une rigidité plus importante que le reste de la membrane. La diminution du taux de cholestérol et de sphingomyéline entraîne la « destruction » de ces domaines et une diminution des fonctions normales de la membrane.<sup>140</sup>

Enfin, les protéines constituent une part importante de la membrane biologique (entre 50 et 70 % en masse). Ces protéines membranaires, qui représentent environ 25 % des protéines cellulaires chez *E.coli*, sont classées en trois catégories et remplissent divers rôles dans le fonctionnement de la cellule (Figure 61).<sup>139</sup> On distingue ainsi les protéines intégrales ou protéines transmembranaires qui contiennent une ou plusieurs régions très hydrophobes s'insérant dans la bicouche lipidique, adoptant souvent une conformation en hélice  $\alpha$ . Ces protéines traversent la membrane biologique de manière à exposer une de ses extrémités sur la surface externe et l'autre sur la surface interne. Les protéines permettant la pénétration cellulaire, comme les transporteurs membranaires et canaux ioniques, sont des exemples de telles protéines. De même, certains récepteurs membranaires tels que les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGPRs), et les protéines d'adhésion cellulaire comme les intégrines ou les cadhérines, sont également classés dans la catégorie des protéines intégrales.

Les protéines périphériques sont une deuxième catégorie de protéines membranaires. Elles sont associées à une seule face de la membrane à travers des interactions électrostatiques ou liaisons hydrogène avec des protéines intégrales ou les têtes hydrophiles de lipides. Elles ont généralement pour fonction le soutien cellulaire ou la transmission de messages chimiques comme la protéine G.

Enfin, les protéines à ancrage lipidique sont attachées à la membrane grâce à une liaison covalente formée avec un lipide. Cette ancre lipidique peut être un acide gras, une chaîne isoprénique ou un glycosylphosphatidylinositol. Ces protéines sont particulièrement présentes dans les « radeaux lipidiques » formés par le cholestérol et les sphingolipides dans la membrane.

### 1.2. Les différentes membranes biologiques

Si les différentes membranes biologiques sont constituées des mêmes éléments de base, à savoir des lipides et des protéines, elles diffèrent selon leur composition et présentent plusieurs spécificités. Ainsi, les membranes biologiques bactériennes sont globalement plus riches en phospholipides

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

anioniques notamment les PS et PI que les membranes d'eucaryotes, et contiennent beaucoup moins de stérols (environ deux fois moins).<sup>141</sup>

Au sein d'une même espèce, on distingue également plusieurs compositions membranaires entre les différents tissus ou cellules. Les membranes cellulaires présentes dans le cerveau sont ainsi particulièrement riches en PS alors que les cellules du cœur ou des poumons possèdent des niveaux importants de PG et de SM.<sup>139</sup>

De même, les différentes membranes constitutives de la cellule présentent, elles-aussi, des caractéristiques particulières (Figure 67). Chez les mammifères, la membrane plasmique est particulièrement riche en cholestérol avec presque autant de cholestérol que de phospholipides. Cette membrane séparant le milieu intracellulaire de l'extracellulaire présente également un taux de SM plus important (environ 30 %) que le reste des éléments constitutifs de la cellule (réticulum endoplasmique, mitochondrie, Golgi ou encore les endosomes).<sup>141</sup>

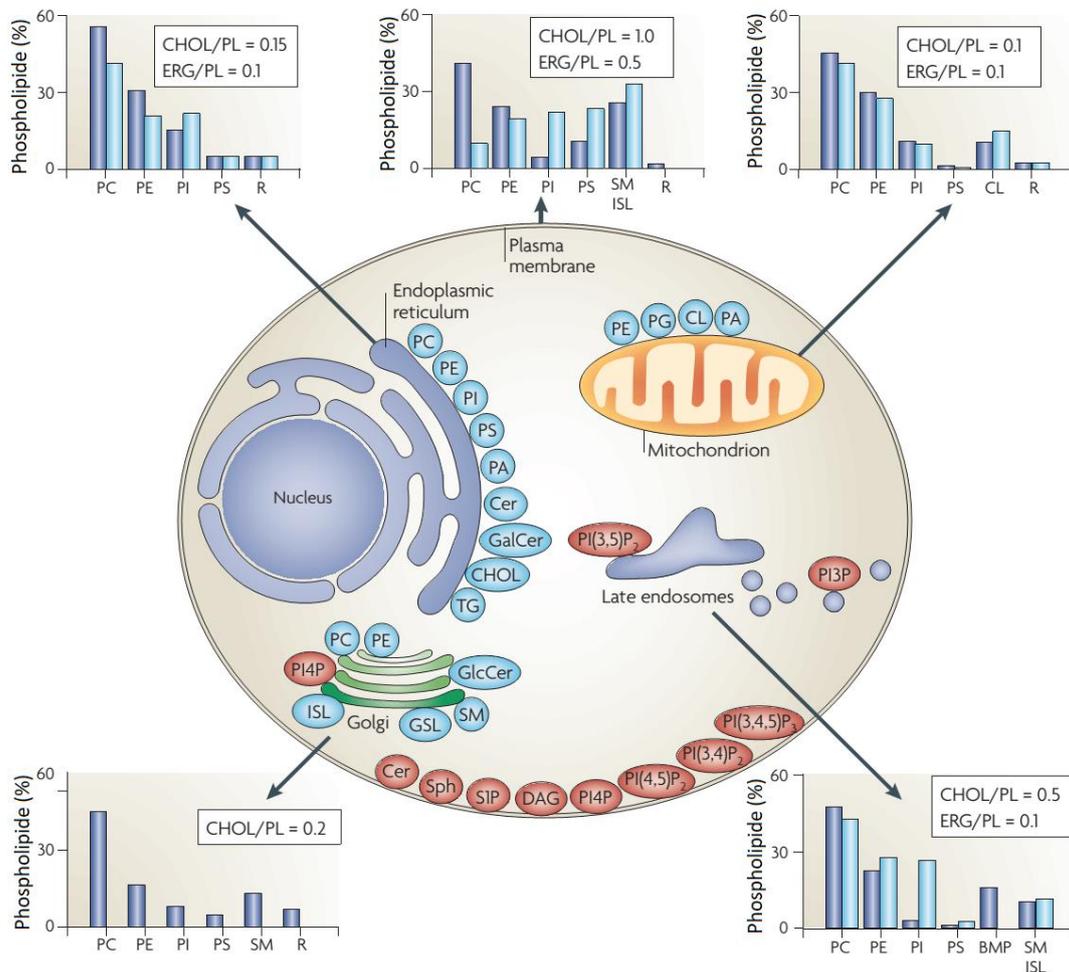


Figure 67 : Compositions lipidiques des différentes membranes cellulaires<sup>141</sup>

La composition lipidique des différentes membranes est exprimé en pourcentage des phospholipides (PL) pour les mammifères (bleu) et les levures (bleu clair). Le niveau de stérols est exprimé par le ratio de cholestérol (CHOL) pour les mammifères et d'ergostérol (ERG) pour les levures.

PC = phosphatidylcholine ; PE = phosphatidyléthanolamine ; PI = phosphatidylinositol ; PS = phosphatidylsérine ; PA = acide phosphatidique ; SM = sphingomyéline ; CL = cardiolipine ; BMP = bis(monoacylglycéro)phosphate ; PG = phosphatidylinositol

<sup>141</sup> van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9 (2), 112–124.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Les cardiolipines (CL) sont des bisphospholipides uniquement présents dans la membrane interne des mitochondries et qui en constituent environ 20 % (Figure 68). Les CL sont supposées fonctionner comme des « pièges à protons » nécessaires à l'activité énergétique de la mitochondrie.

De même, si la composition des endosomes précoces est très similaire à celle de la membrane plasmique, leur maturation en endosomes tardifs entraîne une diminution du taux de stérols et de PS et une augmentation drastique de bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP, Figure 68).<sup>142</sup> Le BMP participe au mécanisme de formation de vésicules, au processus de fusion et à l'hydrolyse des sphingolipides.<sup>143</sup>

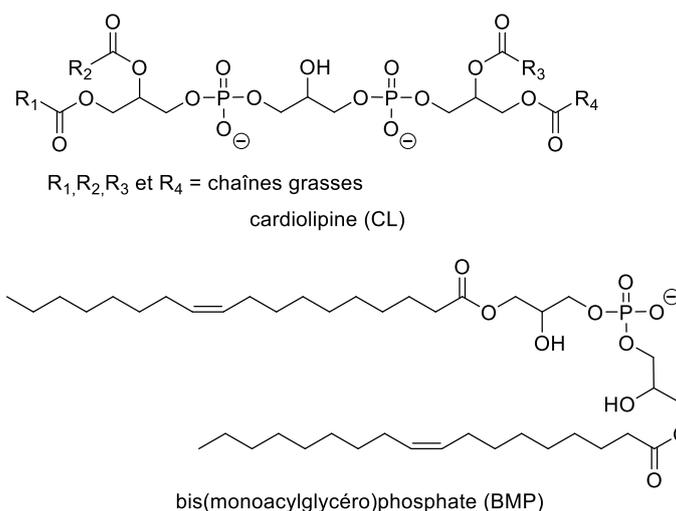


Figure 68 : Structure des cardiolipines (CL) et du bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP)

Enfin, les compositions lipidiques des deux feuilletts de la membrane sont diverses. En effet, outre les glycoprotéines et glycolipides uniquement présents sur le feuillet externe, la répartition des phospholipides au sein d'une même membrane est différente. Les sphingolipides comme les sphingomyélines sont ainsi plus présents (jusqu'à 90 %) dans le feuillet externe de la membrane alors que les phospholipides anioniques se trouvent principalement (PG) voire exclusivement (PS) dans la membrane intracellulaire de nombreuses cellules.

### 1.3. La pénétration membranaire

La membrane biologique, et particulièrement la membrane plasmique, est ainsi une séparation de nature hydrophobe entre deux compartiments aqueux. Cette barrière permet ainsi de protéger les constituants cellulaires, mais elle est également capable de transmettre certains composés nécessaires à l'activité cellulaire, par différents transports.

De petites molécules neutres comme le dioxyde de carbone, le dioxygène, l'éthanol ou le glycérol, sont ainsi capables de traverser la membrane plasmique par simple diffusion. Ce phénomène vient du fait qu'un composé en solution a tendance à se déplacer des zones de plus fortes concentrations vers les zones de plus faibles concentrations. La diffusion d'un tel composé est dépendante de la taille de la vésicule formée par la membrane, mais également de son coefficient de partage entre le milieu aqueux et l'environnement hydrophobe constitué par la bicouche lipidique.<sup>140</sup>

<sup>142</sup> Kobayashi, T.; Beuchat, M.-H.; Chevallier, J.; Makino, A.; Mayran, N.; Escola, J.-M.; Lebrand, C.; Cosson, P.; Kobayashi, T.; Gruenberg, J. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (35), 32157–32164.

<sup>143</sup> Matsuo, H.; Chevallier, J.; Mayran, N.; Le Blanc, I.; Ferguson, C.; Fauré, J.; Blanc, N. S.; Matile, S.; Dubochet, J.; Sadoul, R.; Parton, R. G.; Vilbois, F.; Gruenberg, J. *Science* **2004**, 303 (5657), 531–534.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Néanmoins, certaines molécules, du fait de leur hydrophilie ou de leur taille, ne possèdent pas un coefficient de partage suffisant pour permettre une pénétration cellulaire efficace par simple diffusion. Ces molécules pénètrent alors grâce à un processus nommé diffusion facilitée, par l'action de protéines membranaires appelées transporteurs ou perméase. Le glucose, par exemple, est un composé essentiel pour le développement cellulaire. Cette molécule étant trop hydrophile et de taille trop importante pour pénétrer dans les cellules, son transport est réalisé par un transporteur du glucose. L'association du glucose avec la partie extracellulaire de cette protéine membranaire entraîne un changement conformationnel permettant la pénétration de la molécule. Une fois le passage effectué, le transporteur retrouve sa conformation initiale (Figure 69).<sup>139</sup>

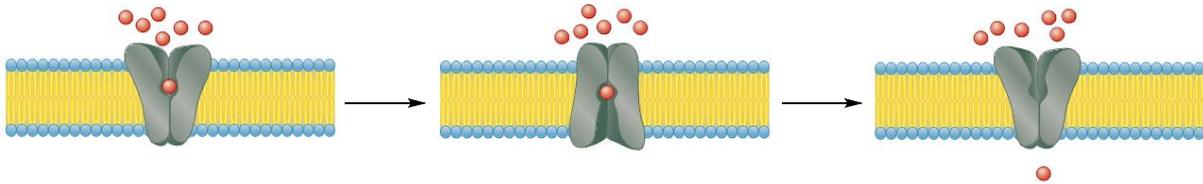


Figure 69 : Mécanisme de pénétration cellulaire par les transporteurs<sup>139</sup>

Le transport membranaire par simple diffusion ou par l'action des transporteurs est classé dans la catégorie des transports passifs, c'est-à-dire qui peuvent se réaliser sans apport énergétique particulier. Ils diffèrent ainsi des transports dits actifs, qui eux consomment de l'énergie, généralement par l'action d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP), de la lumière ou par un gradient en concentration ionique. Ce transport est également basé sur l'utilisation de protéines membranaires et est divisé en trois types de transport actif, qui diffèrent par le nombre et le sens du transport des molécules (Figure 70). On distingue ainsi le transport actif de type uniport qui correspond au passage d'une seule molécule à travers la membrane. Le transport de type symport implique le passage de deux molécules dans le même sens de diffusion, alors que le transport de type antiport correspond à un transport de deux molécules dans des sens opposés.

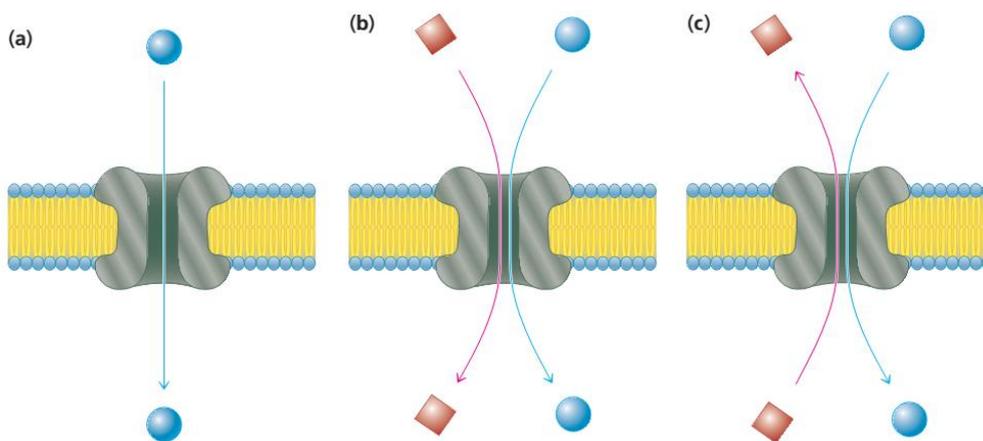


Figure 70 : Différents types de transports actifs :<sup>139</sup> uniport (a), symport (b) et antiport (c)

Les membres les plus importants de la famille des transports actifs sont certainement les ATPases. Ces protéines membranaires permettent, grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (transport actif primaire), de transporter des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane. Les gradients en concentration de ces ions, notamment les ions  $\text{Na}^+$ , permettent ensuite à d'autres molécules de pénétrer dans la cellule par l'action des transports actifs secondaires.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

La Na/K-ATPase est ainsi capable de faire traverser les ions  $\text{Na}^+$  dans le sens inverse de son gradient de concentration grâce à un antiport avec l'ion  $\text{K}^+$  et l'hydrolyse de l'ATP en ADP (Figure 71). La partie extracellulaire de la Na/K-ATPase possède des sites d'interaction pour deux ions  $\text{K}^+$  et sa partie intracellulaire des sites d'interaction pour trois ions  $\text{Na}^+$ . La phosphorylation de la région intracellulaire par l'ATP va entraîner un changement conformationnel de la protéine, la transformant d'une forme capable de transporter les ions  $\text{K}^+$  en une forme capable de transporter les ions  $\text{Na}^+$ . L'interaction d'ions  $\text{K}^+$  avec la partie extracellulaire permet ensuite l'hydrolyse du phosphate et le retour de la protéine dans sa conformation d'origine, transportant préférentiellement les ions  $\text{K}^+$ .<sup>140</sup>

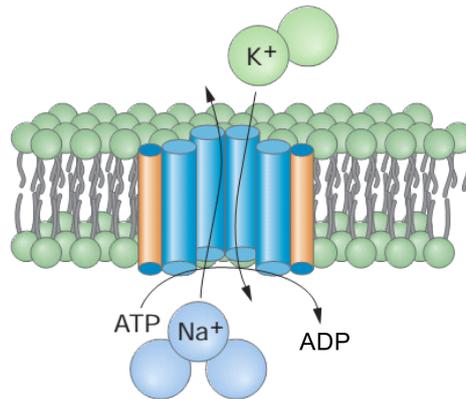


Figure 71 : Fonctionnement de la Na/K-ATPase<sup>140</sup>

La Na/K-ATPase est également la source d'énergie principale permettant le transport actif secondaire. Ainsi, dans les cellules intestinales, le transport des ions  $\text{Na}^+$  dans le sens inverse de leur gradient de concentration permet de fournir l'énergie nécessaire au transport du glucose afin de rétablir le niveau d'ions  $\text{Na}^+$  dans le milieu intracellulaire à l'aide d'un symport.<sup>139</sup>

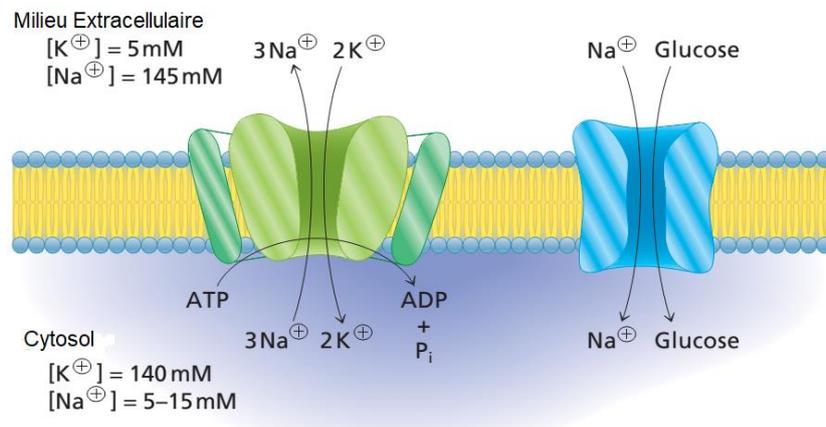


Figure 72 : Fonctionnement du transport actif du glucose dans les cellules intestinales<sup>139</sup>

Les canaux ioniques ou récepteurs ionotropes sont également des protéines membranaires capables de transporter efficacement des ions à travers la membrane plasmique. Ces transporteurs forment des canaux ou pores à travers la membrane dont l'environnement aqueux permet le passage de composés selon un gradient de concentration et le potentiel électrique de la membrane dans le cas des ions. Ces protéines possèdent généralement plusieurs domaines transmembranaires qui s'organisent de manière à exposer les résidus hydrophiles vers le canal aqueux et les résidus hydrophobes vers la bicouche lipidique. Les canaux ioniques existent sous au moins deux conformations : une forme « ouverte » stable mais éphémère et une forme « fermée » très stable.<sup>140</sup> Différents stimuli contrôlent l'ouverture et

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

la fermeture des canaux comme des signaux électriques, des déformations cellulaires ou encore des interactions avec des ligands.

