

Tables des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	13
CHAPITRE I : INTRODUCTION	17
1. LES PEPTIDES PENETRANTS OU CPP	18
1.1 Découverte des CPP : des séquences dérivées de domaines protéiques capables de pénétrer dans les cellules	19
1.1.1 La Pénétratine ou pAntp	19
1.1.2 Le peptide Tat(48-60)	22
1.2 Différentes catégories de CPP	23
2. LA MEMBRANE PLASMIQUE	27
2.1 Composants de la membrane pouvant être impliqués dans les processus d'internalisation des CPP	28
2.1.1 Les lipides membranaires	28
2.1.2 Les sucres membranaires	31
3. MECANISMES D'INTERNALISATION CELLULAIRE DES CPP	34
3.1 Une première étape décisive : l'interaction des CPP avec la membrane plasmique	35
3.2 L'endocytose	40
3.3 La translocation directe de la membrane	45
4. METHODES DE SUIVI DE L'INTERNALISATION	49
4.1 Techniques basées sur la fluorescence	49
4.2 Technique basée sur la spectrométrie de masse	53
4.3 Microscopie électronique	53
4.4 Techniques basées sur une réponse biologique induite	54

5. OPTIMISATION DES PROPRIETES DES CPP	57
5.1 Favoriser la fuite des endosomes	57
5.2 Modifications chimiques des CPP	59
5.2.1 Pseudo-peptides linéaires	60
5.2.2 Structures arborescentes	64
5.2.3 CPP fonctionnalisés par des chaînes d'acide gras	66
5.2.4 CPP cycliques	68
 CHAPITRE II : JUSTIFICATION DU DESIGN ET DE L'APPROCHE SYNTHETIQUE	 77
1. OBJECTIFS	78
2. STRUCTURES DES CONJUGUES	79
2.1 Incorporation de chaînes aliphatiques et cyclisation	79
2.2 Nature du lien entre le CPP et l'espèce transportée	83
3. CHOIX DE L'APPROCHE SYNTHETIQUE UTILISEE	84
3.1 Méthodes de synthèses des CPP cycliques utilisées dans la littérature	84
3.2 Synthèse des peptides cycliques par ligation chimique native	85
(Native Chemical Ligation <i>NCL</i>)	
3.2.1 La ligation chimique native	85
3.2.2 Stratégies existantes pour générer les peptides thioester sur support solide	86
 CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX PEPTIDES VECTEURS CYCLIQUES	 95
1. SYNTHESSES DES TRANSPORTEURS PEPTIDIQUES	96
1.1 Cyclisation de CPP classiques	96
1.1.1 Synthèse sur support solide en stratégie Boc des peptides thioester	96
1.1.2 Cyclisation des peptides thioester par ligation chimique native	99

2. SYNTHÈSE SUR SUPPORT SOLIDE EN STRATÉGIE FMOC DE PEPTIDES COMPORTANT UNE α -MÉTHYLE CYSTEINE C-TERMINALE	102
2.1 Cyclisation des dérivés α -méthyle cystéine	103
3. SYNTHÈSE DES VECTEURS LIPOPEPTIDIQUES CYCLIQUES	106
4. CONJUGAISON DES CPP CYCLIQUES A LEUR CARGAISON	109
4.1 Synthèse et conjugaison des CPP linéaires de référence	110
CHAPITRE IV : EVALUATIONS BIOLOGIQUES	113
1. L'ESPECE VECTORISÉE : LE PKCI, UN PEPTIDE INHIBITEUR DES PROTEINES KINASES C	114
2. QUANTIFICATION DE L'INTERNALISATION CELLULAIRE DE PEPTIDES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE	115
2.1 Principe de la technique	115
2.2 Protocole de quantification par spectrométrie de masse MALDI-TOF	117
3. EVALUATION DES PROPRIÉTÉS DE VECTORISATION	119
3.1 Peptides vecteurs classiques linéaires	119
3.2 Effet de la cyclisation de ces CPP classiques	121
3.3 Impact de la fonctionnalisation des CPP [R ₉] et [Pen] par une chaîne lauryl	122
3.4 Etude du mécanisme d'entrée des CPP classiques linéaires et cycliques	124
4. ÉTUDE DE TRANSPORTEURS OLIGO-ARGININE CYCLIQUES FONCTIONNALISÉS PAR UNE CHAÎNE D'ACIDE GRAS	126
4.1 Etude des transporteurs lipopeptidiques : influence de la taille de la chaîne aliphatique	127

4.2 Etude des transporteurs lipopeptidiques : influence du nombre d'arginines	128
4.3 Etude des transporteurs lipopeptidiques : influence de la position de la chaîne aliphatique	130
4.4 Etude des transporteurs lipopeptidiques : effet de la substitution de la chaîne lauryl par des aminoacides hydrophobes	132
4.5 Etude des transporteurs lipopeptidiques : évaluation de la participation des GAG de surface dans le mécanisme d'entrée	134
5. Etude de la survie cellulaire	137
5.1 Principe du test de viabilité cellulaire	137
5.2 Etude de la cytotoxicité	138
CHAPITRE V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	141
CHAPITRE VI : MATERIELS ET METHODES	145
CHAPITRE VII : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	162
CHAPITRE VIII : PUBLICATION	175

Abréviations

Abz	acide aminobenzoïque
Ac	acétyle
AcOH	acide acétique
ADN	acide désoxyribonucléique
Ahx	acide 6-aminohéxanoïque
AMP	peptides antimicrobiens
Antp	Antennapedia
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
Biot	biotine
Biot(O ₂)	biotine sulfone
BisOrn	bis-ornithine
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
BSA	bovin serum albumin
CCK-8	cell counting kit-8
CD	cyclodextrine
CF	5,6-carboxyfluorescéine
CFP	cyan fluorescent protein
CHCA	acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CHO	chinese hamster ovary
CPP	cell penetrating peptide
CPZ	chlorpromazine
CQ	chloroquine
CS	chondroïtine sulfate
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DIPEA	<i>N, N</i> -diisopropyléthylamine
DMEM	Dubelcco's modified eagle medium
DMF	<i>N, N</i> -diméthylformamide
DTT	dithiothréitol

EDT	éthanedithiol
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EIPA	éthylisopropylamiloride
éq.	équivalent
EtOH	éthanol
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	5,6-carboxyfluoresceine isothiocyanate
FIAsH	fluorescein arsenical hairpin binder
Fmoc	9-fluorenylméthoxy-carbonyl
FRET	fluorescent resonance energy transfer ou förster resonance energy transfer
GAG	glycosaminoglycane
GFP	green fluorescent protein
GP	groupement protecteur
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GSH	glutathion
HBTU	O-(benzotriazol-1-yl)- <i>N, N, N', N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphate
HeLa	Henrietta Lacks
HOBt	hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HS	héparanes sulfate
HSPG	protéoglycane à héparane sulfate
LUV	large unilamellar vesicle
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
MAP	model amphipatic peptide
MBHA-PS	4-méthyl-benzhydramine polystyrène
MCD	méthyl β -cyclodextrine
MeOH	méthanol
Myr	myristyle
NBD	7-nitrobenz-2-oxo-1, 3-diazol
NLS	nuclear localisation sequence
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone

Npys	3-nitro-2-pyridinesulphenyl
NYS	nystatine
PC	phosphatidylcholine
PCI	photochemical internalization
PE	phosphatidyléthanolamine
PG-1	protegrin-1
PK	protéine kinase
PKC	protéine kinase C
PKCi	inhibiteur des protéines kinases C
PMO	phosphorodiamidate morpholino oligomer
PNA	peptide nucleic acid
PPII	polyproline II
PS	phosphatidylsérine
PTD	protein transduction domains
RMN	résonance magnétique nucléaire
SCO	splice correcting oligonucleotides
SDS	dodécylsulphate de sodium
SM	sphingomyéline
SPPS	solide phase peptide synthesis
Tat	trans-activator of transcription
TEM	microscopie électronique à transmission
TES	triéthylsilane
TFA	acide trifluoroacétique
TIPS	triisopropylsilane
t_R	temps de rétention
$\tau_{1/2}$	temps de demi-réaction
Tris	trishydroxyméthylaminométhane
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

I - INTRODUCTION

I. Introduction

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis intéressé au développement de nouveaux peptides vecteurs ayant une capacité accrue à délivrer une substance bioactive au sein des cellules. Dans l'objectif de développer des vecteurs plus performants et enzymatiquement plus stables, je me suis intéressé à la cyclisation des peptides pénétrants et à leur fonctionnalisation par une chaîne lipidique. J'ai étudié l'impact de ces modifications sur l'efficacité et le mécanisme d'entrée.

1. Les peptides pénétrants ou CPP

Le domaine de recherche portant sur les peptides pénétrants (cell-penetrating peptides, CPP), alternativement appelés « protein transduction domains » (PTD), a connu un intérêt grandissant ces vingt dernières années. Les peptides vecteurs constituent des outils prometteurs pour la délivrance de molécules bioactives dans les cellules. Ils joueraient donc un rôle clé dans le développement futur d'agents thérapeutiques.¹ Il a été montré que les CPP amélioraient efficacement la délivrance intracellulaire à la fois *in vitro* et *in vivo* de diverses biomolécules. Les espèces transportées incluent des oligonucléotides et analogues dont des siRNA (petits ARN interférents), des PNA (acide nucléique peptidique), des peptides et protéines.¹

En 1988, il a été montré que la protéine d'activation de la transcription Tat,² impliquée dans la réplication du virus de l'immunodéficience humaine VIH-1, était capable de pénétrer dans les cellules. Peu de temps après, en 1991, le facteur de transcription correspondant à l'homéoprotéine *Antennapedia* a également montré des capacités d'internalisation.³ Cela a conduit à la découverte de séquences, au sein de ces protéines, responsables de ce phénomène de pénétration.^{4,5} Cette découverte a stimulé la recherche de nouvelles séquences peptidiques ayant l'habilité à traverser la membrane plasmique et conduit à la conception rationnelle de CPP dits « synthétiques », comme les peptides MAP (model amphipatic peptide)⁶ ou encore le peptide cationique (Arg)₉.⁷ Des peptides

chimères, composés de segments de différentes protéines, ont également été proposés comme le Transportan,⁸ Pep-1,⁹ et MPG.¹⁰

1.1 Découverte des CPP : des séquences dérivées de domaines protéiques capables de pénétrer dans les cellules

1.1.1 La Pénétratine ou pAntp

Les homéoprotéines constituent une classe de facteurs de transcription impliqués dans certains processus clés du développement embryonnaire. Ces protéines se lient à l'ADN via un domaine conservé de 60 acides aminés, appelé homéodomaine, extrêmement structuré et comportant 3 hélices α et un coude β entre les hélices 2 et 3.¹¹ En 1993, le groupe d'Alain Prochiantz a montré que la séquence correspondant à l'homéodomaine d'*Antennapedia*, issue d'un gène homéotique de la drosophile, était capable, *in vitro*, de traverser la membrane de neurones de rats, et d'atteindre leurs noyaux.¹² Ce phénomène a été observé sur toutes les lignées cellulaires que les auteurs ont utilisées. Afin de mieux comprendre le processus d'internalisation, l'homéodomaine a été muté. Au cours de cette étude, le dérivé pAntp48S comportant diverses mutations au sein de l'hélice 3 a été généré, le résidu Gln50 étant remplacé par une sérine et les deux résidus hydrophobes Trp48 et Phe49 étant supprimés.¹³ Il a ainsi été montré que, contrairement à la version intégrale de l'homéodomaine, pAntp48S ne s'internalise pas. Il est à noter que ces deux résidus hydrophobes sont conservés dans tous les homéodomains séquencés à ce jour, soulignant leur rôle important.¹⁴ Ce résultat suggérait que la région C-terminale de l'homéodomaine était essentielle pour l'internalisation. Par la suite, grâce à l'étude de différentes séquences dérivées de cette région (**Figure 1**),⁵ il a été montré que les 16 résidus (43-58) constituant l'hélice 3 étaient essentiels et suffisants pour l'entrée dans les cellules. Cette séquence est maintenant appelée Pénétratine.

Des versions tronquées aux extrémités N ou C terminales du peptide, ont été testées, et n'ont montré aucune propriété de pénétration. Ainsi les études des séquences pAntp(41-55) et pAntp(46-60) ont signalé l'importance de nombreux résidus basiques (Arg43, Lys57, Lys58) et hydrophobe (Trp56) se trouvant dans les régions qui avaient été tronquées. Le rôle

majeur de ces résidus sur l'efficacité d'internalisation a été validé par des études de mutations.¹⁵

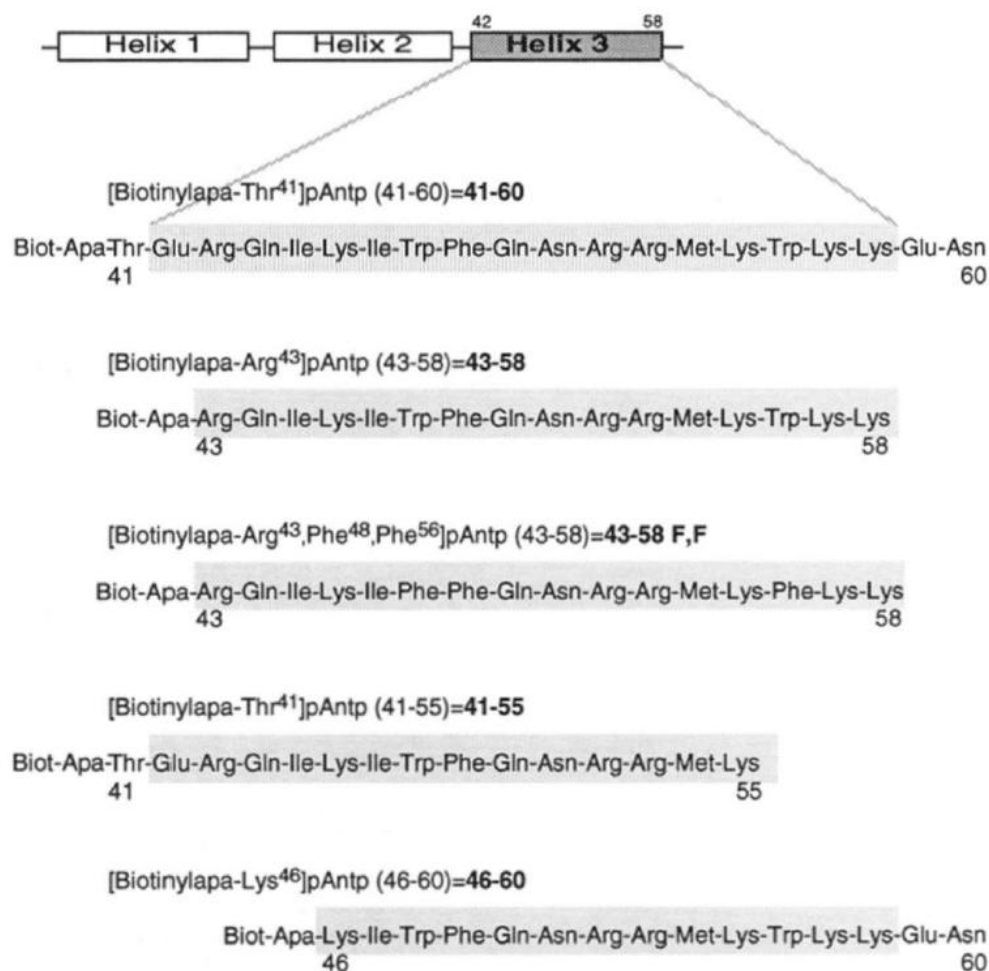


Figure 1 – Séquence de l'Hélice 3 de l'homéodomaine d'Antennapedia et des peptides dérivés. (Source : Réf. ⁵)

Les mécanismes d'internalisation des CPP seront développés plus loin dans ce manuscrit (chapitre I.3). On peut néanmoins déjà mentionner l'existence de deux voies d'entrée. La première voie correspond à la translocation directe de la membrane plasmique, mécanisme qui ne requiert pas d'énergie et qui conduit dans un premier temps à une localisation du vecteur et de sa cargaison au niveau du cytosol. La seconde voie correspond à l'endocytose (mécanisme énergie-dépendant), qui nécessitera le franchissement de la membrane endosomale afin d'atteindre une région d'intérêt de la cellule.

Les premières études ont montré que, de la même manière que l'homéodomaine, la Pénétratine s'internalise à 37°C (par endocytose et translocation directe) et aussi à 4°C

(température à laquelle l'endocytose est inhibée mais pas la translocation). Le peptide, après internalisation, est localisé dans le cytosol ainsi que dans le noyau et aucune dégradation du peptide n'est détectée après 2h30 d'incubation. De plus, la version composée d'acides aminés de configuration D et la version de séquence inversée gardent la même efficacité d'internalisation que le peptide Pénétratine d'origine.¹⁶ Ceci a conduit à la conclusion, qu'aucune reconnaissance par un récepteur membranaire chiral n'est requise pour l'internalisation cellulaire. C'est ainsi qu'a été proposé le premier CPP ou peptide Troyen, qui fut alors défini comme un peptide ayant la capacité de franchir la membrane des cellules selon un mécanisme n'impliquant pas de récepteur et ne nécessitant pas d'énergie appelé « translocation directe ». Ce concept était alors complètement nouveau, allant à l'encontre du dogme de l'imperméabilité de la membrane plasmique vis-à-vis de composés hydrophiles de poids moléculaire élevé.⁵

Par la suite, des analyses de mutations sur la séquence de la Pénétratine, ont confirmé la contribution importante de certains résidus pour le phénomène d'entrée. Ainsi, les substitutions des résidus basiques lysine et arginine (**K46A/R53A**, **K46A/K57A**, **R53A/K57A** et **R52A/K55A**) par une alanine diminuent l'efficacité d'entrée.¹⁵ Ces mutations augmentent l'hydrophobie du peptide et diminuent considérablement sa capacité d'établir des interactions électrostatiques avec des composants membranaires chargés négativement potentiellement nécessaires pour l'entrée dans la cellule. La contribution de certains résidus hydrophobes a également été confirmée. En effet, la substitution des deux tryptophanes par deux résidus phénylalanine (**W48/F**, **W56/F**) diminue l'efficacité d'entrée dans les cellules certainement parce que les interactions peptide / membrane sont modifiées.^{5,17} En revanche, ni la structuration du peptide en hélice α , ni le caractère amphiphile de la séquence ne semblent nécessaires à l'internalisation. En effet, l'introduction de résidus proline au sein de la séquence de la Pénétratine (diminuant la structuration en hélice) n'entraîne pas de diminution de l'efficacité d'entrée dans la cellule. De plus, l'augmentation du caractère amphipathique de la Pénétratine par les mutations **N51/A**, **R52/A** et **K55/L**, augmenterait plus sa toxicité que son efficacité d'internalisation.^{16,18}

1.1.2 Le peptide Tat(48-60)

Le peptide Tat(48-60) est dérivé de la petite protéine Tat du VIH qui comporte de 86 à 101 acides aminés selon la souche virale. Cette protéine est composée de cinq domaines fonctionnels différents (**Figure 2**) : (1) une région N-terminale riche en résidus acides, (2) un domaine riche en cystéines nécessaire pour la transactivation, (3) un motif RKGLGI commun à VIH-1 et VIH-2, (4) un domaine basique responsable de la localisation nucléaire et de la transduction de la protéine et (5) un domaine contenant la séquence RGD de liaison aux intégrines, et la séquence ESKKKVE conservée dans VIH-1 et VIH-2.¹⁹

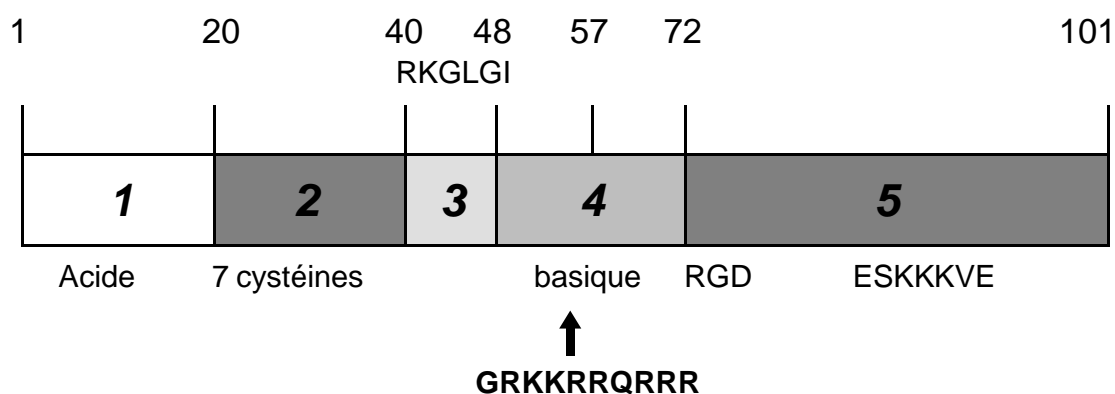


Figure 2 – Domaines de la protéine Tat. (Source : Réf. ¹⁹)

En 1988, alors qu'ils développaient un test pour mesurer l'activité de la protéine Tat, A. D. Frankel et C. O. Pabo découvrent incidemment que la protéine purifiée peut être internalisée dans les cellules et atteindre leur noyau et ainsi activer le promoteur du VIH-1.² Quelques temps après, des études menées sur les différents domaines de la protéine Tat et des dérivés mutés, ont permis d'identifier les deux régions essentielles à la transactivation et à la liaison à l'ADN.²⁰ En 1997, le groupe dirigé par B. Lebleu, découvre que la région responsable de l'internalisation de la protéine Tat est centrée entre les domaines 3 et 4 (résidus 38 à 72).⁴ Afin d'étudier le mécanisme d'internalisation, les auteurs ont réduit la taille du peptide à une séquence regroupant à la fois le domaine responsable de la localisation nucléaire et de la transduction de la protéine (résidus 37 à 60). Ce peptide a ensuite été comparé à trois autres séquences correspondant aux versions tronquées aux extrémités N et C terminales (**Figure 3**).

TAT48-60	C(Acm)GRKKRRQRRRPPQ
TAT43-60	C(Acm)<u>LG</u>ISYGRKKRRQRRRPPQ
TAT37-60	C(Acm)<u>FITKAL</u>GISYGRKKRRQRRRPPQ
TAT37-53	C(Acm)<u>FITKAL</u>GISYGRKKRRC

Figure 3 – Séquences peptidiques dérivées de la protéine Tat (les résidus hydrophobes soulignés sont impliqués dans la structuration en hélice α du peptide). C(Acm) = Cystéine-S-acétamidométhyl. (Source : Réf. ⁴)

Les tests d'internalisation de ces séquences ont alors révélé que le fragment Tat(37-53) (délétion entre autre de trois Arg) ne s'internalise pas, même à très forte concentration, alors que les peptides Tat(43-60) et Tat(48-60) entrent efficacement dans la cellule. Le fragment Tat(48-60) composé uniquement du domaine basique, conduit à une meilleure efficacité d'internalisation dans le noyau comparé à toutes les autres séquences testées dans cette étude. La même année, ce groupe de recherche a également montré que la délétion des 3 résidus situés à l'extrémité C-terminale (**P58**, **P59**, **Q60**) n'a pas d'influence, et que le peptide Tat(48-57) conserve les mêmes propriétés que Tat(48-60).²¹ Il apparaît donc, que la séquence responsable de l'internalisation est fortement cationique. Le groupe de Wender a par ailleurs montré qu'une modification apparemment minime, par la délétion d'une arginine en extrémité C ou N-terminale, diminue considérablement l'efficacité d'internalisation du peptide.⁷ Des études similaires à celles menées sur la Pénétratine, ont révélé que l'internalisation du peptide Tat n'impliquerait pas non plus une reconnaissance par un récepteur membranaire.