Ainsi, le récepteur à l'acétylcholine est un récepteur ionotrope permettant le transport de petits cations uniquement ( $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Ca^{2+}$ ). L'association de deux acétylcholines avec la partie extracellulaire de la protéine induit un changement de conformation qui « ouvre » brièvement (environ 1 ms) le canal ionique et permet le passage des cations selon leur gradient de concentration et le potentiel électrique. Une fois le canal refermé, l'acétylcholine se dissocie de la protéine qui retourne dans sa conformation « fermée » d'origine (Figure 73).<sup>140</sup>

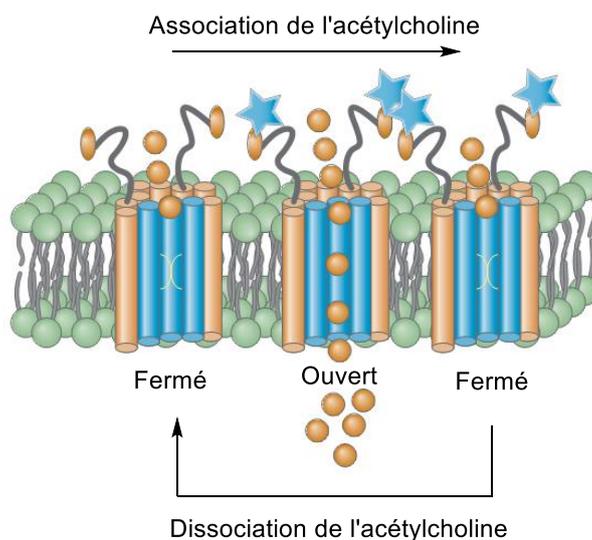


Figure 73 : Fonctionnement du récepteur ionotrope de l'acétylcholine<sup>140</sup>

Enfin, l'endocytose est une des voies privilégiées pour la pénétration cellulaire ou la dégradation de nombreux composés impliqués dans des processus physiologiques. Il existe plusieurs types d'endocytose, certains étant spécifiques à un type de cellules ou à un tissu, mais tous correspondent à la formation de vésicules intracellulaires à partir de la membrane plasmique et permettent l'internalisation de molécules présentes dans le milieu extracellulaire. On distingue ainsi la phagocytose qui correspond à la formation actine-dépendante de vésicules larges ( $> 1 \mu m$ ) par les macrophages et les neutrophiles et qui est principalement utilisée pour éliminer des particules de taille importante comme des bactéries. Les autres types d'endocytose sont divisés en deux grandes catégories suivant l'implication ou non de la clathrine, une protéine d'enveloppe : les endocytoses clathrine-dépendantes et les endocytoses clathrine-indépendantes. La macropinocytose est une endocytose clathrine-indépendante durant laquelle la membrane plasmique s'étend jusqu'à fusionner de manière à englober un volume de liquide extracellulaire dans une vésicule. Ce type d'endocytose n'est pas spécifique de certains composés (saccharides, peptides, etc) mais plutôt d'un milieu. Certaines endocytoses clathrine-indépendantes ont également lieu autour des « radeaux lipidiques » formés dans les sites de la membrane riches en cholestérol et en sphingomyéline.

L'endocytose est un évènement très fréquent dans la membrane cellulaire puisque chez les mammifères, environ la moitié de la membrane plasmique est internalisée chaque heure, grâce à la formation de vésicules clathrine-dépendante dans la plupart des cas. Lors de la formation de ces vésicules, les composés extracellulaires sont internalisés sous deux formes : en tant que composé soluble (pinocytose) ou lié à un récepteur présent au site d'endocytose (endocytose à récepteur).<sup>140</sup> Les endocytoses à récepteurs sont beaucoup plus efficaces puisque les composés à internaliser sont « concentrés » autour de la membrane grâce à l'interaction avec les récepteurs.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

L'internalisation d'un composé par endocytose à récepteur est un processus effectué en plusieurs étapes (Figure 74). Après interaction entre le composé extracellulaire, aussi appelé ligand, et un récepteur membranaire, une protéine appelée AP-2 (pour *adaptator protein 2*) va se fixer sur la partie intracellulaire du récepteur. Dans un deuxième temps, la protéine d'enveloppe clathrine va se lier à la AP-2 préalablement installée sur le récepteur. Les récepteurs s'associent alors entre eux pour former des puits recouverts de clathrine, où la membrane plasmique va commencer à se déformer. Il est important de noter que tous les récepteurs ne se comportent pas de manière identique à cette étape. En effet, certains récepteurs sont constamment associés au niveau des puits recouverts de clathrine alors que d'autres ne vont s'agréger qu'une fois l'interaction ligand/récepteur effectuée. La déformation de la membrane plasmique va alors entraîner la formation d'une vésicule d'endocytose recouverte de clathrine, présentant la partie « extracellulaire » du récepteur associée au ligand dans le milieu intravésiculaire. La clathrine et AP-2 se dissocient alors des récepteurs pour donner des vésicules non-enveloppées qui vont fusionner soit entre elles pour donner un endosome précoce, soit directement avec un endosome précoce déjà formé. Le milieu intravésiculaire des endosomes précoces est légèrement acide du fait de la présence des ATPases permettant le transport de protons du cytosol vers l'endosome. Cette acidité permet généralement de dissocier le complexe ligand/récepteur libérant le composé dans l'endosome alors que le récepteur reste logé dans la membrane. Cette étape est primordiale puisque de nombreux récepteurs membranaires entraînant une endocytose sont ainsi recyclés vers la membrane plasmique, où ils pourront, à nouveau, initier une internalisation.

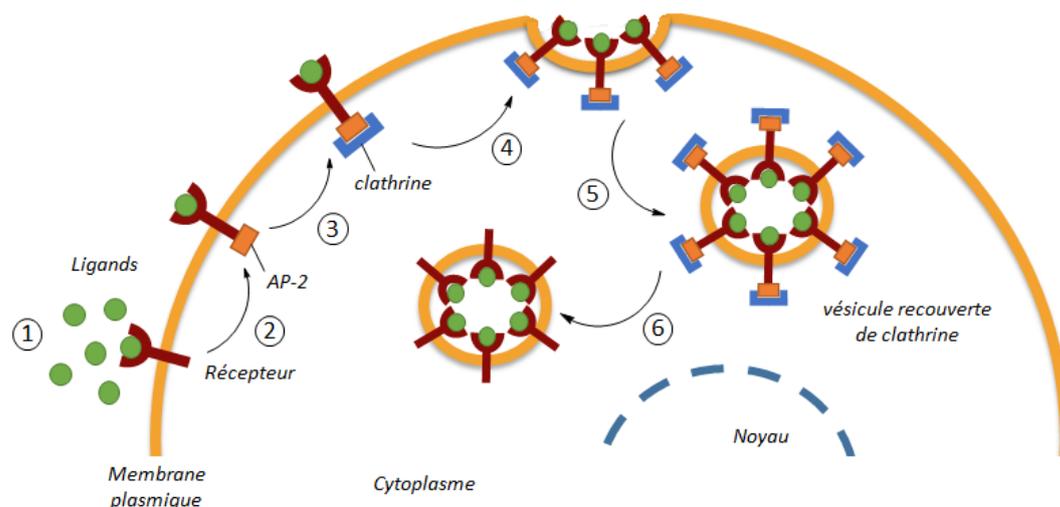


Figure 74 : Processus d'internalisation d'un composé par endocytose à récepteur

(1) Interaction ligand/récepteur ; (2) Association de la protéine AP-2 au récepteur ; (3) Association de la clathrine à la AP-2 ; (4) Formation de puits recouverts de clathrine ; (5) Invagination de la membrane et formation de vésicules recouvertes de clathrine ; (6) Dissociation de la clathrine et AP-2 suivie de la fusion des vésicules entre elles ou avec un endosome précoce

### 2. Les peptides membranotropes

L'une des plus grandes limitations de la chimie thérapeutique est la faible capacité de certains composés (petites molécules hydrophiles, peptides, protéines, oligonucléotides, *etc.*) à traverser la membrane plasmique afin d'atteindre leur cible. Différentes stratégies ont été mises en place afin d'améliorer la délivrance intracellulaire de ces composés. Il est ainsi possible d'utiliser des prodrogues en conjuguant la molécule d'intérêt avec des motifs reconnus par les transporteurs. Certaines prodrogues glucosylées profitent ainsi du transporteur Glut-1 pour traverser la membrane

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

plasmique.<sup>144,145</sup> Une autre stratégie consiste à utiliser la pénétration cellulaire par endocytose de type phagocytose, pinocytose ou à récepteur. L'inconvénient de cette stratégie est que le composé d'intérêt risque d'être « bloqué » dans les endosomes et donc de ne pas atteindre sa cible qui est généralement intracellulaire, voire intranucléaire. C'est pourquoi certains composés ont été développés afin d'assurer la déstabilisation de la membrane due à leur protonation au pH acide de l'endosome, entraînant alors la libération du composé thérapeutique de l'endosome. Ainsi, la chloroquine est une molécule qui a beaucoup été utilisée dans des stratégies de vectorisation (Figure 75).<sup>146</sup> Ce composé d'abord développé comme agent antipaludique, est capable de se protoner dans le milieu acide de l'endosome. Ceci prévient la dégradation enzymatique du principe actif mais déstabilise également la membrane endosomale et entraîne sa libération dans le cytosol.

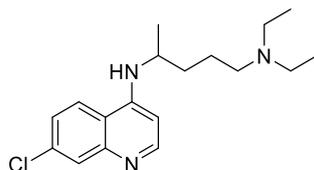


Figure 75 : Structure de la chloroquine

Depuis une trentaine d'années, de nombreux peptides sont développés pour leur activité membranaire. Ces séquences sont capables d'interagir avec certains constituants de la membrane plasmique et de permettre la pénétration cellulaire. Bien que ces séquences soient nombreuses, leur mécanisme est encore discuté aujourd'hui et plusieurs comportements peuvent être observés : pénétration par endocytose, formation de pores, translocation directe, etc (Figure 76). Certaines séquences possèdent des résidus sensibles au pH acide de l'endosome et ne deviennent membranotropes que dans ces conditions. Cette propriété en fait d'excellents candidats pour favoriser le relargage de composés des endosomes vers le cytosol.

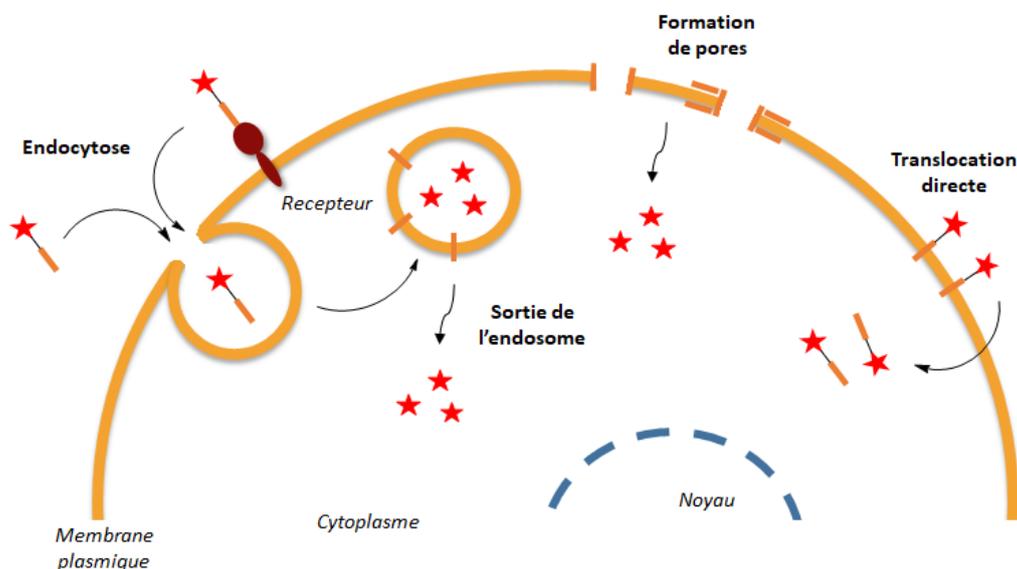


Figure 76 : Mécanismes de pénétration cellulaire des peptides membranotropes

<sup>144</sup> Scherrmann, J.-M.; Svensson, C. K.; Rautio, J.; Laine, K.; Gynther, M.; Savolainen, J. *AAPS J.* **2008**, *10*, 92–102.

<sup>145</sup> Fernández, C.; Nieto, O.; Fontenla, J. A.; Rivas, E.; de Ceballos, M. L.; Fernández-Mayoralas, A. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (5), 767–771.

<sup>146</sup> Tietz, P. S.; Yamazaki, K.; LaRusso, N. F. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40* (6), 1419–1421.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

### 2.1. Peptides de pénétration cellulaire (CPPs)

Les peptides de pénétration cellulaire (CPPs pour *cell-penetrating peptides*) sont de courtes séquences (environ 15-30 résidus) de nature cationique ou amphipathique (Tableau 5).<sup>147,148</sup> Ces peptides sont aussi appelés PTDs pour *protein-transduction domains* du fait de leur découverte découlant de l'observation que certaines protéines, principalement des facteurs de transcription (des protéines capables d'initier ou de réguler la transcription d'un gène), étaient capables de traverser les membranes cellulaires. Les CPPs ou PTDs sont depuis très étudiés et utilisés pour délivrer des composés thérapeutiques qui ne sont normalement pas capables de traverser efficacement la membrane plasmique comme des nucléosides, des peptides, des protéines ou encore des oligonucléotides.<sup>149</sup>

Peptides	Origine	Séquence
Peptides dérivés de PTDs		
Tat(47-57)	Protéine VIH-Tat	YGRKKRRQRRPPQ
Pénétratine	Homéodomaine Antennapedia	RQIKIWFQNRRMKWKK
Transportane	Galanine-mastoparane	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKI
VP-22	Protéine structurale HSV-1	DAATATRGRSAASRPTEPRAPAR-SASRPRRPVD
Peptides amphipathiques		
MPG	VIH gp41-SV40 NLS	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV
Pep-1	Motif riche en Trp-SV40 NLS	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV
MAP	Synthétique	KALAKALAKALA
SAP	Motif riche en Pro	VRLPPPVRLLPPPVRLLPP
PPTG1	Chimérique	GLFRALLRLLRSLWRLLLR
RL <sub>9</sub>	Synthétique	RRWWRRWRR
RW <sub>9</sub>	Synthétique	RLLRRLRR
Peptides cationiques		
Oligoarginine	Synthétique	R <sub>8</sub> ou R <sub>9</sub>
hCT (9-32)	Calcitonine humaine	LGTYTQDFNKTFFPQTAIGVGA
SynB	Protéoglycane	RGGRLSYSRRRFSTSTG
pVEC	VE murine-cadhérine	LLIILRRRIRKQAHASK
CADY	Synthétique	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA

Tableau 5 : Exemples des principaux CPPs<sup>149</sup>

La première observation de pénétration cellulaire des PTDs a été réalisée par Frankel et Pabo en 1988 qui ont montré que la protéine Tat (pour *trans-activator of transcription*) du virus VIH-1 était capable

<sup>147</sup> Komin, A.; Russell, L. M.; Hristova, K. A.; Searson, P. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *110–111*, 52–64.