1.2 Différentes catégories de CPP

La découverte de ces peptides capables de transporter des composés bioactifs dans le cytosol et noyau, a suscité un vif intérêt au sein de la communauté scientifique, et a conduit à la recherche de nouveaux peptides pénétrants. Ainsi, de nombreux CPP ont été proposés dans la littérature ces dernières années. On peut les classer en trois catégories selon leur origine : les CPP correspondant, comme le peptide Tat et la Pénétratine, à des

domaines de transduction protéiques, les CPP chimériques et enfin, les CPP synthétiques (**Tableau 1**). Au sein de chacune de ces classes, les CPP peuvent présenter des caractéristiques physico-chimiques différentes. Parmi les CPP chimériques issus de la juxtaposition de domaines de protéines différentes, le Transportan⁸ se définit comme un peptide vecteur de 27 acides aminés à l'amphipathie primaire. Il dérive de la fusion entre la Galanine, un neuropeptide de séquence hydrophobe (résidus 1 à 12 du Transportan), et le Mastoparan, peptide de venin de guêpe ayant une nature hydrophile (résidus 14 à 27). L'analyse de l'internalisation du peptide a montré que le Transportan conduisait à une distribution intracellulaire non homogène. Il se localise dans un premier temps dans plusieurs compartiments vésiculaires avant de converger vers le noyau. Afin d'optimiser le vecteur, les auteurs ont synthétisé plusieurs analogues. La délétion des 6 premiers acides aminés de la région hydrophobe a ainsi permis de réduire la toxicité du peptide tout en gardant la même efficacité d'internalisation et a conduit au CPP Tp10.²² Celui-ci a été largement utilisé pour le transport de cargaisons dans la cellule.²³ Le peptide Pep-1 proposé par Morris *et al.*, constitue un autre exemple de vecteur chimérique amphiphile primaire comportant un domaine riche en résidus tryptophane.⁹ Pep-1 permet de délivrer efficacement des peptides et protéines dans les cellules et ne présente aucune toxicité à des concentrations allant jusqu'à 100 µM.

La troisième catégorie de CPP correspond aux séquences synthétiques, conçues de façon rationnelle. Ainsi, J. Oehlke *et al.* ont proposé un peptide de 18 acides aminés sur la base de son caractère amphipathique secondaire : le peptide MAP (model amphipathic peptide).⁶ Afin d'évaluer l'importance du caractère amphipathique, un analogue a été synthétisé gardant le même nombre de résidus basiques mais ayant un caractère amphipathique moindre (MAP : KLALKLALKALKALKLA, Analogue : KALKLKLALALLAKLKL). Cet analogue ne s'internalise pas, suggérant un lien entre les propriétés d'internalisation et l'amphipathie. Pour valider ce résultat, Scheller *et al.* ont étudié une série d'analogues de MAP qui diffèrent par leur séquence, charge et par les paramètres de la structuration de l'hélice. De tous les paramètres cités, seule l'amphipathie semble essentielle pour l'efficacité d'internalisation de MAP.²⁴ Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude sur l'amphipathie de la Pénétratine.¹⁸

Séquence	Origine	Référence
<i>Peptides originaires de domaines protéiques</i>		
Pénétratine	RQIKIWFAQNRRMKWKK	Antennapedia (43-58) [5]
Tat peptide	GRKKRRQRRRPPQ	Tat (48-60) [4]
pVEC	LLIILRRRIRKQAHASK	Cadhérine murine (615-632) [25]
VP22	NAKTRRHERRRKLAIER	Protéine virale du VSH [26]
<i>Peptides synthétiques</i>		
oligo-arginine	RRRRRRRR(R) _n	Séquence dérivée du peptide Tat [7]
MAP	KLALKLALKALKAAKLKLA	Model amphipathic peptide [6]
R ₆ W ₃	RRWWRWRWR	Séquence dérivée de la Pénétratine [27]
CADY	GLWRALWRLLRSLWRLLWRA	Séquence dérivée du peptide PPTGI [28]
<i>Peptides chimériques</i>		
Transportan	GWTLSAGYLLGK INLKALAALAKKIL	Galanine / Mastoparan [8]
Pep-1	KETWWETWWTEWSQP KKKRKV	Transcriptase (VIH) / Antigène T (SV40) [9]
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQP KKKRKV	gp41 (VIH) / Antigène T (SV40) [10]
<i>Peptides antimicrobiens</i>		
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	Protégrine-1 [29]
SynB3	RRLSYSRRRF	Protégrine-1 [29]

Tableau 1 – Exemple de peptides vecteurs (en gras sont indiqués les résidus basiques)

Les études menées sur le peptide Tat(49-57) avaient mis à jour l'importance des résidus basiques. Sur les 9 aminoacides composant sa séquence, deux sont des lysines et six sont des arginines. Ceci a conduit l'équipe de P. Wender à tester l'activité d'une série d'homo-oligomères d'arginine ayant de 5 à 9 résidus. Dans cette série, le peptide Arg₉ présentait l'internalisation la plus élevée.⁷ La même année, l'étude de peptides Arg_n (n = 4-16) par S. Futaki *et al.* a confirmé que le nombre optimal d'Arg est compris entre 8 et 9.³⁰ En dessous de 6 Arg, l'internalisation cellulaire est minime et elle est inexistante pour Arg₄. Au-delà de 9 résidus, une baisse significative d'internalisation et une augmentation de la cytotoxicité du vecteur sont observées.

L'étude structure-activité de la Pénétratine avait également révélé le rôle essentiel des résidus tryptophane. Sur la base de cette étude, le peptide R₁₀W₆ (**RRWRRWWRRWWRRWRR**) avait été proposé par les groupes de G. Chassaing et A. Prochiantz.³¹ Ce peptide s'internalise efficacement dans les cellules sans être cytotoxique, contrairement à l'analogue R₁₀L₆ (comportant des Leu à la place des Trp), montrant l'importance de la nature des résidus hydrophobes.^{24,32} Par la suite, il a été montré que la taille du CPP pouvait être réduite à 9 résidus pour conduire au peptide R₆W₃ (**Tableau 1**) qui se révèle être un des CPP classiques les plus efficaces.²⁷

Les peptides antimicrobiens peuvent constituer une autre source de CPP. Par exemple, les peptides SynB constituent une catégorie de vecteurs dérivés de la protégrine-1 (PG-1), un peptide amphipathique de 18 résidus qui exerce sa fonction antimicrobienne par formation de pores dans la membrane bactérienne.²⁹ Deux analogues SynB1 et SynB3 ont montré une capacité de pénétration dans les cellules eucaryotes et permis le transport de plusieurs médicaments comme la doxorubicine et la benzylpénicilline.

Il apparaît donc des différentes études sur les CPP que l'amphipathie primaire ou secondaire, le nombre et la nature des résidus cationiques (arginines) et la présence de résidus hydrophobes (tryptophanes) peuvent être des paramètres importants mais non indispensables pour l'efficacité d'internalisation puisque des CPP efficaces ne présentant pas toutes ces caractéristiques ont été décrits. A l'heure actuelle, il reste difficile de trouver une corrélation entre les propriétés physico-chimiques des CPP et leur efficacité ou leur mécanisme d'internalisation. En outre, dans l'interprétation des performances des CPP, il faut accorder une importance substantielle, à la fois à la composition membranaire de la

souche cellulaire utilisée et au type de cargaison transportée par le CPP. De plus, à ce jour, certains peptides pénétrants ont été caractérisés en fonction de leur habilité à traverser « seuls » la membrane plasmique, mais n'ont pas encore été appliqués en tant que vecteurs de cargaison.

2. La membrane plasmique

La membrane plasmique est une enveloppe continue délimitant la cellule, formant ainsi une barrière naturelle séparant deux compartiments, le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Elle se compose essentiellement de phospholipides assemblés en bicouche, de glucides, et de protéines (**Figure 4**). La membrane plasmique assure le maintien de la composition du milieu intracellulaire grâce à un contrôle sélectif des entrées et sorties de la cellule. Seules les molécules hydrophobes telles que certaines hormones stéroïdes peuvent diffuser à travers la membrane. La bicouche lipidique est par contre imperméable aux molécules hydrophiles. Le passage des petites molécules essentielles à la survie de la cellule comme les sucres, les acides aminés et les ions se fait *via* des transporteurs ou canaux. Les composés de poids moléculaire plus élevé sont quant à eux internalisés *via* endocytose.

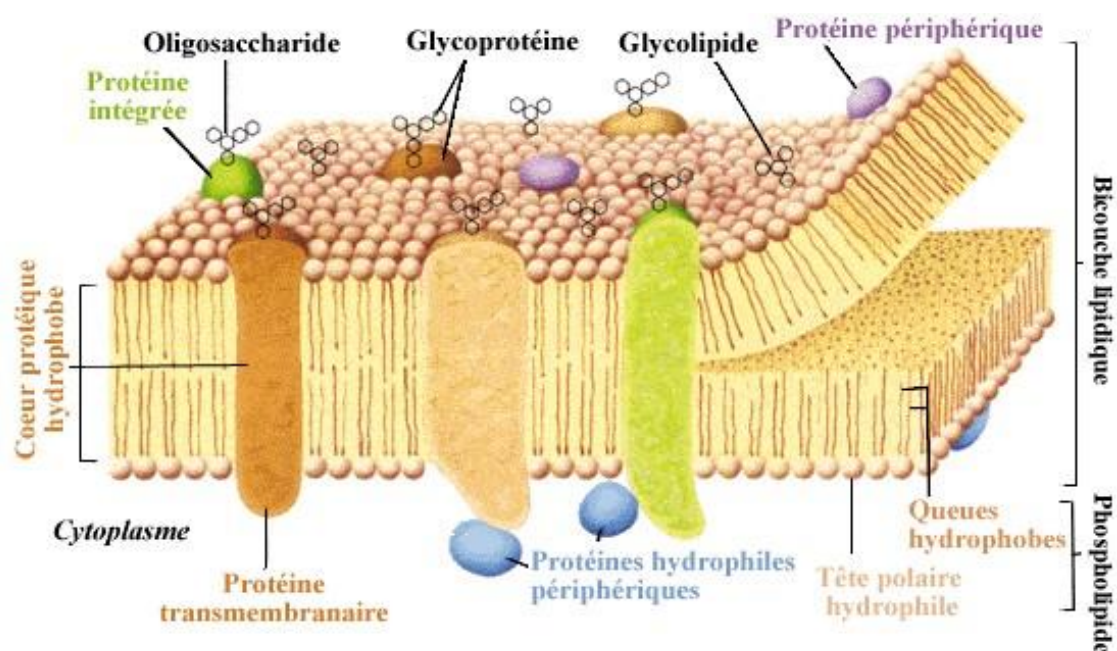


Figure 4 – La membrane plasmique. (Source : réf. virologie.free.fr)

La surface de la cellule est riche en carbohydrates constituant le glycocalyx.³³ La composition en glucides du glycocalyx diffère d'une cellule à une autre, et constitue un ensemble de marqueurs biologiques essentiels dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire.