<sup>148</sup> Bechara, C.; Sagan, S. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1693–1702.

<sup>149</sup> Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195–206.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

de traverser la membrane cellulaire et de pénétrer dans le noyau.<sup>150</sup> En 1998, l'équipe de Lebleu a identifié la séquence peptidique minimale de Tat nécessaire à la pénétration cellulaire, correspondant aux résidus 47 à 57 (YGRKKRRQRRR).<sup>151</sup> De nombreuses études ont ensuite montré le potentiel de la séquence VIH-Tat(47-57) comme agent de pénétration cellulaire en réalisant des conjugués avec des molécules d'intérêt thérapeutique comme des protéines, peptides et siRNA.<sup>152,153</sup>

En 1991, l'équipe de Prochiantz a montré que l'homéodomaine du *Drosophila Antennapedia* était internalisé par les cellules neuronales.<sup>154</sup> Cette découverte a ensuite permis d'identifier le premier CPP en 1994 : un 16-mer dérivé de l'hélice tertiaire de l'homéodomaine appelé pénétratine (RQIKIYFQNRMKWKK).<sup>155</sup> Tout comme le Tat, la pénétratine a été appliquée à divers cargo (peptides, siRNA, liposomes) pour ses propriétés de pénétration cellulaire.<sup>156</sup>

Un autre CPP issu d'un PTD est le transportane (GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKI). Ce peptide dérivé du fragment *N*-terminal du neuropeptide galanine, a permis, en association avec le peptide mastoparane du venin de guêpe, de réaliser les premières avancées dans l'utilisation de CPPs pour la délivrance *in vivo* de peptides, protéines<sup>152</sup> et d'acides nucléiques peptidiques (PNA pour *peptide-nucleic acids*).<sup>157</sup>

En plus des CPPs dérivés de séquences naturelles de PTDs, certaines séquences synthétiques montrant un caractère amphipathique se sont révélées capables de traverser la membrane plasmique. Ces peptides synthétiques ou chimériques comportent une région très hydrophobe et une partie cationique, généralement composée de résidus arginine ou lysine. Les peptides MPG<sup>158</sup> et Pep-1<sup>159</sup> ont ainsi été utilisés par Heitz et Divita pour réaliser les premiers conjugués non covalents pour la délivrance de peptides et de protéines. MPG et Pep-1 sont des peptides amphipathiques constitués de séquences conjuguées. La première est un motif riche en résidus lysine dérivés du signal de localisation nucléaire (*NLS pour nuclear localization sequence*) de l'antigène T de la protéine SV40 (KKKRKV). La seconde correspond à la partie hydrophobe *N*-terminale (peptide de fusion) de la protéine gp41 du VIH (GALFLGFLGAAGSTMGA) pour MPG, et à une séquence riche en résidus tryptophane (KETWWETWTEW) pour Pep-1.

Considérant la présence de résidus cationiques dans les CPPs découverts grâce aux PTDs, un certain nombre de séquences polycationiques ont été développées. Les oligoarginines, R<sub>8</sub> ou R<sub>9</sub>, ont ainsi été étudiées par Wender et Futaki.<sup>160,161</sup> Ces groupes ont mis en évidence la capacité de ces séquences à délivrer des composés dans le milieu intracellulaire et ont proposé l'hypothèse d'un mécanisme impliquant des liaisons hydrogène entre les groupements guanidinium des résidus arginine et les

<sup>150</sup> Frankel, A. D.; Pabo, C. O.; Paskalis, H.; Pavlakis, G. N.; Popovic, M.; Arya, S.; Gallo, R. C.; Haseltine, W. A.; Debouck, C.; Gallo, R. C.; Wong-Staal, F. *Cell* **1988**, 55 (6), 1189–1193.

<sup>151</sup> Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (25), 16010–16017.

<sup>152</sup> Schwarze, S. R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S. F. *Science* **1999**, 285, 1569–1572.

<sup>153</sup> Snyder, E. L.; Dowdy, S. F. *Expert Opin. on Drug Delivery* **2005**, 2 (1), 43–51.

<sup>154</sup> Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 1864–1868.

<sup>155</sup> Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269 (14), 10444–10450.

<sup>156</sup> Joliot, A.; Prochiantz, A. *Nat. Cell Biol.* **2004**, 6 (3), 189–196.

<sup>157</sup> Pooga, M.; Soomets, U.; Hällbrink, M.; Valkna, A.; Saar, K.; Rezaei, K.; Kahl, U.; Hao, J.-X.; Xu, X.-J.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Hökfelt, T.; Bartfai, T.; Langel, Ü. *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16 (9), 857–861.

<sup>158</sup> Morris, M. C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F.; Divita, G. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25 (14), 2730–2736.

<sup>159</sup> Morris, M. C.; Depollier, J.; Mery, J.; Heitz, F.; Divita, G. *Nat. Biotechnol.* **2001**, 19 (12), 1173–1176.

<sup>160</sup> Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (24), 13003–13008.

<sup>161</sup> Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (8), 5836–5840.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

groupements phosphate des phospholipides constitutifs de la membrane. Sur le même principe, des séquences amphipathiques ont été étudiées, comportant des résidus leucine (RL<sub>9</sub>, RLLRRLRR) ou des résidus tryptophane (RW<sub>9</sub>, RRWRRWRR).<sup>162</sup> Si les peptides R<sub>9</sub> et RW<sub>9</sub> se sont montrés capables de pénétrer dans des cellules cancéreuses (CHO pour *Chinese Hamster Ovarian cells*) à 4°C et 37°C, RL<sub>9</sub> n'a pas été internalisé dans ces mêmes conditions.<sup>163</sup> Par ailleurs, une étude a montré l'importance des résidus tryptophane pour la pénétration cellulaire puisque leur remplacement par des résidus phénylalanine a diminué grandement leur internalisation.<sup>164</sup>

Encore aujourd'hui, le mécanisme de pénétration cellulaire des CPPs n'est pas complètement connu. Ce constat est principalement dû à l'existence de plusieurs observations contradictoires selon la nature du CPP (amphipathique, cationique), le potentiel cargo qu'il délivre, la composition de la membrane cellulaire ou du modèle utilisé, ainsi que la concentration en peptide. Bien qu'il reste difficile d'établir un mécanisme d'action global, il est généralement admis que ces séquences présentant une région chargée positivement, de par leur structure primaire ou leur structure secondaire, entrent initialement en contact avec les glycosaminoglycanes (GAGs) chargés négativement, principalement les sulfates d'héparane (HS) ce qui constitue une première approche entraînant l'accumulation de peptide au contact de la membrane cellulaire.<sup>165,166</sup> De nombreuses études font alors état d'une internalisation des CPPs cationiques par divers types d'endocytose : macropinocytose,<sup>167,168</sup> endocytoses clathrine- ou cavéoline-dépendantes.<sup>169,170</sup>

Les modes d'action des CPPs sont néanmoins multiples. En effet, leurs interactions avec les phospholipides de la membrane et leur tendance à adopter une structure secondaire au contact de celle-ci, leur permet d'en modifier l'intégrité. Ils sont ainsi capables de pénétrer directement dans le cytosol, non pas par endocytose mais par translocation directe, s'effectuant par déstabilisation de la membrane (pores transitoires) ou par formation de micelles inverses dans la bicouche lipidique.<sup>171</sup>

Ce comportement est fortement dépendant de la concentration en peptide aux abords de la membrane. En effet, il a été montré que, à forte concentration, la pénétatine était capable de traverser la membrane plasmique à la fois par endocytose et par translocation directe. En revanche, seule l'internalisation par translocation directe est observée à faible concentration.<sup>172</sup> Si l'internalisation à forte concentration semble liée à une endocytose suite à l'accumulation du peptide aux abords de la membrane cellulaire par interaction avec les GAGs, cette observation permet d'expliquer la pénétration cellulaire des CPPs même à faible concentration et à basse température.<sup>173</sup>

<sup>162</sup> Walrant, A.; Correia, I.; Jiao, C.; Lequin, O.; Bent, E. H.; Goasdoué, N.; Lacombe, C.; Chassaing, G.; Sagan, S.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808* (1), 382–393.

<sup>163</sup> Burlina, F.; Sagan, S.; Bolbach, G.; Chassaing, G. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44* (27), 4244–4247.

<sup>164</sup> Jobin, M. L.; Blanchet, M.; Henry, S.; Chaignepain, S.; Manigand, C.; Castano, S.; Lecomte, S.; Burlina, F.; Sagan, S.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2015**, *1848* (2), 593–602.

<sup>165</sup> Ziegler, A.; Seelig, J. *Biophys. J.* **2008**, *94* (6), 2142–2149.

<sup>166</sup> Ziegler, A.; Seelig, J. *Biochemistry* **2011**, *50* (21), 4650–4664.

<sup>167</sup> Wadia, J. S.; Stan, R. V.; Dowdy, S. F. *Nat. Med.* **2004**, *10* (3), 310–315.

<sup>168</sup> Kaplan, I. M.; Wadia, J. S.; Dowdy, S. F. *J. Control. Release* **2005**, *102* (1), 247–253.

<sup>169</sup> Richard, J. P.; Melikov, K.; Brooks, H.; Prevot, P.; Lebleu, B.; Chernomordik, L. V. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (15), 15300–15306.

<sup>170</sup> Ziegler, A.; Nervi, P.; Dürrenberger, M.; Seelig, J. *Biochemistry* **2005**, *44* (1), 138–148.

<sup>171</sup> Di Pisa, M.; Chassaing, G.; Swiecicki, J. M. *Biochemistry* **2015**, *54* (2), 194–207.

<sup>172</sup> Jiao, C. Y.; Delaroche, D.; Burlina, F.; Alves, I. D.; Chassaing, G.; Sagan, S. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (49), 33957–33965.

<sup>173</sup> Alves, I. D.; Jiao, C. Y.; Aubry, S.; Aussedat, B.; Burlina, F.; Chassaing, G.; Sagan, S. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798* (12), 2231–2239.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Des études de plusieurs CPPs (Tat, RW<sub>9</sub> et R<sub>9</sub>) sur des liposomes de type vésicules larges unilamellaires (LUVs pour *large unilamellar vesicles*) ont montré que ces séquences cationiques sont capables de s'internaliser dans le milieu intravésiculaire de LUVs de DOPG.<sup>174</sup> Les auteurs ont par ailleurs montré que cette internalisation pouvait être corrélée à la propension des lipides du feuillet externe à migrer vers le feuillet interne. Ce mouvement, aussi appelé *flip-flop*, est naturellement possible dans la membrane plasmique mais nécessite la présence de protéines membranaires pour s'effectuer. Même si les phospholipides anioniques (PG, PI, PS) sont plus présents dans le feuillet interne de la membrane plasmique et puisque les peptides sont capables de recruter les lipides lors de l'interaction,<sup>175,176</sup> cette étude permet d'envisager un mécanisme de translocation directe par micelles inverses, totalement indépendant de l'endocytose (Figure 77).

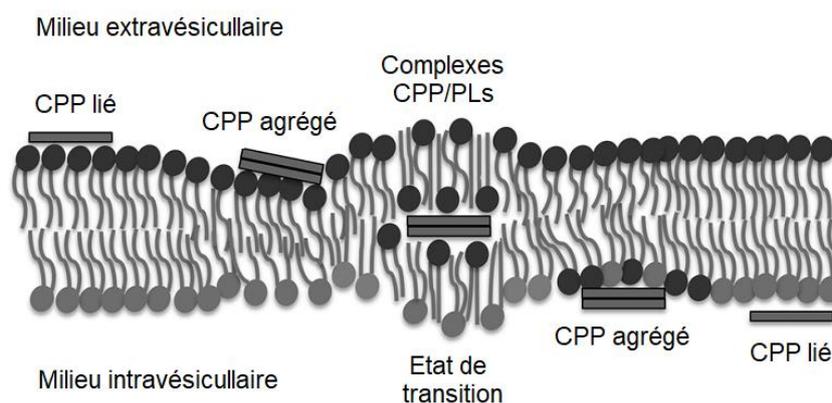


Figure 77 : Mécanisme de pénétration des CPPs par micelles inverses<sup>174</sup>

Ainsi, les petites séquences cationiques ou amphipathiques appelées CPPs sont capables de traverser la membrane plasmique afin de délivrer une molécule d'intérêt dans le milieu intracellulaire. Leur mécanisme d'action, par endocytose ou translocation directe, reste mal connu mais semble dépendre fortement de la nature de la séquence, de la nature du cargo, du type de cellule étudiée ainsi que de la concentration en peptide près de la membrane. Si cette activité en tant qu'agents de pénétration cellulaire fait des CPPs des outils intéressants pour la vectorisation, leur principal défaut reste leur faible stabilité plasmatique et leur manque de sélectivité quant aux cellules affectées, faisant de leur utilisation *in vivo* un défi majeur.

### 2.2. Peptides antimicrobiens (AMPs)

Les peptides antimicrobiens (AMPs pour *antimicrobial peptides*) sont une autre famille de peptides membranotropes. Ces peptides, de nature amphipathique, sont l'une des principales défenses non spécifiques de l'organisme capables de neutraliser un grand nombre de microbes. Isolés d'animaux ou de plantes, ces peptides sont nombreux à être étudiés pour leur potentiel thérapeutique (Tableau 6). Ces séquences présentent plusieurs propriétés communes : elles sont généralement amphipathiques, présentant une charge globale positive mais comportant des régions hydrophobes ; elles peuvent être linéaires adoptant des conformations en hélice  $\alpha$  ou structure  $\beta$ , ou cycliques avec la présence d'un ou plusieurs ponts disulfures.

<sup>174</sup> Swiecicki, J.-M.; Bartsch, A.; Tailhades, J.; Di Pisa, M.; Heller, B.; Chassaing, G.; Mansuy, C.; Burlina, F.; Lavielle, S. *ChemBioChem* **2014**, *15* (6), 884–891.

<sup>175</sup> Alves, I. D.; Correia, I.; Jiao, C. Y.; Sachon, E.; Sagan, S.; Lavielle, S.; Tollin, G.; Chassaing, G. *J. Pept. Sci.* **2009**, *15* (3), 200–209.

<sup>176</sup> Alves, I. D.; Bechara, C.; Walrant, A.; Zaltsman, Y.; Jiao, C. Y.; Sagan, S. *PLoS One* **2011**, *6* (9), e24096.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Les AMPs sont capables de déstabiliser la membrane plasmique par la formation de pores entraînant la lyse des cellules soit en inhibant les fonctions normalement remplies par la membrane et indispensables au fonctionnement cellulaire, soit en agissant directement sur une cible intracellulaire.<sup>177</sup> Différentes études ont montré que ces séquences cationiques étaient capables d'interagir avec les constituants anioniques de la membrane plasmique, comme les phospholipides ou les protéoglycanes. Ces composés étant plus présents dans la membrane bactérienne, cette propriété explique la capacité de certains AMPs à agir préférentiellement sur les microbes. Par ailleurs, plusieurs AMPs sont actuellement en phase clinique pour des traitements d'infections bactériennes, virales, ou des cancers.<sup>178</sup>

Peptide	Séquence
Cécropine A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVVGQATQIAK
Dermaseptine 1	ALWKTMLKKLGTMALHAGKAALGAAANTISQGTQ
Magainine 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
Magainine 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS
Mélicitine	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ
PGLa	GMASKAGAIAGKIAKVALKA
Histatine 1	DS*HEKRHHGYRRKFHEKHSHKEFPFYGDYGSNYLYDN
Gramicidine A	HCO-V <sub>g</sub> AIA <sub>v</sub> V <sub>v</sub> WIWIWIW-NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
Tachyplesine	KWCFRVCYRGICYRRCR
BMAP-28	GGLRSLGRKILRAWKKYGPIIVPIIRI
HNP-1 (β-défensine)	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
Lactoferricine B	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF
Alaméthicine	Ac-UPUAUAUQUVUGLUPVUUGQF <sub>ol</sub>
Harzianine HK VI	Ac-UNIIUPLLUPL <sub>ol</sub>
Pardaxine	GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGGQE

Tableau 6 : Exemples d'AMPs connus et de leur séquence<sup>179,180</sup>

acides aminés série D notés en minuscule ; \* = phosphosérine ; U = acide aminoisobutyrique ; L<sub>ol</sub> = leucinol ; F<sub>ol</sub> = phénylalaninol

Différents mécanismes d'action ont été identifiés quant à l'activité membranotropique de ces peptides. Bien que tous les mécanismes proposés impliquent la formation de pores dans la membrane, on distingue deux modes de fonctionnement principaux : le « carpet-model » et le « barrel-stave model ».

<sup>177</sup> Jenssen, H.; Hamill, P.; Hancock, R. E. W. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19* (3), 491–511.

<sup>178</sup> Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 1–12.

<sup>179</sup> Andreu, D.; Rivas, L. *Biopolymers* **1998**, *47*, 415–433.