2.1 Composants de la membrane pouvant être impliqués dans les processus d'internalisation des CPP

La composition des membranes eucaryotes est estimée en moyenne à 50 % (en masse) de lipides, 40 % de protéines et environ 10 % de glucides (correspondant à environ 50 molécules de lipides par molécule de protéine). Ci-dessous, sont présentés plus en détails les composants de la membrane plasmique pouvant jouer un rôle dans les processus de liaison des CPP à la membrane plasmique et leur internalisation.³⁴

2.1.1 Les lipides membranaires

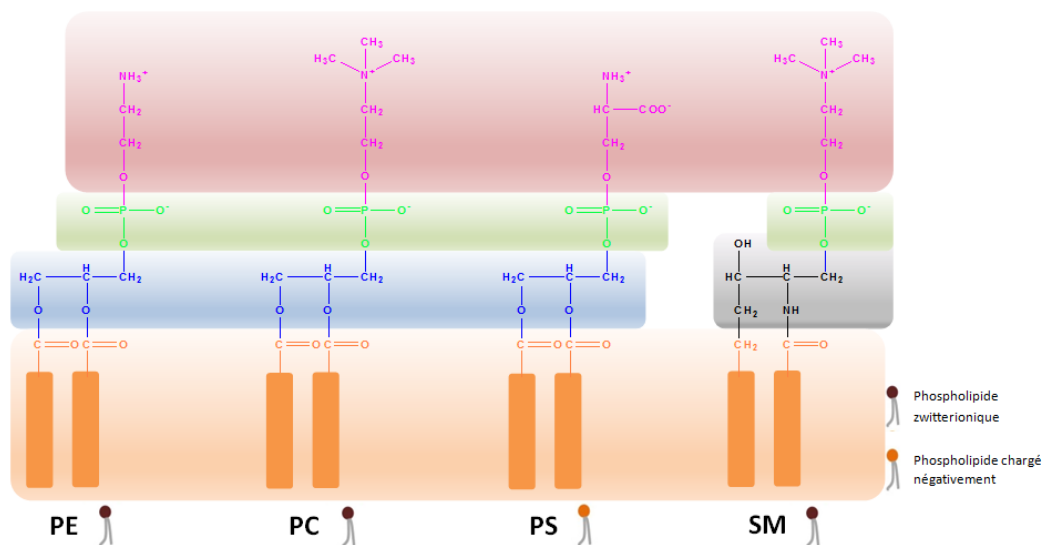


Figure 5 – Structure des quatre phospholipides majoritaires de la membrane plasmique. (Tête polaire représentée en rose, phosphate en vert, glycérol en bleu, sphingosine en gris et chaîne carbonée en orange).

La composition lipidique de la membrane plasmique varie en fonction du type cellulaire. Au sein de la membrane, il existe différents types de lipides, parmi lesquels se distinguent les phospholipides, les stérols et les glycolipides. Les phospholipides, composant majoritaires de la membrane plasmique, comportent un domaine hydrophobe composé par deux chaînes hydrocarbonées de taille variable et une tête polaire, celle-ci correspondant principalement à la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidyléthanolamine (PE), et la sphingomyéline (SM) (**Figure 5**).³⁴

Dans une membrane biologique, les phospholipides sont principalement organisés en bicouche. Des interactions hydrophobes et de Van der Waals entre les chaînes grasses des phospholipides adjacents assurent la cohésion de la bicouche. Les bicouches lamellaires se distinguent par trois états d'organisation : la phase gel, la phase liquide ordonnée et la phase liquide désordonnée (**Figure 6**). Les chaînes longues saturées d'acide gras favorisent un état ordonné et conduisent à une fluidité plus réduite de la bicouche. En revanche, plus les chaînes sont courtes et possèdent d'insaturations, moins elles vont pouvoir s'aligner, créant ainsi une phase plus désordonnée et fluide. Une augmentation de température induit une transition vers un état plus désordonné.³⁵ Dans les membranes biologiques et à température physiologique, les phases lamellaires sont à l'état liquide. Le cholestérol joue un rôle important dans le maintien de cette fluidité, ce que nous verrons un peu plus tard.

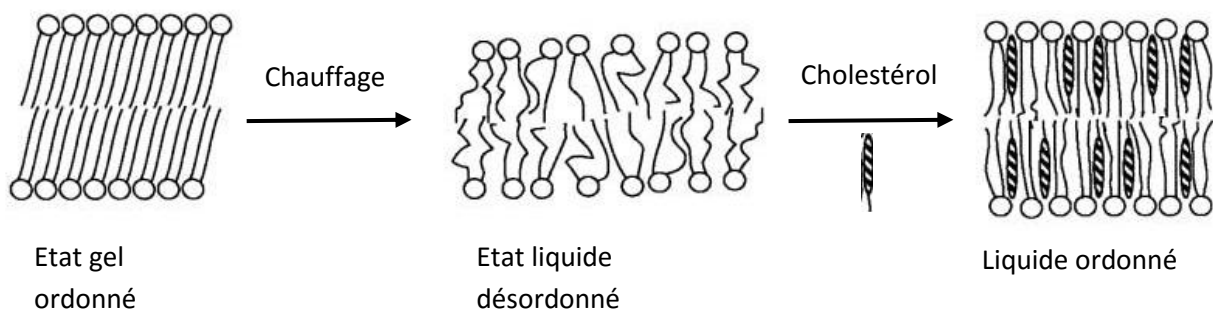


Figure 6 – Effet de la température et du cholestérol sur l'organisation des bicouches lipidiques (Source : réf. ³⁵).

Au sein d'une membrane biologique et à la température physiologique, les phospholipides peuvent diffuser latéralement au sein d'une même monocouche. Par contre, la diffusion d'un feuillet à l'autre (flip-flop) est thermodynamiquement défavorisée et plus lente. Le flip-flop est aussi catalysé par une enzyme appelée translocase ou flipase, qui

maintient une distribution asymétrique des phospholipides entre les deux feuillets de la membrane des cellules eucaryotes.³⁶ De l'ordre de 65 à 75 % des PC et plus de 85 % des SM se trouvent au niveau du feuillet externe, tandis que le feuillet interne contient 80-85 % des PE et plus de 96 % des PS (**Figure 7**). Ainsi, la monocouche interne contient une large majorité des phospholipides anioniques (PS) tandis que le feuillet externe est très majoritairement composé de phospholipides zwitterioniques.

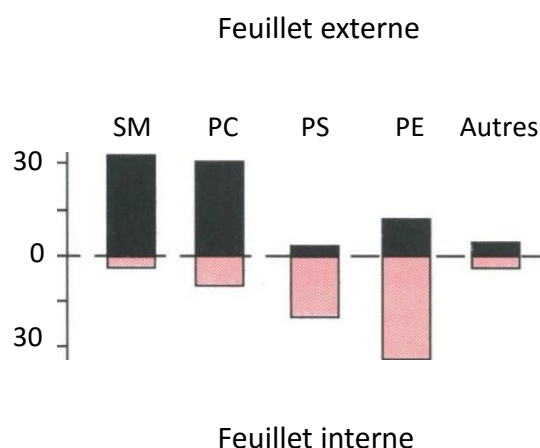


Figure 7 – *Distribution asymétrique des phospholipides dans les membranes de cellules eucaryotes : la distribution est donnée en fonction du pourcentage total des phospholipides. (Source : réf. ³⁶)*

La membrane plasmique contient également du cholestérol, composé d'un noyau stéroïde polycyclique rigide, d'une chaîne carbonée hydrophobe et d'une fonction alcool orientée vers l'extérieur de la bicouche. En s'intercalant entre les molécules de phospholipides, le cholestérol réduit la liberté de mouvement de leurs chaînes grasses, induisant ainsi une rigidification de la membrane.³⁴ Cependant, en cas de diminution de température, il évite à la membrane de se gélifier en restreignant la compacité du système (conservant ainsi sa fluidité). De la même manière que les phospholipides, le cholestérol se répartie de manière non uniforme entre les deux feuillets de la membrane cellulaire.³⁷

L'autre type de lipide de la membrane correspond aux glycolipides qui ne comportent pas de groupement phosphate dans leur structure. Ceux-ci sont peu abondants (moins de 5 % des lipides membranaires). Les glycolipides se composent d'un ou plusieurs groupements saccharides dirigés vers l'extérieur de la cellule et sont essentiellement responsables des

phénomènes de reconnaissance moléculaire au niveau de la membrane cellulaire. Ces lipides seront plus détaillés dans le paragraphe intitulé « les sucres membranaires ».

En 1972, Singer et Nicholson ont proposé le modèle de « mosaïque fluide » pour décrire à la fois la fluidité et le comportement dynamique des lipides constitutifs de la membrane plasmique. Dans ce modèle, la membrane est envisagée comme un fluide bidimensionnel dans lequel baignent des lipides et des protéines mobiles. Les lipides sont en mouvement continu : diffusion latérale, rotation et oscillation autour de leur axe. Le modèle initial insistait davantage sur la fluidité de la bicouche lipidique, que sur l'existence d'une hétérogénéité latérale avec des microdomaines lipidiques délimitant des zones de compositions différentes. Aujourd'hui, il est considéré que les lipides ne jouent plus seulement un rôle passif de support pour les protéines, mais participent à une organisation latérale en domaines distincts appelés « radeaux lipidiques » ou « rafts ».³⁸ Ces rafts, dont l'existence dans la membrane plasmique est cependant controversée, sont des microdomaines spécialisés (en raison de la grande diversité des lipides et de leurs propriétés physico-chimiques différentes), enrichis en cholestérol et en sphingolipides. Ceci leur confère une rigidité plus importante qu'au reste de la membrane. Les radeaux lipidiques jouent un rôle de plateforme pour le recrutement sélectif de protéines impliquées dans des événements cellulaires importants comme les protéines à ancre GPI (glycophosphatidylinositol).³⁹

2.1.2 Les sucres membranaires

Au niveau de la membrane, les glucides sont essentiellement liés à des protéines, par des liaisons *N*-glycosidiques (sur la chaîne latérale d'asparagines) et *O*-glycosidiques (sur la chaîne latérale de sérines ou thréonines), et ont une localisation exclusivement extracellulaire. Ils jouent ainsi un rôle important dans les interactions entre les cellules et leur environnement extérieur. Une petite proportion est également sous forme de glycolipides.

Parmi les glycoprotéines, se distinguent les protéoglycanes. Leur corps protéique est lié à des polysaccharides à chaîne linéaire composés d'unités disaccharidiques répétées,

appelés glycosaminoglycanes (GAG). En général, l'un des sucres est un acide uronique ou du D-galactose, l'autre sucre correspond à la *N*-acétylglucosamine ou la *N*-acétylgalactosamine (**Figure 8**). Les GAG portent de nombreux groupements anioniques (carboxylate ou sulfate). Ils peuvent être classés en cinq catégories suivant la nature de l'unité disaccharidique et la géométrie de la liaison glycosidique: les héparanes sulfate, les chondroïtines sulfate, les dermatanes sulfate, les kératanes sulfate, et l'acide hyaluronique (le seul GAG non sulfaté).³³

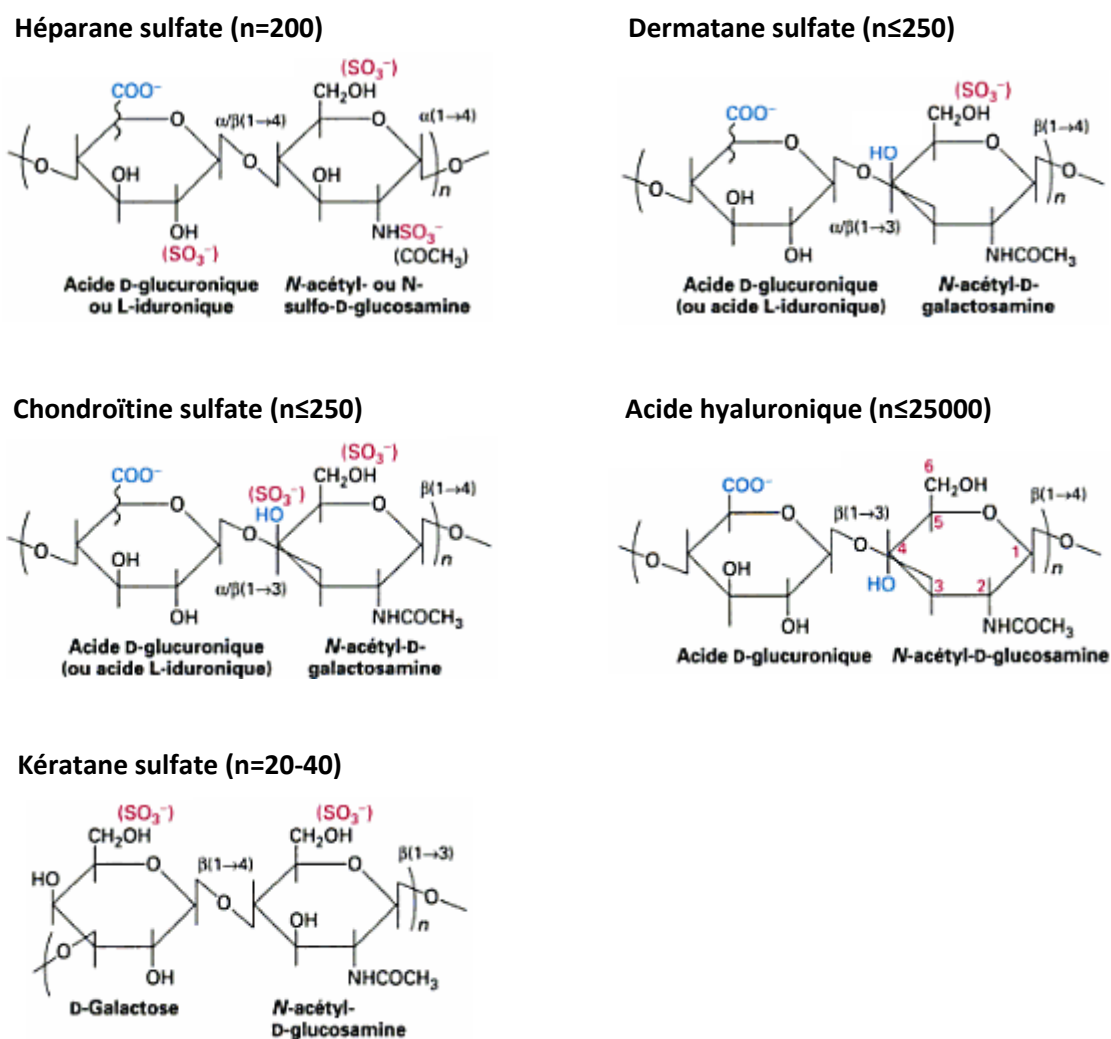


Figure 8 – Classification des GAG d'après la nature de leur unité disaccharidique. Le nombre (*n*) de disaccharides présents dans chaque chaîne de GAG est indiqué (Source : réf.⁴⁰)

Parmi les différents types de protéoglycanes, les protéoglycanes à héparanes sulfate (HSPG) sont les plus abondants à la surface des cellules et sont formés de trois sous-groupes en fonction de leur localisation:^{41,42} les syndécans comportent un corps protéique

transmembranaire, les glypicanes sont liés à la membrane *via* une ancre GPI (glycophosphatidylinositol), et les perlicanes sont sécrétés dans la matrice extracellulaire. Les HSPG se lient à un grand nombre de ligands et de molécules de la matrice extracellulaire, en particulier *via* des interactions électrostatiques impliquant les groupements sulfate et carboxylate chargés négativement à pH physiologique, jouant ainsi un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques qui affectent directement le comportement cellulaire (**Figure 9**)⁴².

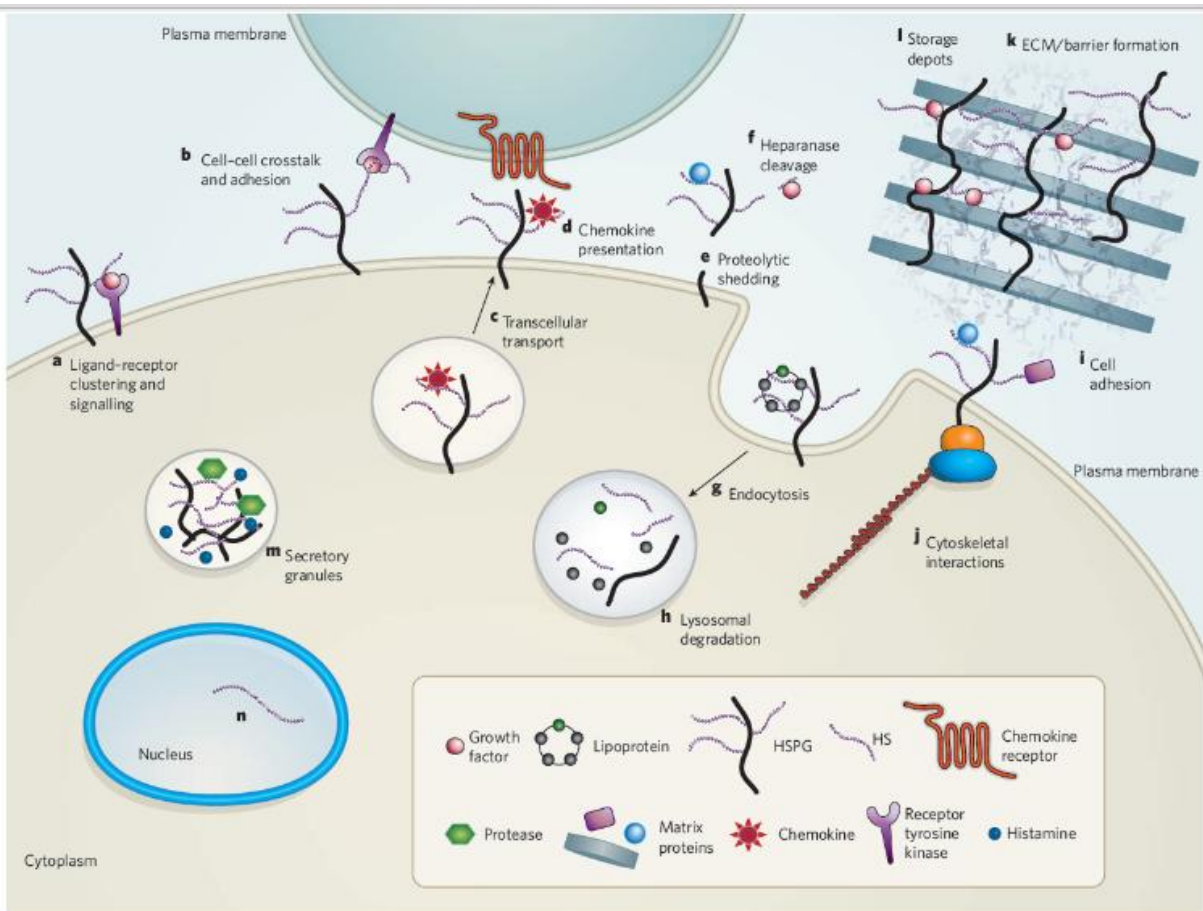


Figure 9 – Les HSPG sont impliqués dans de multiples activités biologiques. (Source : réf. ⁴²)

L'autre catégorie de sucres membranaires correspond aux glycolipides. Parmi ceux-ci, les sphingoglycolipides sont les plus abondants. Ceux-ci correspondent soit à un monosaccharide soit à un oligosaccharide ramifié lié à la sphingosine (**Figure 10**).⁴³ Leur domaine hydrophobe, composé de céramide, est ancré dans la bicouche lipidique, tandis que le domaine oligosaccharidique est exposé vers le milieu extracellulaire. Le céramide est

composé d'une longue chaîne grasse saturée (de 14 à 24 atomes de carbone), reliée par une liaison amide à une base sphingoïde (généralement une sphingosine). Ces glycolipides peuvent être neutres ou anioniques si un ou plusieurs groupements sulfate est présent sur la chaîne de sucres. Par exemple, le glucosylcéramide (GlcCer), le glycolipide le plus simple possède une seule unité de glucose liée à la sphingosine, tandis que dans les glycosphingolipides complexes appelés gangliosides, une ou deux chaînes d'oligosaccharide ramifié contenant des groupements d'acide sialique sont attachées à la sphingosine. Les glycolipides constituent de 2 à 10 % des lipides totaux des membranes plasmiques, et c'est dans le tissu nerveux qu'ils sont le plus abondants. Ils interviennent notamment dans les phénomènes de structuration membranaire.

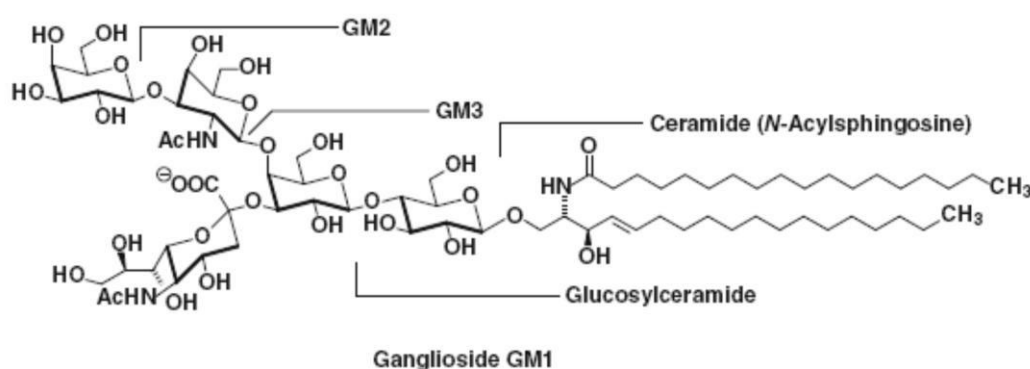


Figure 10 – Exemples de glycosphingolipides : Gangliosides GM1, GM2 et GM3 ; glucosylcéramide (GlcCer). (Source : réf.⁴³)

3. Mécanismes d'internalisation cellulaire des CPP

Il est crucial de comprendre les mécanismes d'internalisation cellulaire des CPP pour permettre, en particulier, leur optimisation et le développement de nouvelles stratégies pour la délivrance d'agents thérapeutiques. Les premières études avaient conduit à la conclusion que le mécanisme d'entrée des CPP était indépendant de l'énergie et de la température et ne faisait pas intervenir de récepteur membranaire, excluant ainsi un processus d'endocytose. Au cours des dernières années, les voies d'entrée de nombreux CPP ont été étudiées de façon approfondie. Il apparaît maintenant que les CPP peuvent emprunter deux voies principales pour passer la membrane cellulaire correspondant à la

translocation directe et l'endocytose.⁴⁴ La contribution respective de ces deux voies varie selon le CPP.⁴⁵ Cependant, il faut garder à l'esprit que plusieurs facteurs peuvent moduler les efficacités d'entrée des CPP ainsi que leur mécanisme d'internalisation tels que la lignée cellulaire utilisée, la nature de la cargaison vectorisée et la concentration extracellulaire du CPP ou du conjugué (**Figure 11**).⁴⁶

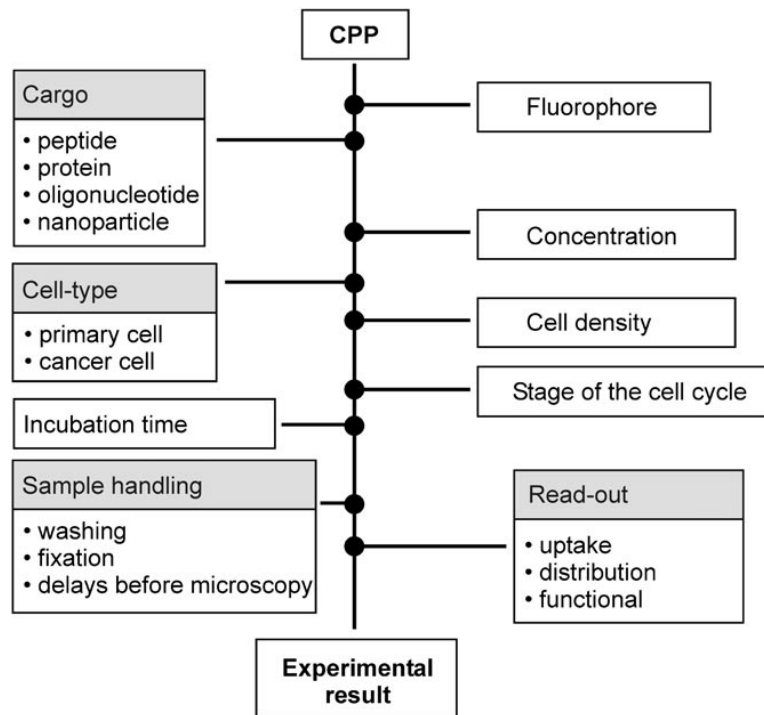


Figure 11 – Paramètres pouvant influencer l'internalisation cellulaire des CPP. (Source : réf.⁴⁶)

3.1 Une première étape décisive : l'interaction des CPP avec la membrane plasmique

Le premier événement intervenant dans le mécanisme d'internalisation correspond à l'interaction du peptide avec la membrane plasmique. Il s'agit d'un événement dont l'étude est primordiale car il peut déterminer les voies d'entrée qui seront empruntées. En effet, selon sa capacité à interagir avec certains composants membranaires, le peptide sera capable ou non de déclencher l'endocytose et / ou la translocation directe. La structure du vecteur, comme nous le verrons par la suite dans ce manuscrit, va jouer un rôle important dans cette capacité d'interaction avec la surface de la cellule.