<sup>180</sup> Hoskin, D. W.; Ramamoorthy, A. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2008**, *1778* (2), 357–375.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Dans le « barrel-stave model », les AMPs s'agrègent en solution ou au contact de la membrane, adoptant une conformation en hélice  $\alpha$  ou structure  $\beta$  de manière à mettre les résidus hydrophobes en interaction avec les chaînes grasses des phospholipides de la membrane. L'AMP s'insère ainsi dans la bicouche lipidique tout en formant un pore sous la forme d'un canal aqueux (Figure 78, A).<sup>181</sup>

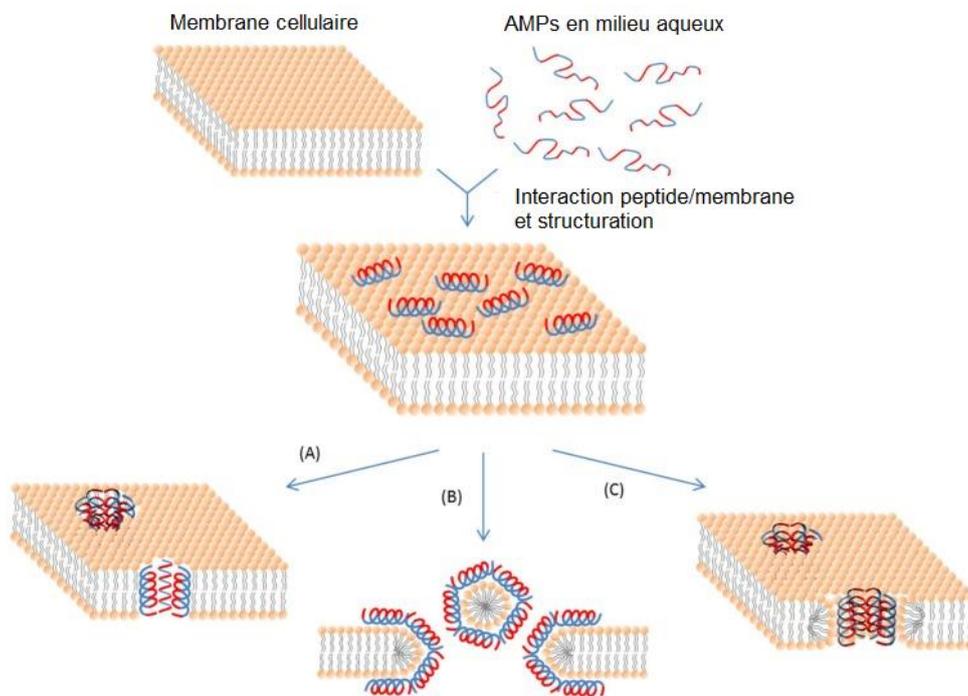


Figure 78 : Mécanismes d'action principaux des AMPs : (A) « barrel-stave model » ; (B) « carpet model » ; (C) modèle des pores toroïdaux<sup>182</sup>

Les AMPs agissant *via* le « barrel-stave model » remplissent généralement plusieurs critères : (i) ils sont de nature hydrophobe puisque leur mécanisme est régi par des interactions hydrophobes avec les phospholipides de la membrane, (ii) ils sont capables de s'auto-associer au contact de la membrane et d'adopter des structures  $\beta$  ou hélices  $\alpha$ , (iii) une fois insérés dans la membrane, ils sont capables de recruter d'autres séquences peptidiques de manière à élargir le pore formé.<sup>181</sup>

Le mécanisme « carpet-model » est bien plus représenté chez les AMPs. En effet, contrairement au « barrel-stave model », ce mode de fonctionnement ne requiert pas d'interaction entre les peptides et la formation d'agrégats, d'insertion dans la partie hydrophobe de la membrane, ou une structuration spécifique, ce qui explique qu'un grand nombre de séquences ont des activités antimicrobiennes sans pour autant entraîner la formation de canaux aqueux dans la membrane. Le « carpet-model » implique initialement une interaction électrostatique entre le peptide globalement cationique et la membrane chargée négativement de manière à « tapisser » la face extracellulaire. Les peptides s'orientent alors de manière à mettre en interaction leur partie hydrophobe vers les lipides et leur partie hydrophile vers le groupement phosphate. Après avoir atteint une concentration critique en peptide associé à la membrane, ces derniers perméabilisent ou désintègrent la membrane en modifiant sa courbure (Figure 78, B) à la manière d'un détergent.<sup>181</sup>

Ce processus pourrait également faire intervenir la formation de pores transitoires décrits dans le modèle des pores toroïdaux. Ce dernier est relativement similaire au « barrel-stave model » dans la

<sup>181</sup> Shai, Y. *Biopolymers* **2002**, 66 (4), 236–248.

<sup>182</sup> Bahar, A. A.; Ren, D. *Pharmaceuticals* **2013**, 6 (12), 1543–1575.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

mesure où l'interaction peptide/lipide entraîne la formation de pores. Néanmoins, dans le cas des pores toroïdaux, les AMPs interagissent avec les phosphates des phospholipides, les forçant à se courber sur eux-mêmes de manière à exposer leur partie hydrophile vers le pore en formation (Figure 78, C). Une autre différence fondamentale avec le « barrel-stave model » est qu'à l'issue de la formation du pore, une partie du peptide se trouve sur le feuillet interne de la membrane.

Il existe également un autre mode d'action des AMPs appelé modèle type détergent où les séquences peptidiques s'intercalent entre les lipides constitutifs de la membrane et se comportent comme des détergents. Ainsi, à faible concentration, la structure de la membrane n'est que peu modifiée. En revanche, à partir d'une certaine concentration, les peptides entraînent l'ouverture temporaire de la membrane et, à terme, sa dégradation. Bien souvent, le « carpet-model » est assimilé à un cas particulier du modèle type détergent dans la mesure où, à forte concentration en peptides, ces derniers modifient l'intégrité de la membrane.

Bien que le mécanisme d'action des AMPs entraîne généralement la lyse de la cellule, certaines séquences sont capables de perméabiliser suffisamment la membrane pour permettre leur pénétration dans le milieu intracellulaire afin d'atteindre d'autres cibles.<sup>183,184</sup> Ce comportement entraînant une translocation sans modification permanente de l'intégrité de la membrane, il pourrait être associé à celui des CPPs. Du fait de ces propriétés, certains AMPs ont d'ailleurs servi de précurseurs pour la préparation de CPPs chimériques.<sup>185</sup> Par ailleurs, des études ont montré que la Magainine 2<sup>184</sup> et la Buforine 2<sup>186</sup> étaient capables de pénétrer dans le milieu intracellulaire par la formation de pores toroïdaux transitoires.

### 2.3. Peptides pH-sensibles

Parmi les peptides membranotropes, certains exercent spécifiquement leur activité à pH acide (Tableau 7).<sup>187</sup> Leur action s'effectue ainsi principalement dans l'endosome où le pH est légèrement plus faible que le pH physiologique (environ 5 au lieu de 7). Ces peptides pH-sensibles sont généralement amphipathiques et sont capables de déstabiliser la membrane endosomale de deux manières différentes : en se structurant et en s'insérant dans la bicouche lipidique et en la perméabilisant en captant des protons.

Peptide	Séquence
GALA	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA
HA-2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG
pHLIP	AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDLALLVDADEGT
polyHis	H <sub>n</sub>

Tableau 7 : Exemples de peptides membranotropes pH-sensibles

Certaines séquences sont ainsi riches en résidus acides tels que des acides glutamiques ou aspartiques, en résidus basiques comme les lysines ou en résidus hydrophobes. De tels peptides sont assez

<sup>183</sup> Zhang, L.; Rozek, A.; Hancock, R. E. W. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (38), 35714–35722.

<sup>184</sup> Matsuzaki, K.; Murase, O.; Fujii, N.; Miyajima, K. *Biochemistry* **1995**, 34 (19), 6521–6526.

<sup>185</sup> Henriques, S. T.; Melo, M. N.; Castanho, M. A. R. B. *Biochem. J.* **2006**, 399 (1), 1–7.

<sup>186</sup> Kobayashi, S.; Chikushi, A.; Tougu, S.; Imura, Y.; Nishida, M.; Yano, Y.; Matsuzaki, K. *Biochemistry* **2004**, 43 (49), 15610–15616.

<sup>187</sup> Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. *J. Control. Release* **2011**, 151 (3), 220–228.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

hydrophiles et peu structurés au pH physiologique mais changent complètement de comportement une fois que le milieu de l'endosome atteint un pH acide. En effet, la protonation des fonctions carboxylate ou amine des résidus diminue l'hydrophilie du peptide et lui permet de se structurer, généralement sous forme d'hélice  $\alpha$ , grâce à la création de nouvelles liaisons hydrogène. Le peptide peut alors s'insérer dans la membrane endosomale et la déstabiliser de la même façon qu'un AMP.

Le peptide modèle GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA) a été étudié pour son caractère amphipathique et sa dépendance au pH, similaire à celle de certaines protéines entraînant la pénétration cellulaire (protéines de fusion). Cette séquence, riche en acide glutamique, est globalement anionique à pH neutre et la répulsion électrostatique entre les groupements carboxylate empêche le peptide d'adopter une structure en hélice  $\alpha$ . Lors de la diminution du pH dans l'endosome, la protonation des résidus acide glutamique permet d'augmenter l'hydrophobie du peptide et entraîne la formation d'hélice  $\alpha$ , lui permettant de s'insérer dans la membrane endosomale.<sup>188</sup> Cette insertion permet la formation de pores, probablement selon le « barrel-stave model » du fait de la forte hydrophobie du peptide, et donc la libération du contenu de l'endosome. Afin de former des complexes capables de délivrer des oligonucléotides dans le cytosol, des analogues cationiques de GALA, comme le KALA (WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA), ont été synthétisés. La séquence de ce dernier correspond à celle du GALA dans laquelle la plupart des résidus acide glutamique ont été remplacés par des résidus lysine. Le peptide ainsi obtenu n'est donc plus anionique mais cationique à pH neutre. S'il ne gagne pas réellement d'hydrophobie à pH acide, la protonation des fonctions amine lui permet d'adopter une structure en hélice  $\alpha$  et de s'insérer dans la membrane endosomale.

D'autres peptides sont capables de perméabiliser la membrane endosomale grâce à un mécanisme appelé « éponge à protons ». Ces peptides sont généralement riches en résidus basiques capables de se protoner au pH acide de l'endosome. Cette protonation entraîne un flux accru de protons et de molécules d'eau du cytosol vers l'endosome ce qui entraîne, à terme, la rupture de la membrane endosomale et le relargage du contenu de la vésicule. Les poly-histidines (polyHis) sont certainement les peptides les plus représentatifs de cette famille. En effet, le pKa de l'imidazole d'une histidine étant de 6,15, ces composés sont capables de se protoner uniquement dans le milieu acide des endosomes. Le recrutement des protons, des ions chlorures et de molécules d'eau du cytosol vers l'endosome entraîne finalement la destruction de la membrane.<sup>189</sup>

### 3. Les peptides de fusion du VHC

Les peptides de fusion sont un autre type de peptides membranotropes relativement peu étudié. Ces séquences très hydrophobes sont comprises dans les protéines de fusion virales et sont capables de s'insérer dans la membrane cellulaire lors du processus de fusion. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de peptides de fusion du VHC, sélectionnés en se basant sur la littérature, comme agents de pénétration cellulaire.

#### 3.1. Les protéines de fusion E1 et E2

Les virus enveloppés infectent les cellules selon un processus faisant intervenir une fusion membranaire. Lors de l'infection, la fusion permet le relargage du contenu de la particule virale (protéines/enzymes, ARN) dans le cytoplasme, afin de réaliser la réplication du génome viral et la formation de virions. Cette étape, caractérisée par la fusion de la membrane virale et de la membrane

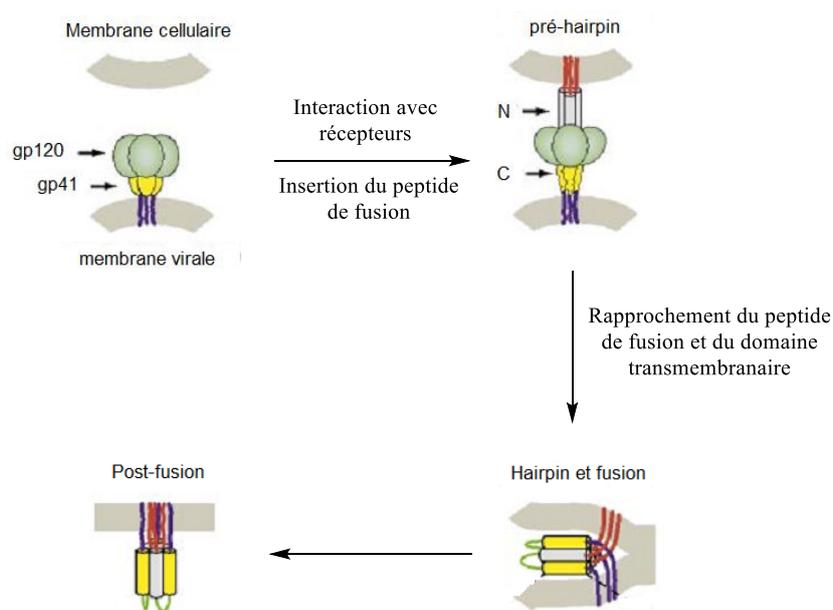
<sup>188</sup> Li, W.; Nicol, F.; Szoka, F. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56* (7), 967–985.

<sup>189</sup> Pack, D. W.; Putnam, D.; Langer, R. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67* (2), 217–223.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

cellulaire, peut être réalisée soit directement sur la membrane plasmique, soit sur la membrane endosomale après internalisation du virus par endocytose. La fusion est réalisée par l'intermédiaire de protéines virales membranaires présentes à la surface des virus enveloppés, appelées protéines de fusion (FPs). Sous l'action de certains stimuli comme le pH acide de l'endosome ou des interactions protéines/protéines initiées par la reconnaissance de certains récepteurs cellulaires, les FPs vont s'agréger et/ou subir un changement conformationnel permettant l'exposition d'une séquence très hydrophobe appelée peptide de fusion. Ce dernier est capable de s'insérer dans la membrane cellulaire de manière à la rapprocher de la membrane virale, afin d'entraîner, à terme, leur fusion.<sup>190</sup>

Les FPs sont généralement classées en deux groupes selon leur architecture et leur mode de fonctionnement : les protéines de fusion de classe I et les protéines de fusion de classe II. Les protéines de fusion de classe I, incluant la protéine hémagglutinine du virus *influenza* et la protéine gp41 du VIH, sont des homotrimères avec de nombreux segments adoptant des structures en hélice  $\alpha$  et formant une « tige » perpendiculaire à la membrane virale. L'une des propriétés caractéristiques des FPs de classe I est la présence d'homotrimères avant et après le processus de fusion. Durant le processus de fusion, ces FPs s'insèrent, grâce au peptide de fusion, dans la membrane cellulaire sous la forme d'une « tige ». Elles se re-structurent alors de manière à regrouper le peptide de fusion et le domaine transmembranaire de la protéine, adoptant ainsi une conformation en « épingle » ou *hairpin*. Ce changement permet ensuite de rapprocher les membranes cellulaire et virale de manière à déclencher la fusion (Figure 79).<sup>191</sup>



**Figure 79 : Processus de fusion impliquant la protéine de fusion de classe I gp41 du VIH (peptide fusion en rouge et domaine transmembranaire en violet, N correspond au domaine N-terminal et C au C-terminal)<sup>191</sup>**

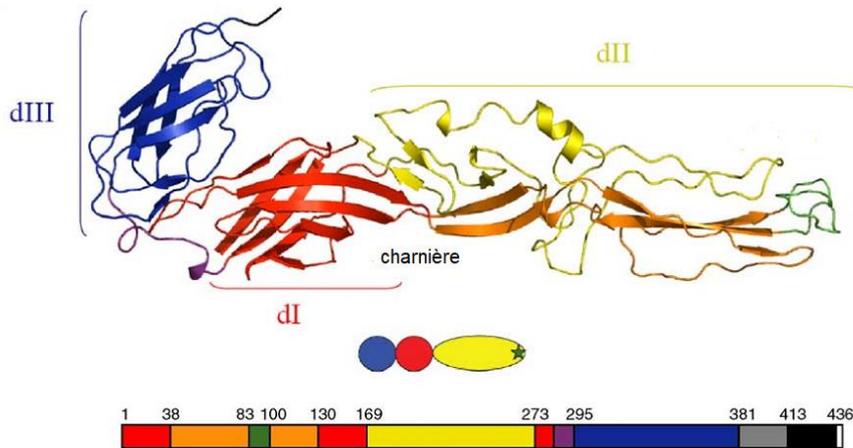
Les protéines de fusion de classe II, incluant les protéines des alphavirus et des flavivirus, diffèrent des protéines de classe I non seulement par leur structure mais également par leur comportement pré- et post-fusion. Ces protéines prennent une forme allongée avec trois domaines globulaires, riches en feuillettes  $\beta$ . Elles sont ainsi divisées en trois différents domaines (Figure 80) : le premier (domaine I) est un « tonneau  $\beta$  » contenant la partie N-terminale de la protéine et deux jonctions le liant au domaine II, composé de plusieurs brins  $\beta$ . Le peptide de fusion est contenu dans une de ces jonctions,

<sup>190</sup> Kielian, M. *Virology* **2006**, 344 (1), 38–47.

<sup>191</sup> Eckert, D. M.; Kim, P. S. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70 (1), 777–810.