Le premier contact du CPP avec la cellule se fait avec la matrice extracellulaire, ensuite il pourra éventuellement interagir avec la bicouche lipidique. La présence de groupements chargés négativement comme les carboxylates, sulfates et phosphates, permet aux molécules cationiques exogènes d'établir des interactions électrostatiques avec le glycocalyx. Ainsi plusieurs études ont été menées pour déterminer l'influence sur l'internalisation des interactions entre les protéoglycanes de surface et les peptides riches en arginine. En 2007, S. Futaki et son équipe ont montré l'importance de la structure et de la densité de charge des CPP riches en arginine sur les différentes voies d'internalisation empruntées en comparant le comportement des CPP Tat, R₈, et d'analogues branchés (Figure 12).⁴⁷

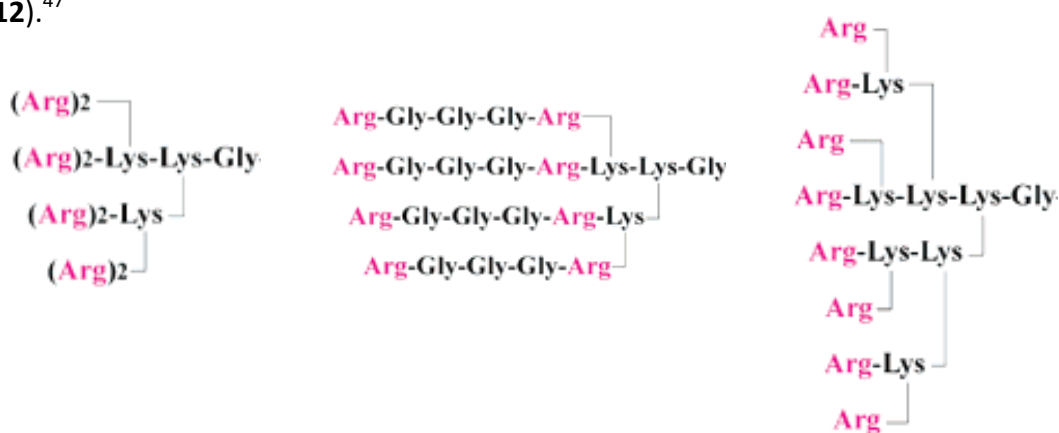


Figure 12 – Structures chimiques des analogues branchés riches en arginine. (Source : réf.⁴⁷)

Tous ces peptides entrent moins efficacement dans des cellules CHO déficientes en tous types de GAG (CHO A-745) que dans les CHO sauvages (CHO-K1). En revanche, les tests réalisés sur des CHO ayant uniquement une déficience en héparane sulfate (CHO D-677) ont révélé une incidence différente sur l'internalisation de Tat et de R₈, suggérant que l'entrée de Tat dans la cellule est essentiellement dépendante des HSPG alors qu'elle impliquerait d'autres protéoglycanes pour R₈. Les auteurs ont aussi évalué l'internalisation de Tat et R₈ sur des cellules sur-exprimant les syndécanes (cellules 293T). Pour les deux peptides une augmentation de l'efficacité de pénétration a été observée. Certains analogues branchés présentent la même dépendance vis-à-vis des HSPG que le peptide Tat, suggérant ainsi que ces peptides s'internalisent *via* le même mécanisme. Cette étude montre donc l'importance des GAG dans l'internalisation des CPP. Elle révèle aussi que selon la structure du CPP et la distribution spatiale de ses résidus cationiques, le peptide ou analogue peut interagir préférentiellement avec certains GAG. Deux ans plus tard, S. Sagan et son équipe ont étudié

l'internalisation d'une série de peptides portant de 7 à 9 acides aminés basiques (Arg et/ou Lys) sur cellules CHO sauvages (CHO-K1) et CHO-745 (**Figure 13**).

Penetratin : Biot-G₄-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH₂

P1 : Biot-G₄- (Nε-bzp)KRQIKIWFQNRRMKWKK-NH₂

R₉ : Biot-G₄-R₉-NH₂

Tat : Biot-G₄-RKKRRQRRRPPQ-NH₂

R₆W₃ : $\underbrace{\text{CF}_3\text{-NH-C(CH}_2\text{CH}_3)_2\text{-(N}\epsilon\text{Biot)K-(D)KCRRWWRRWRR-NH}_2}_{\text{msr}}$

(Nε-bzp)K

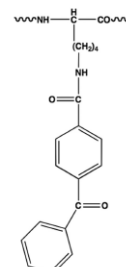


Figure 13 – Séquences des peptides utilisés dans l'étude. P1 est un analogue de la Pénétratine fonctionnalisé par une benzophénone (bzp). Tous les peptides comportent une étiquette de marquage isotopique (Biotine-GGGG ou msr = mass stable reporter tag) qui permet la quantification par MALDI-TOF. (Source : réf.⁴⁵)

Les résultats obtenus ont révélé que les deux voies d'internalisation (endocytose et translocation directe) coexistent sur CHO-K1 et que la balance entre les deux mécanismes ne dépend pas directement du nombre de charges positives portées par le peptide mais essentiellement, de sa séquence, de sa concentration extracellulaire, de la température et de la composition membranaire en protéoglycanes (**Tableau 2**).⁴⁵

Extracellular [CPP] (number of + charges)	Wild type CHO-K1 cells		Heparan sulfate and chondroitin sulfate-deficient CHO cells	
	Translocation	Endocytosis	Translocation	Endocytosis
2 μM R ₆ W ₃ (+7)	15	% 85	15	% 85
5 μM Penetratin (+7)	30	70	60	40
5 μM P1 (+7)	20	80	75	25
7.5 μM Tat (+8)	75	25	100	00
5 μM R ₉ (+9)	50	50	100	00

Tableau 2 – Balance entre translocation et endocytose pour une concentration peptidique donnée. (Source : réf.⁴⁵)

Cette étude a de plus révélé qu'il n'y a pas de corrélation directe entre l'affinité des CPP pour la membrane plasmique et leur efficacité d'internalisation dans les cellules. Dans le même laboratoire, A. Walrant *et al.* ont examiné s'il existait une corrélation entre l'adhésion membranaire et l'habilité à traverser la membrane plasmique des trois peptides R₉, R₆W₃ et R₆L₃ (**Tableau 3**).⁴⁸ Bien que R₆L₃ ait le même caractère amphipathique et la même distribution de charge que R₆W₃, son efficacité d'internalisation est quasi nulle. Ceci est expliqué par le remplacement des résidus Trp par des Leu et met à nouveau en évidence le rôle important des résidus Trp dans le processus d'entrée. Des études d'interaction des peptides avec des membranes modèles riches en phosphatidylcholine ont révélé que les CPP R₉, R₆W₃ et R₆L₃ se lient tous trois à la bicouche lipidique. Cependant, des études de RMN et de simulation dynamique moléculaire, montrent que R₆L₃ s'insère plus profondément dans la membrane que R₆W₃, une interaction plus en surface semble donc être un paramètre favorisant l'internalisation cellulaire.⁴⁹ La même conclusion avait été apportée précédemment lors de la comparaison de CPP correspondant aux hélices 3 des quatre homéodomaines Antennapedia, Engrailed, Hox et Knotted et ayant des séquences relativement voisines mais différentes par le nombre de résidus basiques, acides et Trp. Il avait alors été observé que le CPP dérivé de Knotted qui présentait la meilleure efficacité d'entrée dans les cellules se caractérisait également par le plus faible enfouissement dans des micelles de SDS, un modèle très simplifié de membrane. Au contraire, le CPP le moins efficace parmi cette série conduisait à l'enfouissement le plus profond.⁵⁰ Par ailleurs, il a été vu qu'une interaction trop forte avec certains composants de la membrane plasmique peut entraver la traversée de la membrane. Ainsi, l'entrée des CPP classiques Tat, Pénétratine, R₉, et R₆W₃ est plus efficace dans une lignée de CHO déficiente en acides sialiques (CHO-lec2) que dans la souche sauvage. L'hypothèse avancée était que les acides sialiques séquestrent à la surface des cellules une fraction du CPP.⁵¹ L'interaction de la Pénétratine avec la membrane plasmique a récemment été étudiée au laboratoire par Pierre Soule en utilisant la technique du BioMembrane Force Probe, un montage qui permet de quantifier la fréquence et la force des interactions d'un CPP unique avec une membrane cellulaire. Ces expériences ont montré que les héparanes sulfates pourraient être les principaux partenaires de la Pénétratine dans son interaction avec la membrane cellulaire, et que la suppression des acides sialiques de la surface cellulaire augmentait notablement la

fréquence des interactions, suggérant l'existence d'un partenaire inconnu qui serait masqué par les acides sialiques.

Le rôle des résidus Trp dans les séquences basiques des CPP a été étudié de façon approfondie par Bechara *et al.*. Sur une librairie de sept peptides basiques (**Tableau 3**), les auteurs ont évalué *in vitro* l'affinité de ces peptides avec 5 types de GAG (héparanes sulfate, et 4 chondroïtines sulfate variant dans leur degré de sulfatation).⁵¹

Peptide	Sequence	R,K (n)	W (n)
R ₉	RRRRRRRRR	+9	0
TAT(47–57)	YGRKKRRQRRR	+8	0
R ₆ L ₃	RRLLRRLRR	+6	0
(W48F)-penetratin	RQIKIFFQNRRMKWKK	+7	1
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	+7	2
R ₆ W ₃	RRWRRRWRR	+6	3
R ₁₀ W ₆	RRWRRRWRRWRRWRR	+10	6

Tableau 3 – Séquences des sept CPP utilisés comportant en extrémité N-Terminale le tag Biotine-Gly₄. Le nombre n de résidus basique (R, K) et hydrophobe (W) est donné. (Source : réf.⁵¹)

Cette étude a montré que l'augmentation du nombre de résidus Trp dans la séquence du CPP stabilise la formation de larges agrégats avec les GAG, phénomène qui s'accompagne d'une structuration du CPP en feuillets β et déclenche un processus d'endocytose GAG-dépendant. Bien que le rôle des Trp soit ici bien avéré, l'interaction avec les sucres sulfatés n'a pas encore été totalement caractérisée au niveau moléculaire. Il est possible que des interactions hydrophobes ou de type de π -anion soient mises en jeu. Les Trp jouent donc un rôle particulier à la fois dans l'interaction avec les sucres de surface et les phospholipides.

Les CPP oligo-Arg, car ils présentent une forte densité de charges positives, sont aussi capables de recruter efficacement les GAG pour induire une entrée par endocytose.⁵² L'interaction avec les GAG implique ici le groupement guanidinium de la chaîne latérale des arginines. Les groupes de Wender et Futaki ont montré que les guanidiniums peuvent former des liaisons hydrogène bidentées avec des composants anioniques, tels les sulfates des GAG de surface (**Figure 14**).^{53,54} En revanche le groupe ammonium de la chaîne latérale

des résidus Lys ne peut former que des liaisons hydrogène monodentées, énergétiquement plus faibles, ce qui expliquerait l'entrée considérablement moins efficace de K₉ par rapport à R₉.^{55,56}

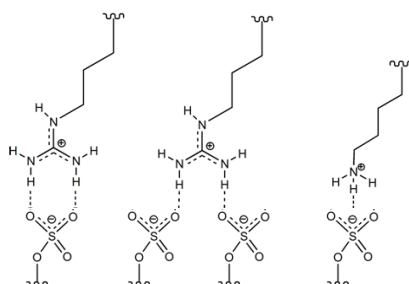


Figure 14 – Exemple de liaisons hydrogène entre les chaînes latérales des Arg et des Lys et les groupements sulfate. (Source : Réf.⁵⁴)

Il est dorénavant admis que l'interaction des CPP riches en Arg avec les protéoglycanes, est une étape clé pour initier l'internalisation par endocytose. Le groupe de Brock a montré que l'endocytose de peptides amphipatiques ne portant aucun résidu arginine (tels que le Transportan et son analogue TP10), est indépendante de leur liaison avec les HSPG. Au contraire, le recrutement des HS, induit la formation d'agrégats encore plus gros que ceux observés avec les CPP oligo-Arg, agrégats qui ici, au lieu de favoriser la pénétration cellulaire, conduisent à la séquestration des CPP et bloquent leur entrée dans la cellule.⁵⁷

3.2 L'endocytose

Comme évoqué précédemment, la membrane plasmique représente une ligne de défense contre les molécules pathogènes du milieu extracellulaire. Elle régule aussi la composition du milieu intracellulaire en contrôlant l'entrée et sortie des nutriments, produits de dégradation, ions *etc.* De manière générale, l'endocytose (du grec *endon* « dedans » et *kutos* « cellule ») est un phénomène cellulaire faisant partie des mécanismes de transport du milieu extérieur vers l'intérieur et impliquant une réorganisation de la membrane. D'un point de vue mécanistique et selon la taille du matériel absorbé, l'endocytose peut correspondre à deux processus : la phagocytose et la pinocytose (**Figure 15**). La phagocytose concerne essentiellement l'absorption d'éléments de taille importante,

par des cellules spécialisées comme les macrophages. Elle fait intervenir des protéines particulières, les opsonines, qui vont se lier aux corps étrangers et déclencher la phagocytose. Ce phénomène intervient essentiellement dans le système de défense immunitaire et entraîne l'élimination de l'élément absorbé.

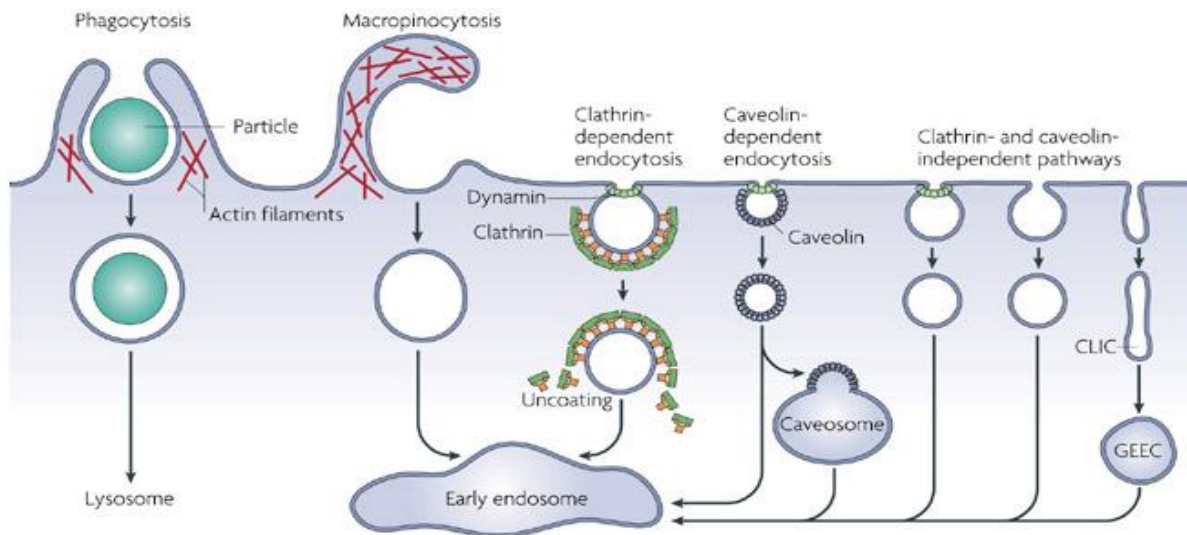


Figure 15 – Les différentes étapes intracellulaires de l'endocytose. CLIC = clathrin and dynamin independant carriers; GEEC = glycosyl phosphatidylinositol anchored protein enriched early endosomal compartement. (Source : Nature Rev Mol Cell Biol 2007)

Contrairement à la phagocytose, le mécanisme de pinocytose n'est pas limité à quelques cellules spécialisées mais existe chez toutes les cellules eucaryotes. C'est la voie normale d'absorption d'éléments indispensables, comme l'ingestion de fluides ou de macromolécules. Elle est initiée par la reconnaissance de l'élément qui sera absorbé par la cellule. Une partie de la membrane cellulaire entoure cet élément par invagination ou, dans le cas de la macropinocytose, par évagination, puis se désolidarise du reste de la membrane pour former une vésicule appelée endosome (**Figure 16**). Plusieurs voies de pinocytose existent, et sont classées en fonction des protéines et des médiateurs impliqués. On en distingue quatre: la pinocytose dépendante de la clathrine, l'endocytose faisant intervenir la cavéoline, la macropinocytose, et l'endocytose indépendante de la clathrine et cavéoline.

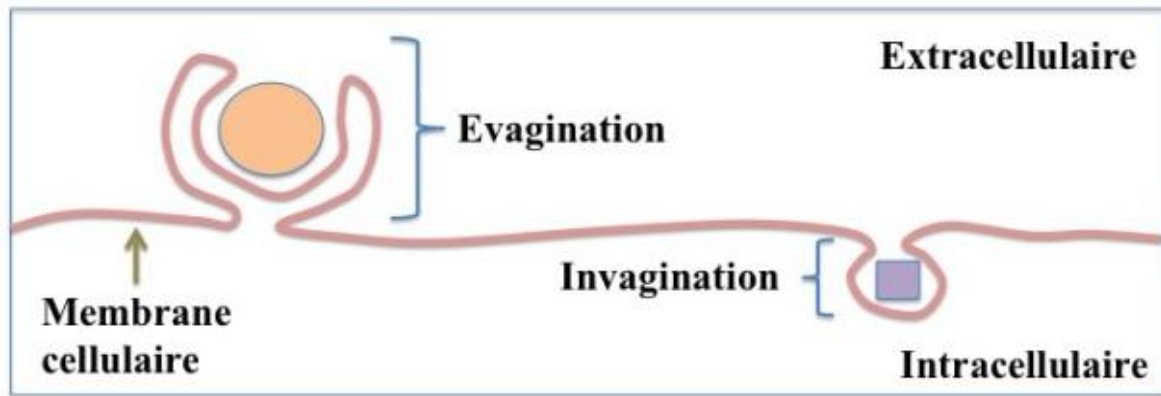


Figure 16 – Etape initiale de la pinocytose. (Source : Réf.pedagotech.inp-toulouse.fr)

L'endocytose dépendante de la clathrine est la route principale d'endocytose impliquant des récepteurs membranaires. La première étape implique le recrutement de complexes AP-2 (adapter protein-2) au niveau de la membrane plasmique provoquant ainsi le regroupement de protéines membranaires. Ces complexes AP-2 assemblés, fixent alors la clathrine, pour former après auto-assemblage, une structure sphérique cagée responsable des invaginations cellulaires (**Figure 17**).⁵⁸

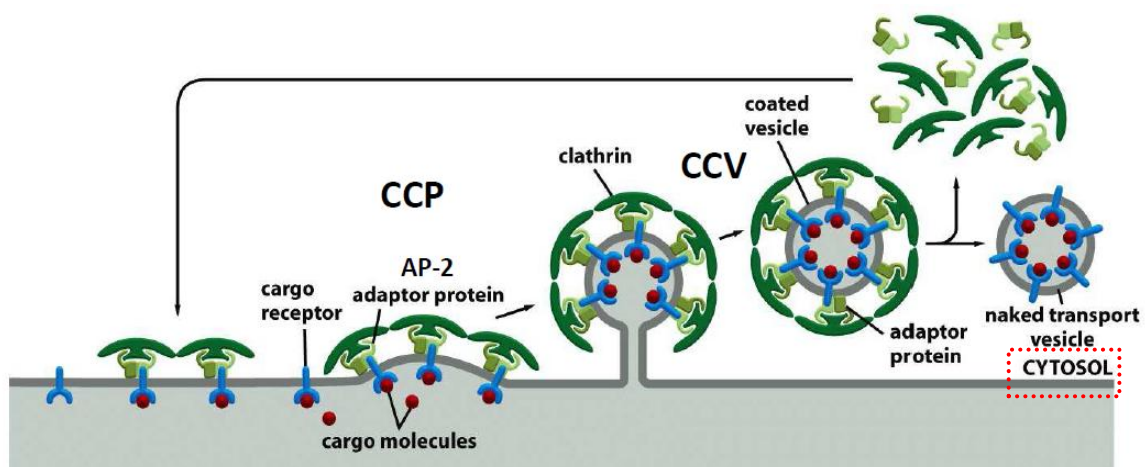


Figure 17 – Les différentes étapes de l'endocytose à clathrine. (Source : Réf.⁵⁹)

Les cavéoles sont des vésicules en forme d'oméga inversé provenant d'une invagination de la membrane plasmique. Elles sont formées au niveau des microdomaines riches en sphingolipides et cholestérol, au niveau desquels s'accumulent les protéines cavéolines. Elles jouent un rôle majeur dans l'endocytose de certaines toxines bactériennes (comme la toxine du choléra).

La macropinocytose, quant à elle, correspond à la formation de vésicules hétérogènes de grande taille induites par la polymérisation d'actine. Elle est présente dans certaines lignées tumorales et participe à l'encapsulation de bactéries et de virus dans les macrophages.

De très nombreuses études ont été menées ces dernières années afin de déterminer le type d'endocytose impliqué dans l'entrée des différents CPP. Ces études reposent en particulier sur des expériences de co-localisation de marqueurs d'endocytose avec le CPP internalisé. Des inhibiteurs d'endocytose ont également été utilisés.^{46,60,61} Les résultats obtenus par les différentes équipes de recherche peuvent parfois apparaître contradictoires, montrant pour un même CPP l'implication de différentes voies. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de conditions expérimentales (concentration en CPP), dérivés (CPP fonctionnalisés par différentes sondes ou cargaisons) ou lignées cellulaires différentes. Il faut aussi souligner que l'action des inhibiteurs d'endocytose n'est pas toujours spécifique et que l'inhibition d'une voie d'entrée pourrait conduire à l'activation d'une autre voie.⁶² Cette divergence apparente des données de la littérature met cependant en évidence la capacité des CPP à utiliser différentes voies d'endocytose pour pénétrer dans les cellules (souvent même en parallèle).