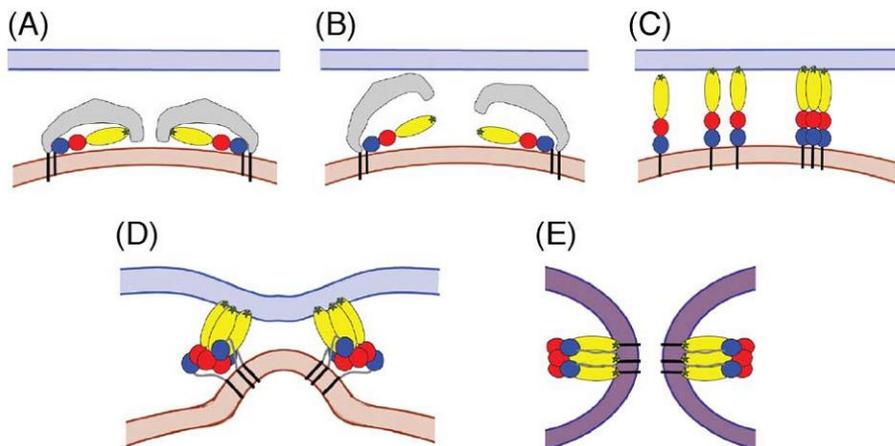
## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

formant une boucle liant les brins  $\beta$  c et d (aussi appelée boucle cd). Les domaines I et II sont séparés par une région charnière, très flexible, permettant à la protéine d'adopter différentes conformations selon l'étape du processus de fusion. Le domaine I est également lié au domaine III, qui est défini par un « tonneau  $\beta$  » stabilisé par trois ponts disulfures. Enfin, le domaine III est suivi d'une « tige » faisant le lien avec la partie transmembranaire virale.



**Figure 80 : Exemple d'une structure pré-fusion d'une FP de classe II (protéine E1 du virus de la forêt de Semliki)<sup>190</sup>**  
 En rouge : domaine I ; en jaune : domaine II ; en vert : boucle cd ; en bleu : domaine III ; en noir : région transmembranaire.

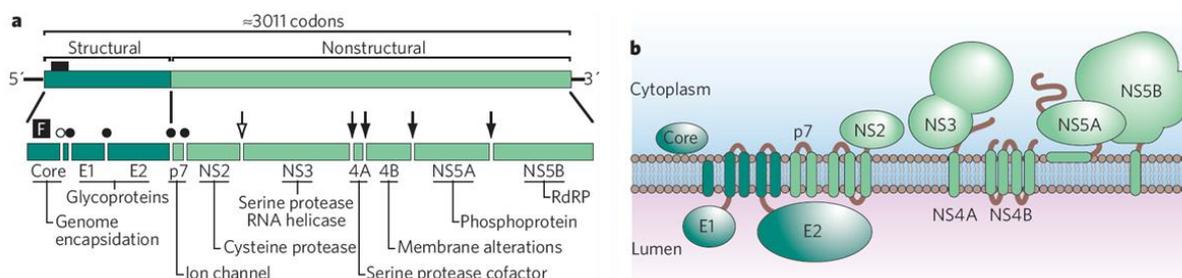
Contrairement aux FPs de classe I, les protéines de classe II existent sous la forme d'homo- ou hétérodimères (avec une autre protéine transmembranaire virale) avant le processus de fusion. Lors de la fusion, la déstabilisation du dimère permet de libérer la protéine de fusion qui s'oriente alors perpendiculairement à la membrane virale. Le peptide de fusion situé à l'extrémité de la protéine peut ensuite s'insérer dans la membrane cellulaire. La protéine de fusion forme alors un homotrimère puis, en milieu acide, ce dernier subit un changement conformationnel permettant la formation de l'« épingle » et donc le rapprochement des membranes virales et cellulaire entraînant la fusion (Figure 81).<sup>190</sup>



**Figure 81 : Modèle du processus de fusion induit par la protéine E1 du virus de la forêt de Semliki.**  
 (A) Dimère pré-fusion entre la protéine E1 (domaine I en rouge, II en jaune et III en bleu) et la protéine E2 (gris) ; (B) Dissociation du dimère à pH acide exposant le peptide de fusion (étoile verte) ; (C) Insertion du peptide de fusion dans la membrane cellulaire et trimérisation de la protéine E1 ; (D) Restructuration du trimère de manière à former une « hairpin » rapprochant le peptide de fusion et la région transmembranaire et entraînant la fusion ; (E) Configuration post-fusion.<sup>190</sup>

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Comme expliqué en introduction, le virus de l'hépatite C (VHC) possède plusieurs protéines non-structurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) et des protéines structurales (C, E1, E2 et p7). Ces protéines sont obtenues après découpage de la polyprotéine codée par l'ARN viral, sous l'action des peptidases et protéases (Figure 82a).<sup>192</sup> Les glycoprotéines E1 et E2 sont ainsi des protéines transmembranaires comportant une région *N*-terminale extracellulaire importante et un court domaine transmembranaire très hydrophobe du côté *C*-terminal (Figure 82b).



**Figure 82 : (a) Structure de la polyprotéine virale et sites d'action des peptidases (cercles) et des protéases (flèches) ; (b) Structures des différentes protéines dans la membrane virale<sup>192</sup>**

Plusieurs études ont montré que les protéines E1 et E2 du VHC étaient capables de s'associer sous la forme d'hétérodimères responsables de la reconnaissance de certains récepteurs membranaires des cellules touchées. Ces interactions avec les récepteurs entraînent l'internalisation du virus par endocytose clathrine-dépendante,<sup>193</sup> puis les protéines E1 et E2 permettent alors la fusion des membranes virale et endosomale grâce au pH acide de l'endosome.<sup>194</sup>

En se basant sur ces observations ainsi que des comparaisons avec des protéines de fusion provenant de virus de la même famille (le virus de la méningo-encéphalite à tiques) et des modélisations structurales,<sup>195</sup> il a été proposé que les protéines E1 et E2 étaient des protéines de fusion de classe II du VHC. De nombreuses études ont montré, par mutagenèse ou co-expression des protéines, que la formation du dimère E1/E2 était indispensable pour le processus de fusion. De plus, il est généralement admis que la protéine E2 est impliquée dans la reconnaissance cellulaire,<sup>196</sup> alors que E1 joue un rôle dans le processus de fusion.<sup>195</sup>

### 3.2. Sélection des séquences étudiées

De nombreuses études ont été menées sur les protéines de fusion E1 et E2 depuis une vingtaine d'années, afin d'essayer d'identifier le peptide de fusion du VHC. En se basant sur des modélisations structurales, des comparaisons de séquences, des études d'hydrophobie et de fusion sur des liposomes comme modèles de membrane cellulaire, différentes séquences des protéines E1 et E2 ont été identifiées comme étant impliquées dans le processus de fusion et donc pouvant être potentiellement le peptide de fusion du VHC (Tableau 8).

<sup>192</sup> Lindenbach, B. D.; Rice, C. M. *Nature* **2005**, *436* (7053), 933–938.

<sup>193</sup> Meertens, L.; Bertaux, C.; Dragic, T. *J. Virol.* **2006**, *80* (23), 11571–11578.

<sup>194</sup> Vieyres, G.; Thomas, X.; Duverlie, G.; Patel, A. H.; Dubuisson, J. *J. Virol.* **2010**, *84* (19), 10159–10168.

<sup>195</sup> Garry, R. F.; Dash, S. *Virology* **2003**, *307* (2), 255–265.

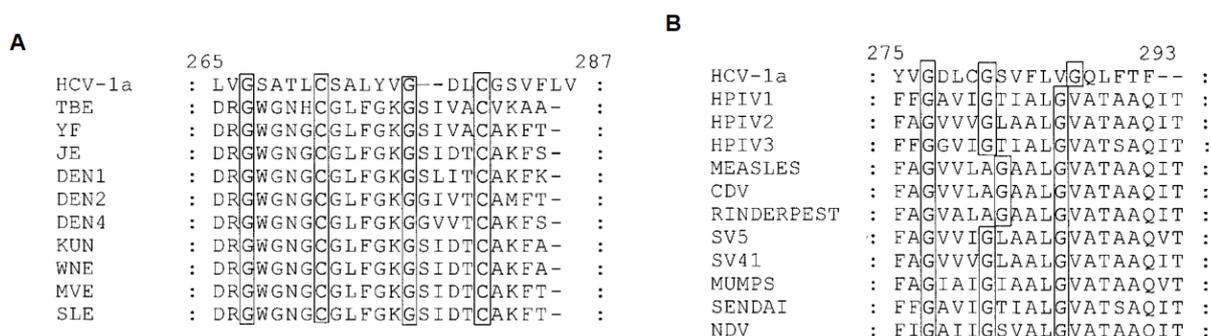
<sup>196</sup> Drummer, H. E.; Boo, I.; Maerz, A. L.; Pountourios, P. *J. Virol.* **2006**, *80* (16), 7844–7853.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Séquence	Protéine	Domaine
<sup>264</sup> LLVGSATLCSALYVGDLCGSVFLVGQ <sup>290</sup> L	E1	Ecto
<sup>272</sup> CSALYVGDLCGSVFLVGQLFTFSPRHWTQD <sup>304</sup> C	E1	Ecto
<sup>284</sup> VFLV <sup>288</sup> G	E1	Ecto
<sup>330</sup> AALVVAQLLRIPQAIMD <sup>347</sup> M	E1	pTMD
<sup>418</sup> GWHINRTALNCND <sup>432</sup> S	E2	Ecto
<sup>430</sup> NDSLTYGWLAGLFYHHKFN <sup>449</sup> S	E2	Ecto
<sup>495</sup> GIVPAKSVCGPVYCFTPSVV <sup>515</sup> V	E2	Ecto
<sup>543</sup> RPPLGNWFGCTWMNSTG <sup>560</sup> F	E2	Ecto
<sup>593</sup> TYQRCGSGPWVTPRCLVDYAYRL <sup>616</sup> W	E2	Ecto
<sup>675</sup> TQLSILPCSFSTMPALSTGLIHLHQ <sup>699</sup> N	E2	pTMD

**Tableau 8 : Différentes séquences de E1 et E2 identifiées comme potentiels peptides de fusion pTMD = domaine pré-transmembranaire (*pre-transmembrane domain*) ; la numérotation des résidus correspond à celle de la polyprotéine virale.**

Ainsi, Flint *et al.* ont proposé, en 1999, l'existence d'un peptide de fusion potentiel dans une région très hydrophobe de la protéine E1. En effet, en comparant les séquences des protéines de fusion E1 et E2 avec celles des flavivirus, il a été possible de montrer de nombreuses similitudes entre la séquence <sup>265</sup>LVGSATLCSALYVGDLCGSVFL<sup>287</sup>V de E1 et des séquences de potentiels peptides de fusion de virus de même famille (Figure 83A).<sup>197</sup> Notamment, la <sup>267</sup>Gly, la <sup>272</sup>Cys, la <sup>278</sup>Gly et la <sup>281</sup>Cys se sont révélées fortement conservées au sein des flavivirus. De plus, la comparaison de cette séquence de la protéine E1 avec les peptides de fusion des paramyxovirus a montré un enchaînement similaire de résidus, notamment les glycines, connues pour jouer un rôle capital dans la structure des peptides de fusion de ces virus (Figure 83B).



**Figure 83 : Comparaison des séquences de VHC E1 avec les flavivirus (A) ; avec les paramyxovirus (B)**<sup>197</sup>  
**TBE : virus de la méningo-encéphalite à tiques ; YF : fièvre jaune ; JE : virus de l'encéphalite japonaise ; DEN : virus de la dengue ; KUN : virus de Kunjin ; WNE : virus du Nil occidental ; MVE : virus de l'encéphalite de la Murray valley ; SLE : virus de l'encéphalite de St. Louis ; HPIV : virus *parainfluenza* humain ; CDV : virus de la maladie de Carré ; SV : virus simien ; NDV : virus de la maladie de Newcastle.**

<sup>197</sup> Flint, M.; Thomas, J. M.; Maidens, C. M.; Shotton, C.; Levy, S.; Barclay, W. S.; McKeating, J. A. *J. Virol.* **1999**, 73 (8), 6782–6790.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Enfin, il est intéressant de noter que le résidu <sup>279</sup>Asp est extrêmement conservé au sein des différents génotypes du VHC, et également présent dans certains peptides de fusion supposés des flavivirus. L'activité fusogénique des protéines E1 et E2 du VHC étant dépendante du pH, la présence d'un résidu acide dans cette séquence pourrait justifier son identification comme peptide de fusion.

Par la suite, Garry *et al.* ont réalisé des études de protéomique par modélisation sur les protéines E1 et E2 du VHC. La comparaison des séquences des protéines E1 et E2 avec celles de la protéine de fusion E du virus de la méningo-encéphalite à tiques (TBEV pour *tick-borne encephalitis virus*) et la protéine E2 du virus de la forêt de Semliki (SFV pour *Semliki-forest virus*) a permis d'identifier une région de E1 comprise dans celle proposée par Flint *et al.*, correspondant aux peptides de fusion des autres virus : <sup>272</sup>CSALYVGDL<sup>281</sup>C. En effet, cette étude a également montré la présence de certains résidus fortement conservés dans les protéines virales des flavivirus à savoir la <sup>278</sup>Gly et la <sup>281</sup>Cys. De plus, des modélisations structurales de la protéine E1 en se basant sur les similitudes avec la protéine E du TBEV, laissent penser que cette séquence serait comprise dans la boucle hydrophobe contenant généralement le peptide de fusion (boucle cd) chez les FPs de classe II.

Des expériences de mutagenèse menées par Drummer *et al.* ont montré que le motif <sup>284</sup>VFLV<sup>288</sup>G compris dans la séquence identifiée par Flint *et al.*, était primordial pour le processus de fusion. En effet, dans cette étude, des pseudo-particules virales modèles du VHC présentant différents mutants des protéines E1 et E2 ont été préparées.<sup>198</sup> Il a ainsi été montré qu'une mutation F285A<sup>i</sup> entraînait une réduction totale de la pénétration virale sans pour autant influencer sur l'expression des protéines, leur hétérodimérisation ou leur structuration. Les autres mutations effectuées, V277A, L286A, Y276A ou Y276R ont très peu modifié la pénétration virale montrant que, dans la séquence 265-285 identifiée par Flint *et al.*, le motif VFLVG et particulièrement la <sup>285</sup>Phe, sont d'une grande importance dans le processus de fusion. Cette étude a également démontré que la séquence pré-transmembranaire de E1 (330-347), AALVVAQLLRIPQAIDM, présentait des résidus importants pour l'activité fusogénique. En effet, des substitutions de certains résidus en proline ou alanine (Figure 84) ont altéré l'entrée cellulaire du virus de manière significative.



Figure 84 : Mutations en Pro (flèches verte) et en Ala (flèches rouge) apportées à la séquence pré-transmembranaire 330-347 de la protéine E1.

Dans le même temps, Lavillette *et al.* ont montré grâce à des expériences de mutagenèse que des mutants, notamment ceux incorporant les modifications Y276F, G282A, G418A, G418D, W616A et W616F, étaient capables d'incorporer normalement le dimère E1/E2 et de se lier à la membrane cellulaire, mais présentaient des niveaux de pénétration virale très réduits (au moins 20 fois moins de pénétration que le type naturel).<sup>199</sup> Ces observations confirment que la séquence 265-285 pourrait être le peptide de fusion du VHC mais soulève également le potentiel des séquences 416-430 et 600-620 de la protéine E2.

<sup>198</sup> Drummer, H. E.; Boo, I.; Poubourios, P. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 1144–1148.

<sup>199</sup> Lavillette, D.; Pecheur, E. I.; Donot, P.; Fresquet, J.; Molle, J.; Corbau, R.; Dreux, M.; Penin, F.; Cosset, F. L. *J. Virol.* **2007**, *81* (16), 8752–8765.

<sup>i</sup> Par convention, les mutations sont symbolisées par la position et la nature de l'acide aminé initial, ainsi que la nature de l'acide aminé intégré. Par exemple, la mutation F285A correspond à la substitution de la phénylalanine 285 par une alanine.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Enfin, Pérez-Berná *et al.* ont longuement étudié la séquence des protéines de fusion E1 et E2. Des peptides de 18 acides aminés couvrant les séquences complètes des protéines de fusion du VHC ont ainsi été préparées. Ces peptides, dont les séquences se recoupent, ont ensuite été étudiés en termes d'hydrophobie ainsi que leur capacité à induire la fusion ou l'hémifusion sur des liposomes comme modèles de membrane cellulaire.<sup>200</sup> L'étude de l'activité fusogénique de ces séquences en fonction des résidus les composant, a alors permis d'identifier clairement les régions les plus membranotropes des protéines (Figure 85). Ces régions confirment les études précédemment citées, notamment sur le potentiel des séquences 265-304 et 416-430.

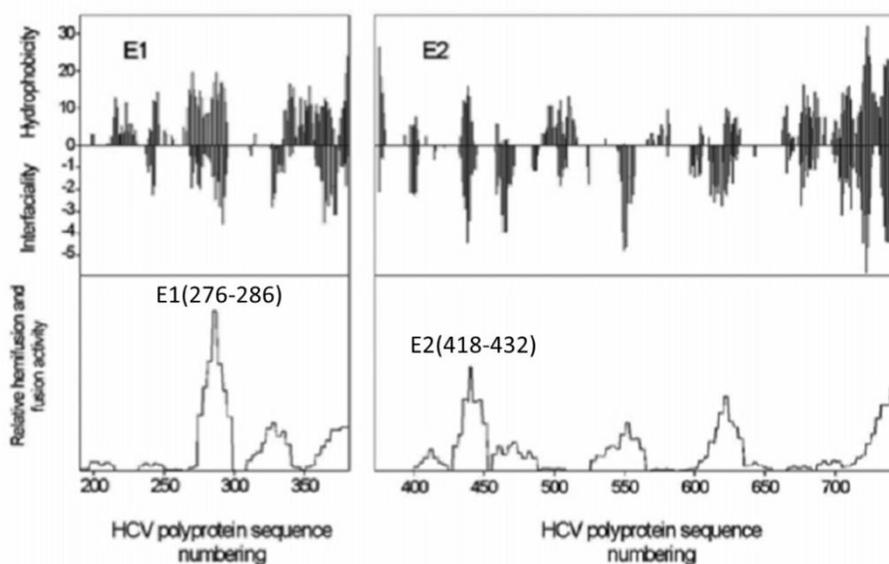


Figure 85 : Étude de l'hydrophobie et de l'activité fusogénique des séquences des protéines E1 et E2<sup>200</sup>

Cette étude identifie la région extracellulaire de la protéine E1 comme étant la plus membranotrope. Pérez-Berná *et al.* ont également confirmé cette observation en caractérisant l'interaction de la séquence (274-291) avec des liposomes comme modèles de membranes cellulaires par différentes méthodes notamment la spectrofluorescence et la RMN <sup>13</sup>P. Les résultats obtenus avec des vésicules de différentes compositions (PC, PS et acide L- $\alpha$ -phosphatidique) démontrent la capacité de cette séquence à interagir avec une bicouche lipidique par des interactions électrostatiques et hydrophobes, de s'adsorber à la surface membranaire et d'en modifier les propriétés physiques.<sup>201</sup>

Ainsi, les études de mutagenèse montrent l'importance des différentes séquences des protéines E1 et E2 quant au processus de fusion mis en jeu lors de l'infection virale. Trois régions ressortent principalement de ces investigations : la partie extracellulaire de E1 (265-304), la région pré-transmembranaire de E1 (330-347) et la partie extracellulaire de E2 (416-430 et 600-620). Néanmoins, ces études étant réalisées sur l'hétérodimère E1/E2, il est également possible que ces séquences soient impliquées dans le processus de fusion à un autre niveau que celui de l'insertion membranaire du peptide de fusion (interaction avec récepteurs, interaction protéine/protéine, changement conformationnel, *etc.*). Les travaux de Pérez-Berná apportent alors un éclairage différent, plus focalisé sur les séquences peptidiques que sur les protéines virales. D'après leurs observations, deux séquences

<sup>200</sup> Pérez-Berná, A. J.; Moreno, M. R.; Guillén, J.; Bernabeu, A.; Villalaín, J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 3755–3768.

<sup>201</sup> Pérez-Berná, A. J.; Pabst, G.; Lagner, P.; Villalaín, J. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2009**, *1788* (10), 2183–2193.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

semblent plus fusogéniques que les autres : la région extracellulaire de E1 (265-304) et celle de E2 (416-430).

Dans l'optique d'étudier le comportement de ces peptides et de chercher la séquence minimale qui permettrait une pénétration efficace de SRO91, il a été décidé de se concentrer principalement sur les régions les plus membranotropes des protéines E1 (HCV1 et HCV2, Tableau 9) et E2 (HCV4, Tableau 9).

Les différentes études présentées précédemment font état de l'importance du motif VFLVG dans l'activité membranotrope de la région extracellulaire de la protéine E1. Ce pentapeptide sera également synthétisé (HCV3, Tableau 9) afin de vérifier si cette courte séquence est suffisante pour l'activité membranaire.

Nom	Code	Séquence
VHC-E1(265-304)	HCV1	LVGSATLCSALYVGDLCGSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQDC
VHC-E1(330-347)	HCV2	AALVVAQLLRIPQAIMDM
VHC-E1(284-288)	HCV3	VFLVG
VHC-E2(418-432)	HCV4	SWHINRTALNCNDS
[ <sup>272</sup> Ser, <sup>281</sup> Ser, <sup>304</sup> Ser] VHC-E1(265-304)	HCV5	LVGSATL <u>SS</u> ALYVGD <u>L</u> SGSVFLVGQLFTFSPRRHWTTQ <u>D</u> S
[ <sup>281</sup> Ser]VHC-E1(276-286)	HCV6	YVGD <u>L</u> SGSVFL
[ <sup>429</sup> Ser]VHC-E2(418-432)	HCV7	SWHINRTALN <u>S</u> NDS
VIH-Tat(47-57)	Tat	YGRKKRRQRRR

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des peptides étudiés

Cependant, la présence de plusieurs résidus cystéine (<sup>272</sup>Cys, <sup>281</sup>Cys, et <sup>304</sup>Cys) dans les séquences sélectionnées issues de la protéine E1, est incompatible avec les analyses envisagées (calorimétrie et ondes acoustiques de surface). En effet, la présence de tels résidus peut entraîner la formation de ponts disulfures, complexifiant l'étude d'interaction avec la membrane en augmentant le nombre d'espèces en présence. Ainsi, il a été décidé de remplacer ces résidus cystéine par des résidus sérine afin de s'affranchir de ces complications éventuelles tout en gardant le caractère donneur de liaisons hydrogène de l'acide aminé (résidus soulignés dans la séquence HCV5, Tableau 9). En effet, même si les travaux cités précédemment montrent l'importance des résidus <sup>272</sup>Cys et <sup>281</sup>Cys, une étude menée par Li *et al.*, a montré qu'ils n'étaient pas impliqués dans des ponts disulfures intra- ou inter-protéines.<sup>202</sup> De plus, afin de faciliter les synthèses et notamment les réactions de conjugaison ultérieures, la séquence HCV5 a été tronquée (HCV6, Tableau 9).

Pour la protéine E2, le même raisonnement a été appliqué à savoir le remplacement de la <sup>429</sup>Cys par un résidu sérine, donnant le peptide HCV7 à partir de la séquence HCV4 (Tableau 9). Il a également été choisi d'utiliser le peptide Tat comme référence dans cette étude du fait de la connaissance de son

<sup>202</sup> Li, H.-F.; Huang, C.-H.; Ai, L.-S.; Chuang, C.-K.; Chen, S. S. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 89.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

interaction avec des modèles de membranes tels que les liposomes et son utilisation fréquente pour la délivrance intracellulaire de composés d'intérêt. Pour toutes ces raisons, il a été décidé de synthétiser et d'étudier quatre séquences : HCV3, HCV6, HCV7 et la référence Tat (entrées grisées dans le Tableau 9).

Différentes fonctionnalisations ont ensuite été envisagées pour ces séquences. En effet, afin de « mimer » la position de ces peptides dans la séquence protéique, l'extrémité C-terminale des peptides libres (Série 0, Figure 86) a été amidifiée, tandis que leur extrémité N-terminale a été acylée par le motif acide 1,13-diamino-4,7,10-trioxatridécane-succinamique (TTDS) très hydrophile. L'utilisation d'un tel espaceur permet non seulement d'apporter de l'hydrophilie à ces séquences hydrophobes et d'augmenter leur solubilité, mais également d'éloigner la séquence d'un potentiel cargo et éviter une interaction pouvant gêner la pénétration membranaire. De plus, la fonction amine du motif TTDS a été acétylée afin de simuler la présence d'un éventuel cargo (Série 1, Figure 86).

La Série 2 (Figure 86) est obtenue en introduisant, en position C-terminale, un résidu lysinamide fonctionnalisé par un acide lipoïque sur l'amine de la chaîne latérale. Ce dernier permettra la fixation des peptides sur une puce en or grâce au motif dithiolane. Ainsi les interactions de ces peptides avec des liposomes pourront être analysées par ondes acoustiques de surface.

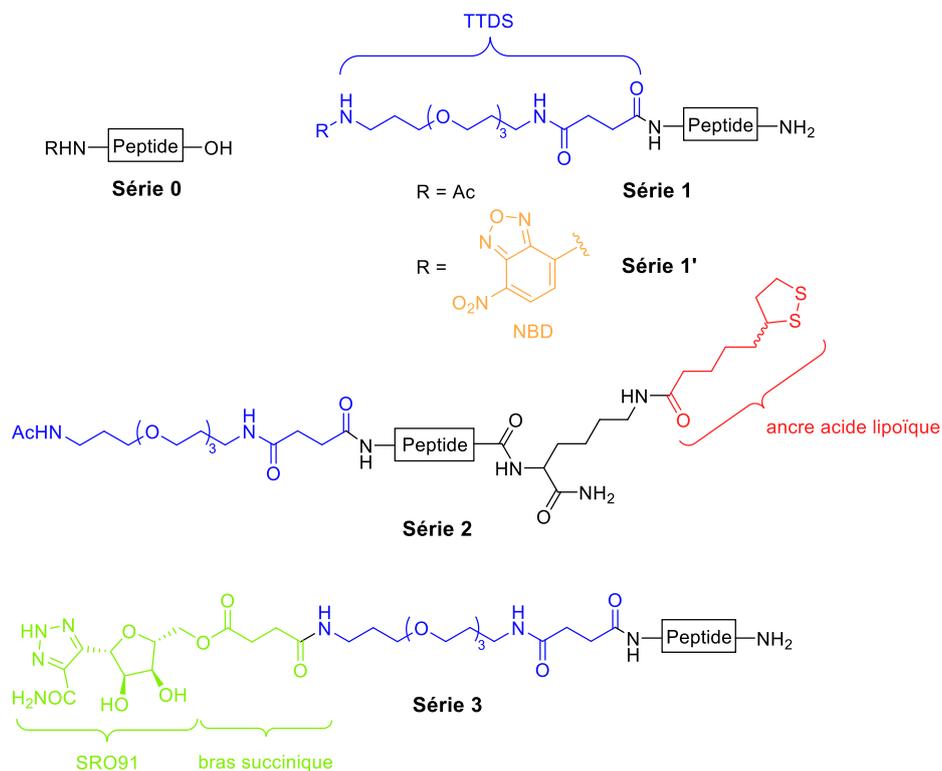


Figure 86 : Structure des différentes séries de peptides envisagées

Enfin, différentes conjugaisons ont été envisagées à la place du groupement acétyle des composés de la Série 1. La première, avec une molécule fluorescente, le 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD), permettrait d'obtenir des séquences marquées (Série 1', Figure 86) afin de réaliser des études d'internalisation des peptides dans des modèles de membrane cellulaire (spectrofluorescence) et dans des cellules (microscopie). La deuxième correspond à une conjugaison avec la molécule anti-VHC grâce à un bras succinique (composé **8**), pour donner des conjugués qui seront testés *in vitro* pour leur activité anti-VHC (Série 3, Figure 86).

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

### 4. Synthèse des peptides d'intérêt et leurs conjugués

Tous les peptides étudiés ont été synthétisés sur support solide (SPPS pour *solid-phase peptide synthesis*). La SPPS a été développée par Merrifield dans les années 60, dans l'idée de réaliser des synthèses rapides sur support solide (une bille de résine, généralement un *co*-polymère polystyrène-*co*-polydivinylbenzène pouvant être fonctionnalisé) avec de meilleurs rendements que la synthèse en solution et permettant des traitements facilités.<sup>203</sup>

La SPPS fait intervenir des groupements protecteurs de deux types : des groupements dits temporaires comme les carbamates (Boc ou Fmoc) sur la fonction amine des acides aminés et des groupements permanents portés par les chaînes latérales. Afin d'éviter la formation de sous-produits (séquences de délétion ou croissance de la séquence peptidique sur des chaînes latérales), ces groupements protecteurs et le lien avec la résine doivent être orthogonaux, c'est-à-dire dégradés dans des conditions différentes (Schéma 51). Dans la stratégie dite Fmoc/*t*Bu, l'amine de chaque acide aminé est protégée par un groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) déprotégé en milieu basique (généralement de la pipéridine) alors que le lien avec la résine et les groupements protecteurs permanents (*t*Bu, Trt, Boc, Pbf, *etc.*) ne sont dégradés qu'en milieu acide (généralement une solution d'acide trifluoroacétique, TFA).<sup>204</sup> La synthèse du peptide ou élongation de la chaîne est alors effectuée par une succession de cycles comprenant une étape de déprotection de l'amine terminale protégée par un groupement Fmoc, puis un couplage avec un nouvel acide aminé en utilisant un activateur (composé permettant la formation d'un ester activé) et une base (Schéma 51).

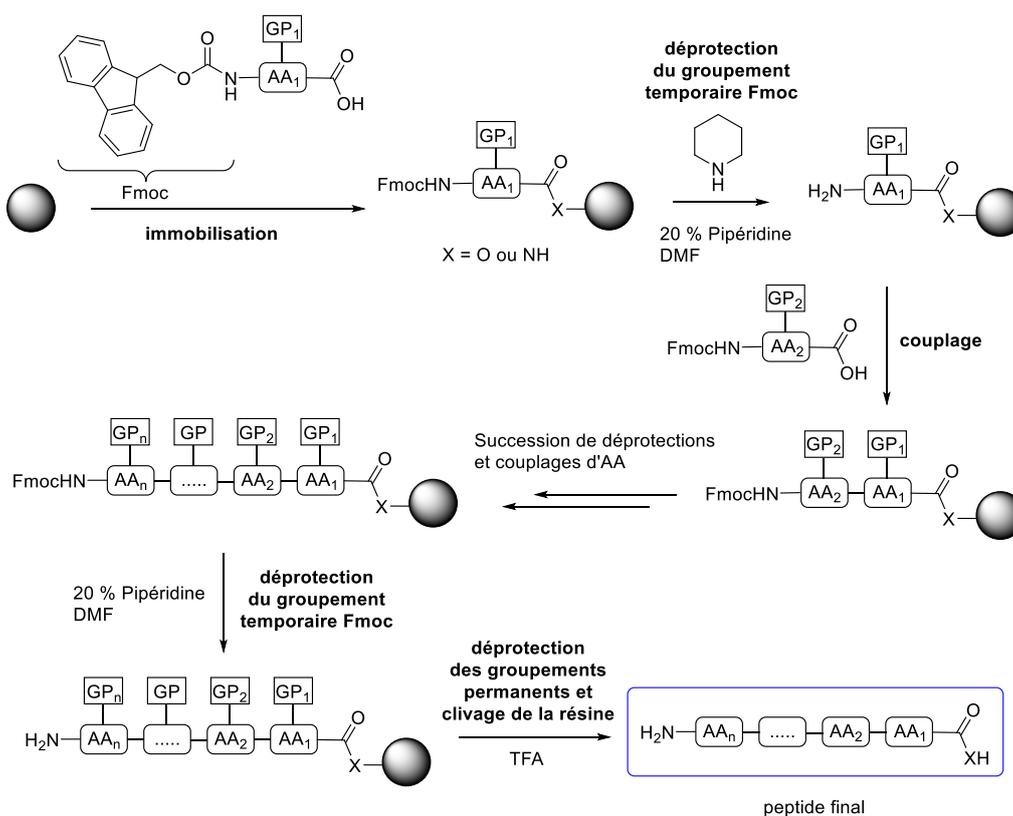


Schéma 51 : Schéma général d'une synthèse peptidique par SPPS suivant la stratégie Fmoc/*t*Bu

<sup>203</sup> Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149–2154.

<sup>204</sup> Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. In *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press, 1997; pp 19–94.

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Lors de cette étude, les peptides ont été synthétisés par SPPS en suivant la stratégie Fmoc/*t*Bu. Les acides aminés ont ainsi été utilisés sous la forme *N*<sup>α</sup>-Fmoc protégée et portant des groupements acidolabiles sur les chaînes latérales. Les réactions de couplage en synthèse automatisée ont été réalisées dans des conditions classiques en utilisant le *N,N*'-diisopropylcarbodiimide (DIC, Figure 87) et l'éthyl(hydroxyimino)cyanoacétate (Oxyma pure®, Figure 87). En synthèse manuelle, l'hexafluorophosphate d'*O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (HBTU) ou le tétrafluoroborate d'*O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (TBTU) ont été utilisés comme activateurs et la *N*-méthylmorpholine (NMM) ou la diisopropyléthylamine (DIPEA) comme bases (Figure 87).

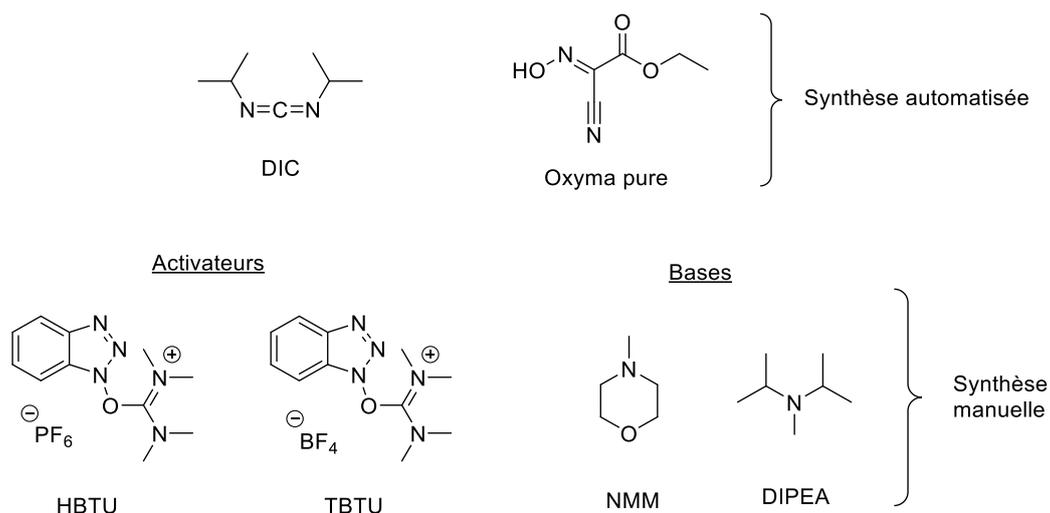


Figure 87 : Structures des agents de couplages utilisés pour la SPPS

Une résine Wang a été utilisée pour obtenir la fonction acide carboxylique C-terminale de la S0 alors que les peptides ont été synthétisés sur une résine Rink Amide dans le cas des autres séries. Toutes les modifications apportées à la séquence peptidique (pégylation, acétylation, couplage de l'acide lipoïque et conjugaison avec NBD ou SRO91) ont été réalisées après élongation de la chaîne et avant le clivage de la résine réalisé par traitement acide avec une solution de TFA. Les différents peptides bruts obtenus ont alors été analysés par chromatographie liquide à ultraperformance couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS) ou chromatographie liquide à haute performance couplée spectrométrie de masse (HPLC-MS). Les peptides ont ensuite été purifiés par HPLC semi-préparative en phase inverse (RP-HPLC). Les résultats de ces différentes synthèses sont récapitulés dans le Tableau 10.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

Nom		Tat	HCV3	HCV6	HCV7
Séquence		YGRKKRRQRRR	VFLVG	YVGDLSGSVFL	SWHINRTALN\$NDS
Série 0	Rendement	38 %	45 %	32 %	32 %
	Pureté	> 95 %	> 95 %	> 95 %	> 95 %
Série 1	Rendement	15 %	11 %	10 %*	12 %
	Pureté	> 95 %	> 95 %	> 50 %**	> 95 %
Série 1'	Rendement	40 %	15 %	18 %	16 %
	Pureté	> 95 %	> 95 %	> 95 %	> 90 %
Série 1''	Rendement	-	-	-	9 %
	Pureté	-	-	-	> 95 %
Série 2	Rendement	14 %	2 %	-	-
	Pureté	> 95 %	> 85 %	-	-
Série 3	Rendement	55%	-	-	12 %
	Pureté	> 95 %	-	-	> 95 %

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des peptides synthétisés (pureté UV et rendement)

\* rendement calculé d'après la masse de produit brut et la pureté

\*\* pureté mesurée d'après le chromatogramme UV de la partie soluble

### 4.1. Synthèse des Séries 0 et 1

Les différents peptides libres de la Série 0 (S0) d'intérêt ont ainsi pu être synthétisés (Schéma 52) avec de bons rendements (entre 30 et 45 %) et une bonne pureté (> 95 %). Il est cependant important de signaler que, du fait de sa forte hydrophobie et sa courte séquence, HCV3 libre n'a pas pu être obtenu. La séquence a donc été pégylée avec un motif TTDS pour obtenir le peptide HCV3-S0 avec un rendement de 45 % et une pureté supérieure à 95 %.

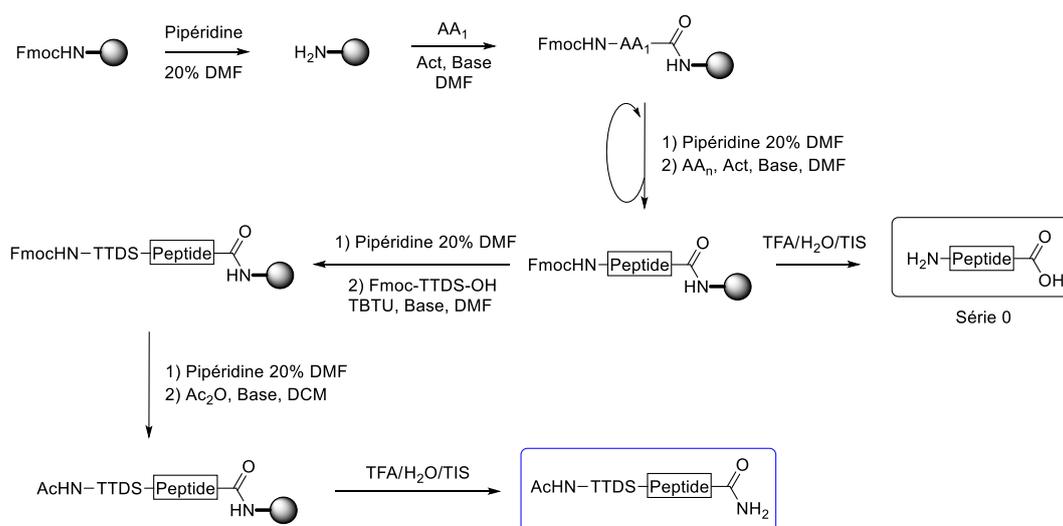


Schéma 52 : Schéma de synthèse des Séries 0 et 1 par SPPS

### Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

La synthèse des peptides de fusion acétylés de la Série 1 (S1) a été réalisée en effectuant une acétylation en fin d'élongation de chaîne et après pégylation, en utilisant de l'anhydride acétique et une base (NMM ou DIPEA, Schéma 52). Cette synthèse s'est également révélée délicate. En effet, si le Tat et HCV7 sont suffisamment solubles pour être purifiés facilement sous leur forme acétylée, ce n'est pas le cas du peptide HCV3 et plus encore du peptide HCV6. En effet, HCV6-S1 forme un gel après clivage final rendant impossible les étapes de lavage précédant la purification par chromatographie. De plus, le peptide brut n'a pas pu être solubilisé dans un mélange eau/acétonitrile (H<sub>2</sub>O/ACN), compliquant ainsi la purification semi-préparative. Néanmoins, une partie solubilisée de HCV6-S1 a pu être analysée par HPLC-MS montrant la présence majoritaire du peptide attendu en solution (Figure 88).

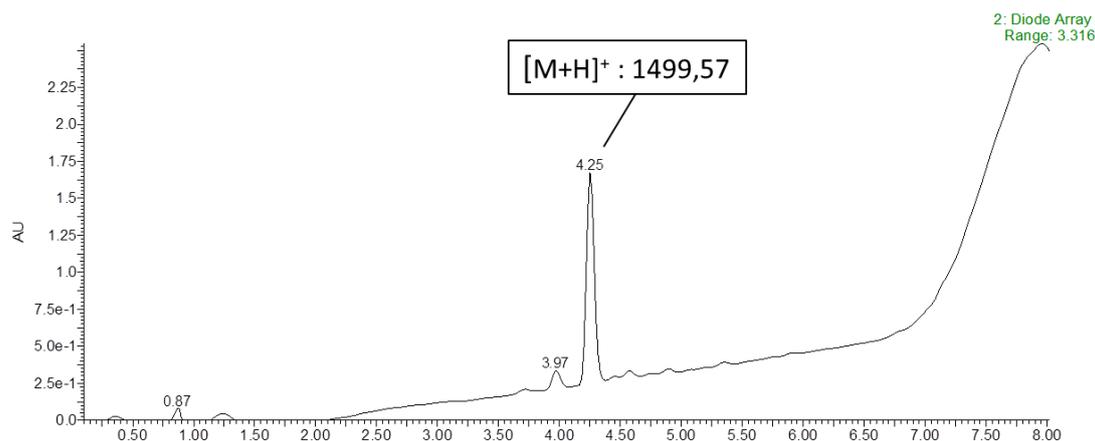


Figure 88 : Chromatogramme UV d'analyse HPLC-MS du peptide HCV6-S1 brut

Diverses tentatives de solubilisation ont alors été menées en utilisant des solvants organiques (MeOH, DMSO), des sels connus pour déstabiliser les interactions entre chaînes peptidiques (chlorure de guanidinium) ou encore différentes valeurs de pH (Tableau 11). Aucune de ces conditions n'a permis de solubiliser complètement le peptide sauf l'utilisation d'ultrasons dans un mélange H<sub>2</sub>O/ACN 65/35, ou encore dans un tampon phosphate à pH = 12. Si la solubilisation à pH basique est certainement due à la présence d'un résidu acide aspartique dans la séquence, le recours aux ultrasons pour la solubilisation montre que ce peptide a tendance à s'aggréger.

Condition	Concentration massique en peptides (mg/mL)	Ultrasons	Chauffage (40°C)	Solubilité
H <sub>2</sub> O	0,1	Oui	Oui	Non
H <sub>2</sub> O/ACN 50/50	1	Oui	Non	<b>Oui</b>
H <sub>2</sub> O/ACN 65/35	1	Oui	Non	<b>Oui</b>
H <sub>2</sub> O/MeOH 80/20	0,1	Oui	Oui	Non
H <sub>2</sub> O/DMSO 50/50	1	Oui	Oui	Non
Chlorure de guanidinium 6M	0,3	Oui	Oui	Non
Tampon HEPES pH 7,4	1	Oui	Oui	Non
Tampon PBS pH 8	1	Oui	Non	Non
Tampon PBS pH 7,4	1	Oui	Non	Non
Tampon PBS pH 12	1	Non	Non	<b>Oui</b>

Tableau 11 : Conditions testées pour la solubilisation du peptide HCV6-S1

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

La tendance à l'agrégation du peptide et l'utilisation du milieu fortement basique n'étant pas compatibles à la purification par RP-HPLC, HCV6-S1 a été purifié manuellement sur gel de silice en phase inverse, et a été obtenu avec une pureté moyenne de 50 % (calculée d'après le chromatogramme UV) et un rendement de 10 % (calculé d'après la masse de produit brut et la pureté UV). Même si la pureté du peptide obtenu n'est pas satisfaisante, cette technique a permis d'éliminer une partie conséquente des impuretés. En effet, l'analyse HPLC-MS, et notamment les spectres de masse du produit montrent une disparition de nombreux pics de masse ne correspondant pas au peptide attendu (Figure 89).

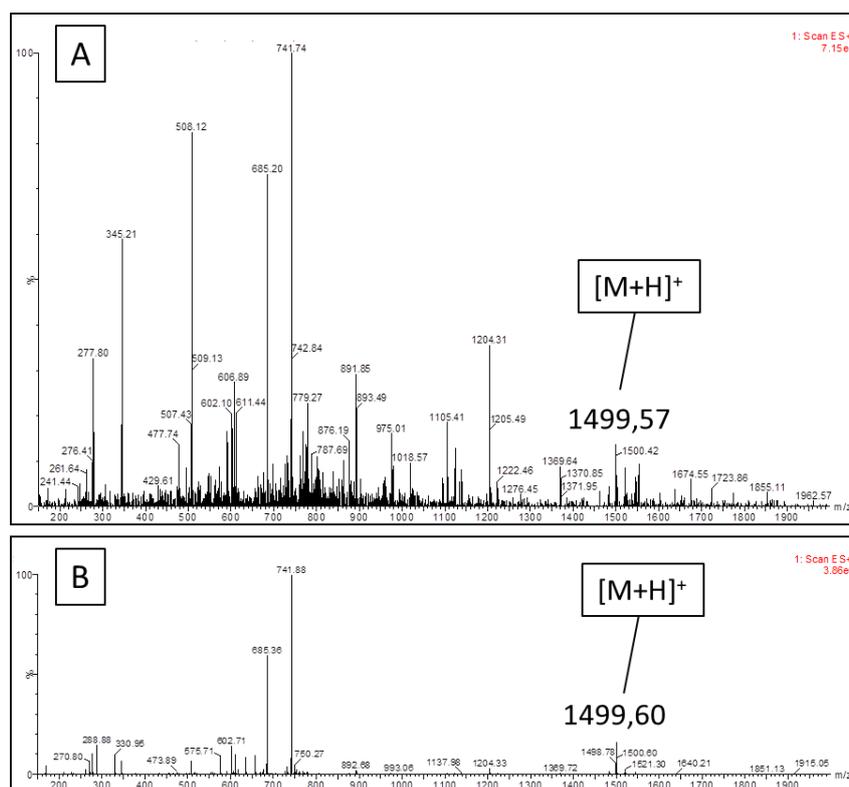


Figure 89 : Spectres de masse du peptide HCV6-S1 avant (A) et après (B) purification manuelle

### 4.2. Synthèse de la Série 2

Les séquences de la série 2 (S2) ont été préparées en introduisant un résidu lysine dont la fonction amine de la chaîne latérale est protégée par un groupement méthyltrityle (Mtt). Ce dernier est déprotégé sélectivement en fin d'élongation de chaîne par plusieurs lavages rapides utilisant une solution de TFA diluée dans le DCM. L'acide lipoïque est alors couplé sur la chaîne latérale en utilisant HBTU ou TBTU comme activateur et la NMM comme base, puis le peptide est clivé de la résine dans des conditions classiques (Schéma 53).

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

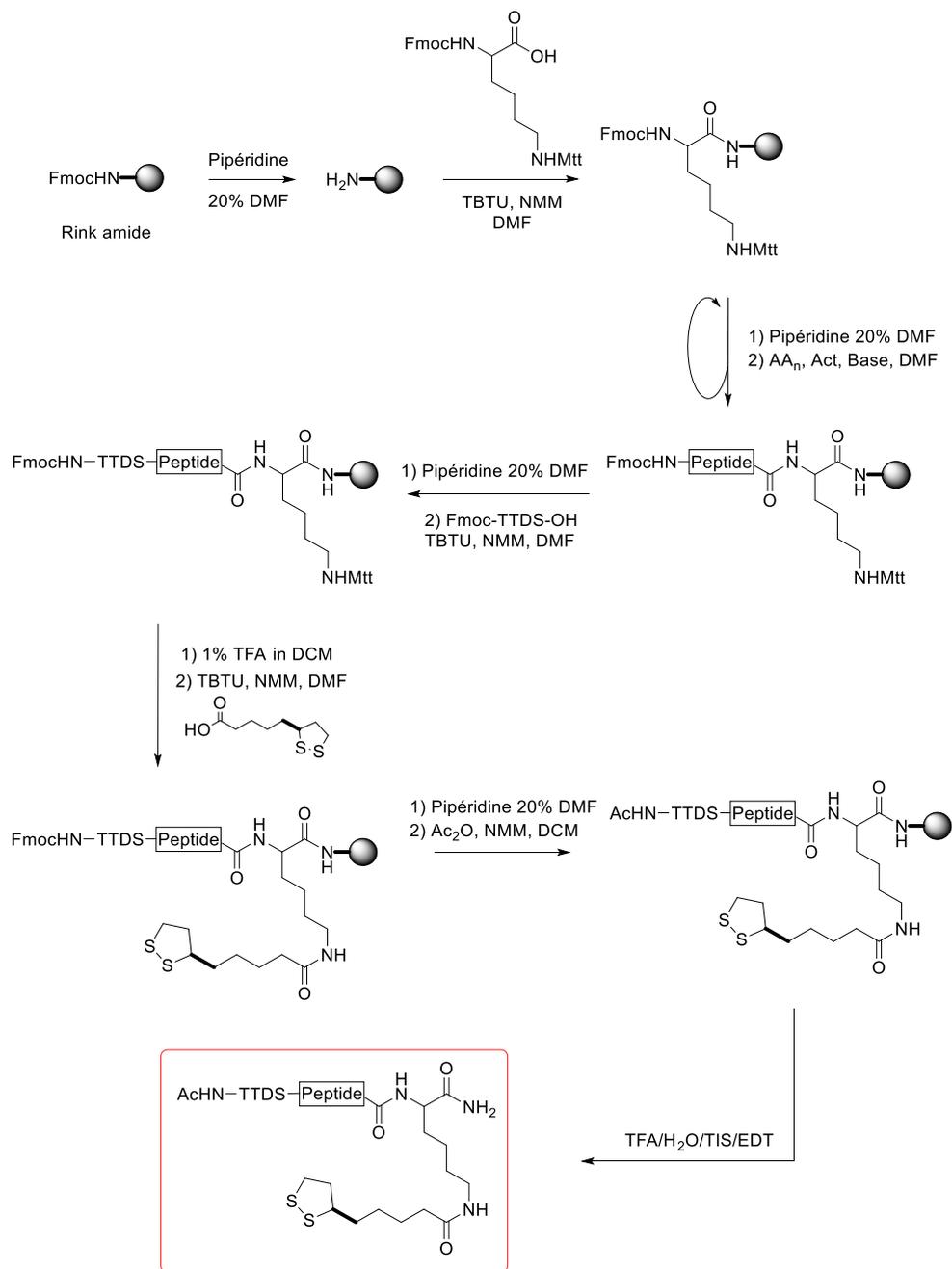


Schéma 53 : Schéma de synthèse des peptides de la Série 2 par SPPS

La synthèse de cette série a également soulevé un certain nombre de difficultés. En effet, les séquences de S2 ont tendance à s'oxyder du fait de la présence de l'acide lipoïque. Ainsi, lors de la synthèse de Tat-S2, le clivage par une solution d'acide trifluoroacétique, eau et triisopropylsilane (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS 97/2/1 (v/v/v)) a donné un mélange entre le produit attendu et des produits de suroxydation correspondant aux masses M+16 et M+32 (Figure 90). En revanche, le clivage utilisant une solution contenant un agent réducteur, l'éthanedithiol (TFA/H<sub>2</sub>O/TIS/EDT 95/1/2/2 (v/v/v/v)), a donné le peptide attendu majoritairement, en mélange avec les produits de suroxydation, mais également un produit de réduction du dithiolane présent dans l'acide lipoïque, correspondant à la masse M+2. L'utilisation de ce deuxième cocktail de clivage et une purification par RP-HPLC a permis d'obtenir le peptide avec une excellente pureté (supérieure à 95 %) et un rendement correct (14 %).

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

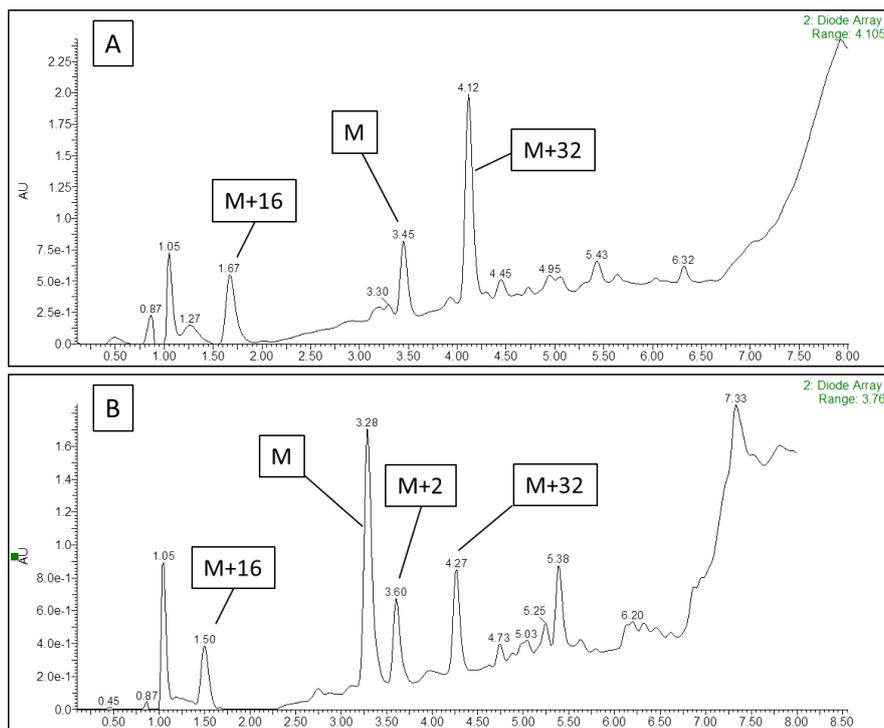


Figure 90 : Chromatogramme UV de TAT-S2 brut après clivage sans EDT (A) et avec EDT (B)  
 M correspond à la masse du peptide attendu.

De même, lors de la synthèse de HCV3-S2, une analyse HPLC-MS après clivage du peptide par une solution TFA/TIS/H<sub>2</sub>O, a confirmé la présence du peptide attendu sous deux formes : la forme dithiolane ( $[M+H]^+ = 1193,48$  Da) et la forme réduite dithiol ( $[M+H]^+ = 1195,48$  Da). Le peptide a alors été ré-oxydé à l'air pendant 1h30 ne donnant que la forme dithiolane (Schéma 54).

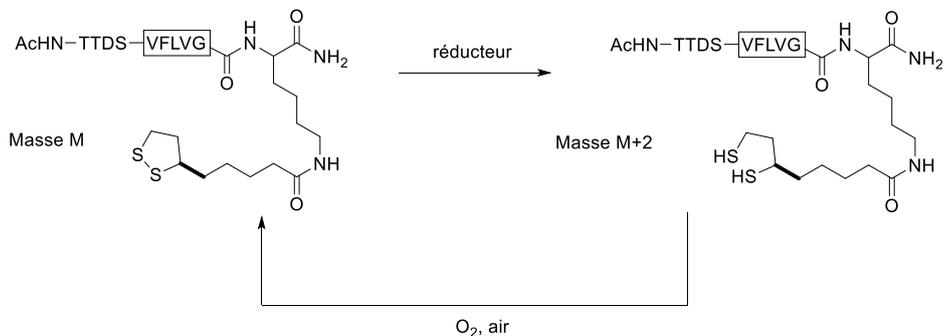


Schéma 54 : Formes dithiolane (gauche) et dithiol réduite (droite) obtenues après synthèse

Néanmoins, comme HCV6-S1, la séquence HCV3-S2 s'est révélée peu soluble dans des mélanges ACN/H<sub>2</sub>O. Une purification manuelle sur gel de silice en phase normale a tout de même permis d'obtenir le peptide avec une pureté correcte (supérieure à 85 %) mais un rendement très faible (2 %). Devant les difficultés de synthèse rencontrées, notamment la pureté de HCV3-S2 et son faible rendement, les peptides HCV6 et HCV7 n'ont pas été synthétisés en série 2 et les analyses d'ondes acoustiques de surface n'ont pas été réalisées.

### 4.3. Synthèse de la Série 3

Les peptides de la Série 3 (S3), conjugués avec le nucléoside SRO91, ont été obtenus en réalisant un couplage avec le composé **8** préalablement synthétisé. La fonction amine du motif TTDS est alors

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

mise en réaction avec la fonction acide carboxylique du composé **8** en présence de TBTU et NMM dans le DMF (Schéma 55). La déprotection finale par une solution acide de TFA permet non seulement de cliver les groupements protecteurs permanents ainsi que l'isopropylidène du nucléoside, mais également de séparer le peptide de la résine.

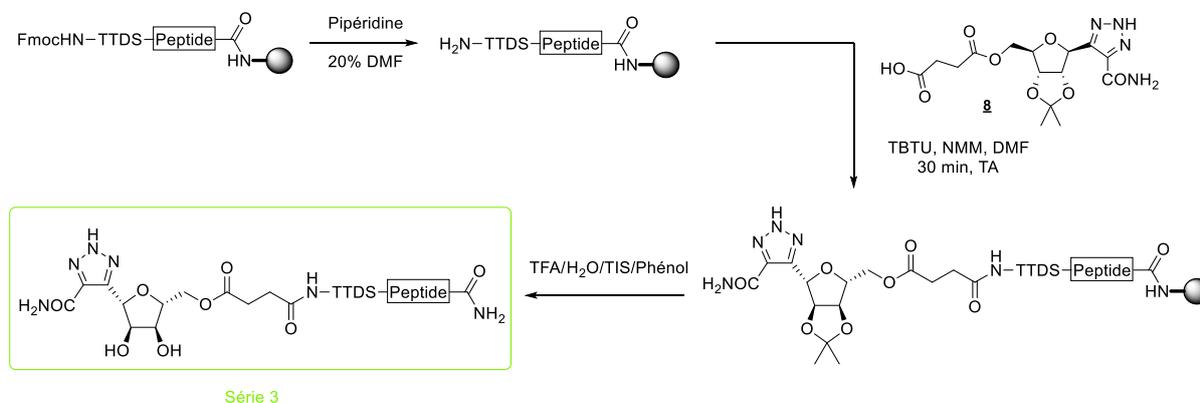


Schéma 55 : Schéma de synthèse des peptides de la Série 3 par SPPS

Compte tenu des problèmes rencontrés lors des synthèses, les séquences les plus hydrophobes (HCV3 et HCV6) n'ont pas été conjuguées au nucléoside du fait de leur faible solubilité. Ainsi seuls les conjugués TAT-S3 et HCV7-S3 ont été obtenus avec des puretés supérieures à 95 % et un rendement de 55 et 12 % respectivement.

### 4.4. Synthèse des Séries 1' et 1''

La conjugaison avec le fluorophore NBD devait initialement s'effectuer sur l'amine du motif TTDS des différentes séquences peptidiques. Pour cela, le peptide supporté est déprotégé par la pipéridine dans le DMF, puis mis en réaction avec le 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) en présence de base pendant une nuit (Schéma 56). Les peptides Tat-S1' et HCV7-S1' ont ainsi été synthétisés avec une pureté supérieure à 90 % et un rendement de 40 et 16 % respectivement.

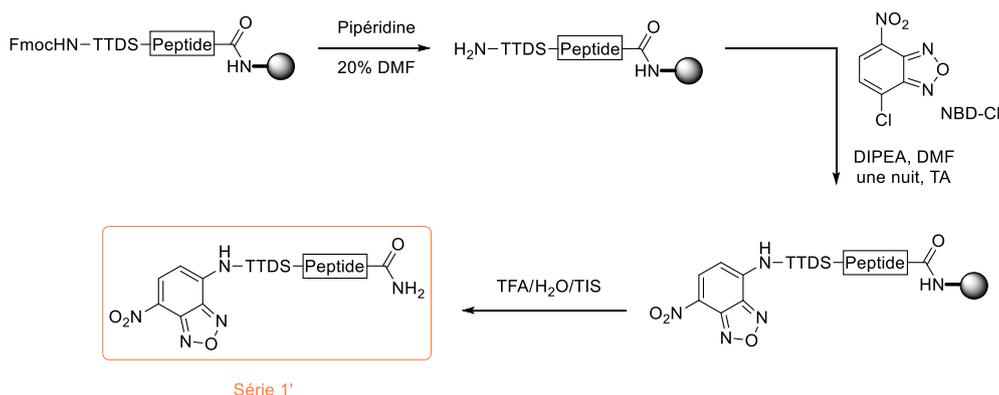


Schéma 56 : Première stratégie de synthèse des séquences de la Série 1' par SPPS

Néanmoins, au vu des difficultés rencontrées lors des synthèses impliquant les séquences HCV3 et HCV6 du fait de leur faible solubilité, ces dernières ont été fonctionnalisées par un résidu lysine à la suite du motif TTDS ; dont la fonction amine de la chaîne latérale sera conjuguée au fluorophore. De cette manière, la fonction amine de cet acide aminé restera libre et devrait apporter une meilleure solubilité en milieu aqueux. Pour la même raison, les synthèses de HCV3-S1' et HCV6-S1' ont été

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

réalisées sur une résine Wang, de manière à obtenir une fonction acide en position C-terminale, apportant plus de solubilité qu'une fonction amide. Pour réaliser cette conjugaison, le groupement protecteur du N<sup>e</sup> du résidu lysine devait être orthogonal au groupement Fmoc du N<sup>α</sup> et des autres groupements permanents. Nous avons choisi d'utiliser le groupement 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)éthyle (Dde) puisque ce dernier peut être déprotégé sélectivement par rapport au groupement Fmoc en utilisant une solution de chlorure d'hydroxylammonium et d'imidazole (Schéma 57).<sup>205</sup>

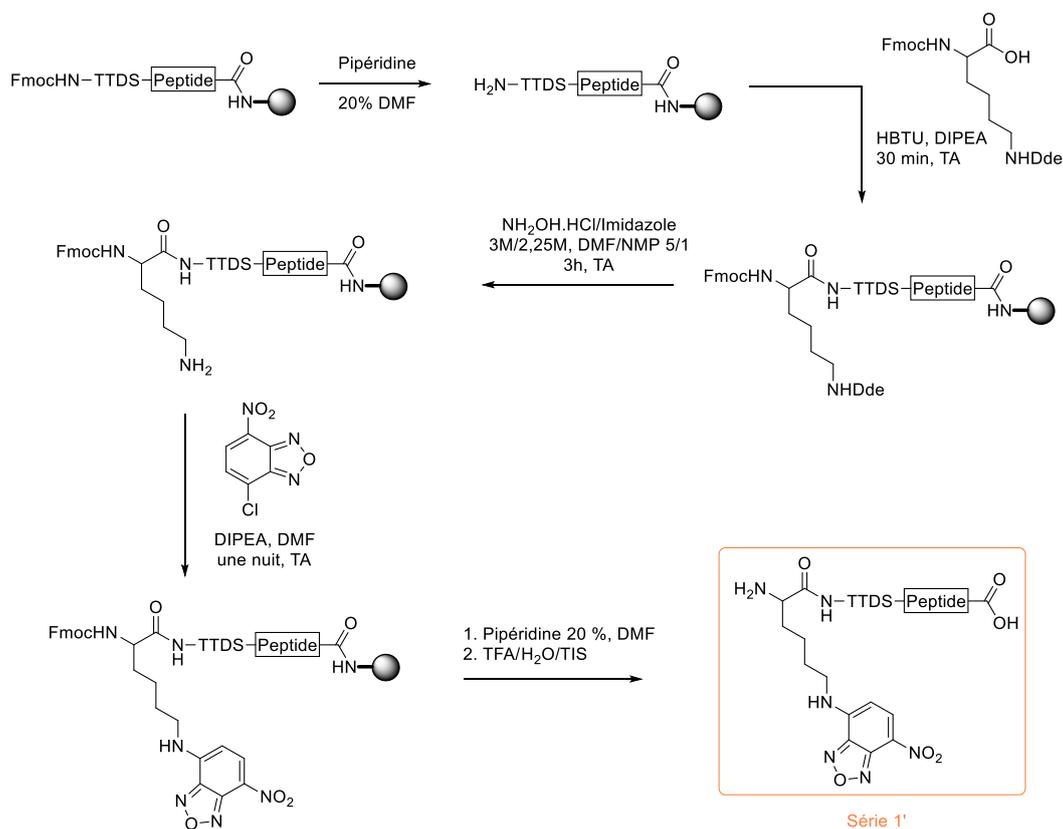


Schéma 57 : Deuxième stratégie de synthèse des peptides de la Série 1' par SPPS

La déprotection du groupement Dde en utilisant une solution  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ /imidazole (3M/2,25M) dans un mélange DMF/NMP (5/1) à température ambiante pendant 3h a ainsi permis, après déprotection finale, d'obtenir les peptides HCV3-S1' et HCV6-S1' avec une pureté supérieure à 95 % et un rendement de 15 et 18 % respectivement.

Par la suite, les analyses par spectrofluorescence ont montré, notamment sur le peptide Tat, que le motif TTDS fausse les résultats d'internalisation dans des liposomes, voire gêne l'interaction peptide/membrane (*cf* Chapitre IV). Il a alors été décidé de synthétiser ces conjugués sans l'espaceur TTDS. Etant donné l'hydrophobie importante des séquences étudiées, le fluorophore a été couplé sur une chaîne latérale d'un résidu lysine introduit en position N-terminale. A nouveau, la présence d'une fonction amine libre devrait pallier la perte du motif oligoglycol pour des raisons de solubilité. Néanmoins, du fait des difficultés de synthèse et de purification rencontrées avec HCV3 et HCV6, cette nouvelle structure (Série 1'', S1'') n'a été appliquée qu'à HCV7. Le conjugué HCV7-S1'' a ainsi été synthétisé en utilisant une lysine dont la chaîne latérale est protégée par un groupement Dde, et les

<sup>205</sup> Díaz-Mochón, J. J.; Bialy, L.; Bradley, M. *Org. Lett.* **2004**, *7*, 1127–1129.

## Chapitre III : Amélioration de la pénétration membranaire

conditions décrites précédemment, avec une pureté supérieure à 95 % et un rendement de 9 % (Figure 91).

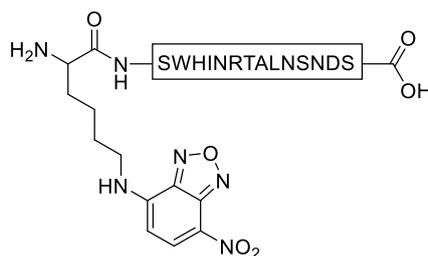


Figure 91: Structure du peptide HCV7-S1''

### 5. Conclusion sur la synthèse des peptides de fusion du VHC

Ainsi, les différentes séquences étudiées (Tat, HCV3, HCV6 et HCV7) ont pu être synthétisées et fonctionnalisées par différents motifs. Si les séquences libres (Série 0) n'ont pas soulevé de problèmes majeurs, la présence d'un groupement acétyle en position *N*-terminal et une fonction amide en *C*-terminal de la Série 1 diminue grandement la solubilité de ces séquences hydrophobes. Les études d'interaction avec les liposomes (calorimétrie, spectrofluorescence et microscopie) s'effectuant dans un tampon aqueux, les peptides de la Série 1 ne pourront pas être utilisés à des concentrations suffisantes pour permettre une analyse pertinente.

La synthèse des peptides de la Série 2 s'est également révélée délicate du fait de problèmes de suroxydation des produits, mais aussi de solubilité. De fait, les peptides HCV6-S2 et HCV7-S2 n'ont pas été synthétisés et les analyses d'ondes acoustiques de surface (SAW) ne seront pas réalisées.

La conjugaison avec le nucléoside SRO91 s'est révélée efficace. Néanmoins, compte tenu des difficultés rencontrées lors des autres synthèses, seules les séquences les plus solubles ont été conjuguées (Tat et HCV7). Les peptides Tat-S3 et HCV7-S3 ainsi obtenus devront être testés pour leur activité anti-VHC.

Enfin, si les séquences Tat et HCV7 relativement solubles ont été conjuguées au fluorophore NBD par simple couplage en position *N*-terminale, les séquences HCV3 et HCV6 ont nécessité la fonctionnalisation de la chaîne latérale d'un résidu Lys introduit en position *N*-terminale. Les analyses par spectrofluorescence montrant que le motif TTDS introduit pour apporter de la solubilité n'était pas pertinent, une nouvelle structure du peptide HCV7 (HCV7-S1'') a été préparée afin de réaliser des essais d'internalisation sur des liposomes comme modèles de membranes cellulaires.