Ainsi, il a été montré par Fittipaldi *et al.* que le peptide Tat emprunte la voie des cavéolines.⁶³ En effet, le traitement des cellules Cos-1 (cellules de rein de singe surexprimant les cavéoles) par la cyclodextrine qui permet d'extraire le cholestérol de la membrane des cellules inhibe l'internalisation. A l'inverse, Richard et ses collaborateurs, ont mis en évidence que Tat s'internalise dans des cellules déficientes en HSPG et en cavéoles mais ne s'internalise plus lors de l'inhibition de l'endocytose clathrine-dépendante (par la chlorpromazine ou déplétion en potassium).⁶⁴ Les groupes de Dowdy et de Futaki ont montré la contribution de la macropinocytose dans l'efficacité d'internalisation des peptides Tat⁶¹ et R₈⁶⁵. En effet, leur pénétration cellulaire est inhibée dans le cas de traitements des cellules par la D-cytochalasine, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, ou de l'utilisation de l'éthylisopropylamiloride (EIPA), un inhibiteur spécifique de l'échange Na⁺/H⁺ nécessaire pour la macropinocytose.

Plutôt que d'énumérer tous les autres outils permettant de disséquer les voies d'entrée des CPP,⁶⁶ j'ai choisi d'illustrer leur utilisation avec l'étude récente du mécanisme d'entrée du CPP MD11 conjugué à l'EGFP (enhanced green fluorescent protein) effectuée

par l'équipe de J.L Lenormand.⁶⁷ Ce CPP correspond à un segment de la protéine ZEBRA (un facteur de transcription viral). Les auteurs ont montré que l'internalisation du conjugué est significativement inhibée par l'introduction d'héparine dans le milieu extracellulaire suggérant que l'interaction du CPP avec les GAG est nécessaire pour l'entrée dans les cellules (**Figure 18-A**). A 4°C, l'entrée du conjugué dans les cellules est significativement inhibée, en revanche, la déplétion en énergie par traitement des cellules avec l'azoture de sodium et le 2-deoxy-D-glucose, n'induit que 20 à 30 % de diminution de la fluorescence intracellulaire, suggérant ainsi que l'internalisation de MD11-EGFP est majoritairement ATP-indépendante mais que le conjugué pénètre aussi par endocytose (**Figure 18-B**). Pour déterminer le type d'endocytose impliquée, les auteurs ont exploré l'effet d'inhibiteurs et de marqueurs (**Figure 18-C**). Ils ont montré que l'incubation des cellules avec de la nystatine (inhibiteur des cavéoles par séquestration du cholestérol) ou de la wortmannin (inhibiteur de la phosphatidylinositol 3-kinase impliquée dans la macropinocytose) n'altère pas l'internalisation de MD11-EGFP. En revanche, son entrée est réduite en présence de la chlorpromazine (inhibiteur de l'endocytose clathrine-dépendante) dans les cellules Saos-2 mais pas dans les Hela, démontrant que le processus d'internalisation peut varier en fonction de la lignée cellulaire. A l'inverse, l'incubation en présence de cyclodextrine induit une altération de l'efficacité d'internalisation dans les deux lignées. Une co-localisation mineure a été observée entre le conjugué et les marqueurs d'endocytose EEA1 (endosomes précoces) et Rab7 (endosomes tardifs), tandis qu'aucune co-localisation n'a été distinguée avec la cavéoline-1 et clathrine, confirmant les résultats obtenus avec les inhibiteurs.

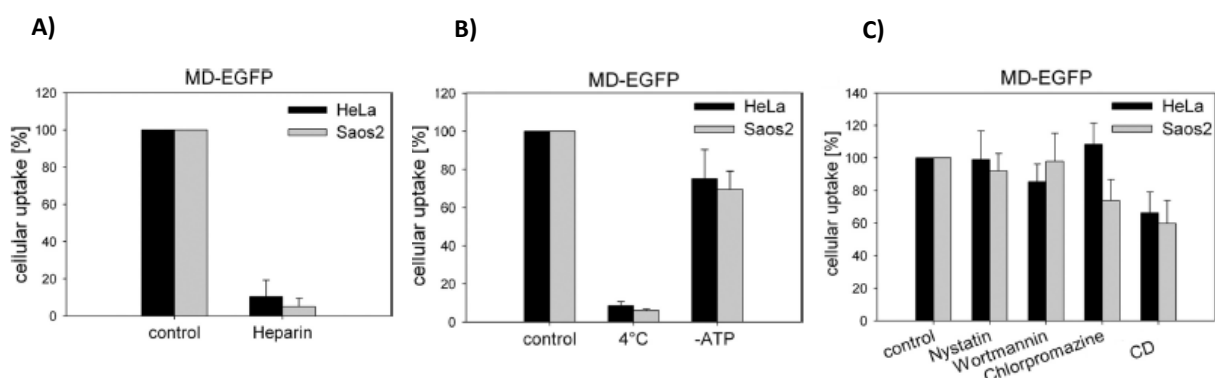


Figure 18 – Quantification de l'internalisation de MD11-EGFP par cytométrie en flux. A) Rôle des HSPG. B) Influence de la température et de l'apport d'ATP. C) Effet de l'inhibition de différentes voies d'endocytose. CD = cyclodextrine. (Source : Réf. ⁶⁷)

3.3 La translocation directe de la membrane.

La deuxième voie principale d'internalisation correspond à la translocation directe. C'est un processus énergie- et température-indépendant mis en évidence sur cellules notamment par des expériences d'internalisation réalisées à basse température. Différents modèles de translocation ont été proposés sur la base d'études biophysiques correspondant à une déstabilisation transitoire de la bicouche lipidique par formation de micelles inverses ou pores ou au passage du CPP par transfert de phase suivant le gradient électrochimique (Figure 19).⁶⁸

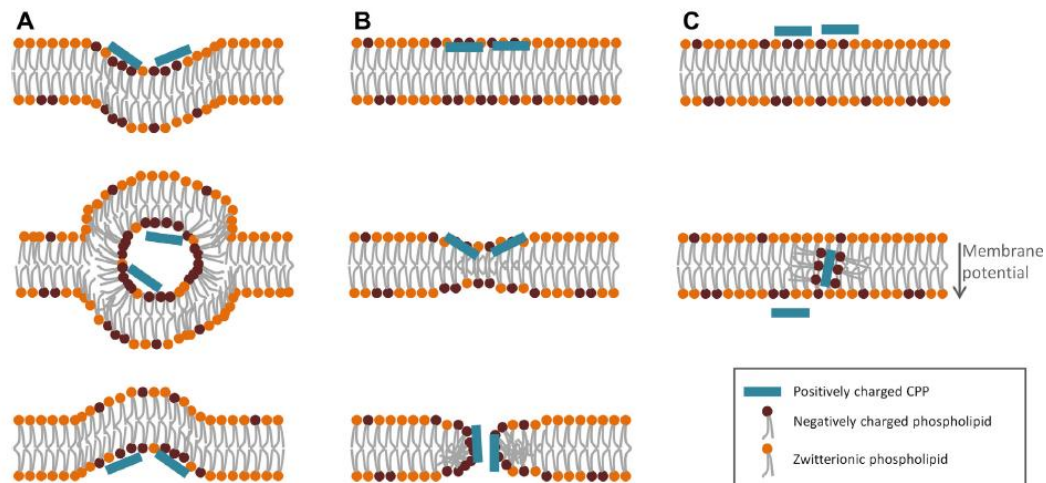


Figure 19 – Différents modèles de translocation directe. A : passage par formation de micelles inverses ; B : formation de pores transitoires ; C : transfert de phase. (Source : Réf.⁶⁸)

Formation de micelles inverses

La formation de micelles inverses a été le premier mécanisme proposé par A. Prochiantz et G. Chassaing pour expliquer la translocation directe de la Pénétratine.³¹ Il s'agit d'un phénomène non délétère pour la cellule. Dans ce modèle, l'interaction du peptide avec les phospholipides déstabilise la membrane et mène à la formation d'une micelle inverse offrant une cavité hydrophile dans laquelle le CPP et sa cargaison peuvent être encapsulés. S'ensuit la résorption de la micelle avec libération du CPP du côté intracellulaire (Figure 19-A). Le rôle des résidus basiques et des Trp dans la formation de micelle inverse a été mis en évidence par des expériences de ³¹P-RMN du solide. Le recrutement de phospholipides

anioniques par la Pénétratine et la diminution locale de la concentration en phosphatidylcholine induirait la formation de phases hexagonales. Ces phases hexagonales ne sont plus observées lorsque les deux Trp de la Pénétratine sont remplacés par des Phe.⁶⁹ Bien que les Trp semblent indispensables à un tel processus dans le cas de la Pénétratine, il a été montré par le groupe de S. Futaki, que pour les CPP Arg_n, l'interaction forte entre le groupement guanidinium des résidus Arg et les têtes polaires des lipides par formation de liaisons hydrogène perturbe la membrane et induit la formation de micelles inverses.⁷⁰

Formation de pores

Un autre mécanisme de translocation directe correspond à la formation de pores transitoires. Le modèle « tonneau » de formation de pores (**Figure 20**) proposé initialement pour certains peptides antimicrobiens (AMP),⁷¹ pourrait également être applicable à certains CPP présentant les mêmes caractéristiques structurales (amphipathie) mais aussi une certaine cytotoxicité. La première étape correspond à la liaison des CPP aux têtes polaires des phospholipides, *via* l'interaction des résidus basiques, entraînant une modification de la structure secondaire des peptides. Ceux-ci s'assemblent ensuite pour former un pore. Les faces hydrophiles des peptides forment la surface interne du pore, tandis que les faces hydrophobes sont orientées vers les chaînes des phospholipidiques, permettant ainsi l'enfouissement des peptides dans la membrane et engendrant une perturbation de l'organisation des phospholipides. Ainsi, le pore, permet le passage de molécules du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire et *vice versa*.^{72,73}

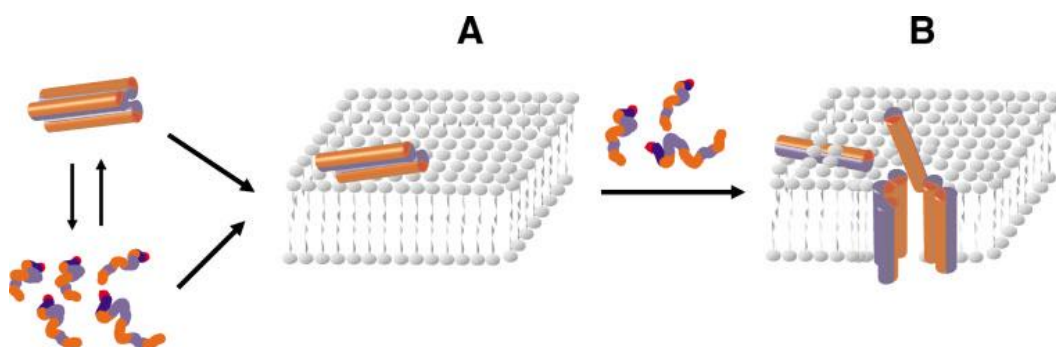


Figure 20 – Modèle tonneau. A : assemblage des peptides en tonneau; B : insertion des tubes dans la membrane, avec recrutement d'autres peptides. En bleu est désignée la surface hydrophobe, en marron la surface hydrophile. (Source : Réf. ⁷³)

Dans le modèle « tonneau », l'auto-assemblage du peptide à la surface de la membrane induit son insertion dans la bicouche lipidique conduisant alors au recrutement d'autres molécules de peptide. En revanche, dans le modèle « tapis », il y a dès le début une forte accumulation des peptides sur la surface membranaire. Les interactions peptide / lipide sont tellement fortes que l'intégrité de la membrane est brisée et les pores formés (Figure 21).

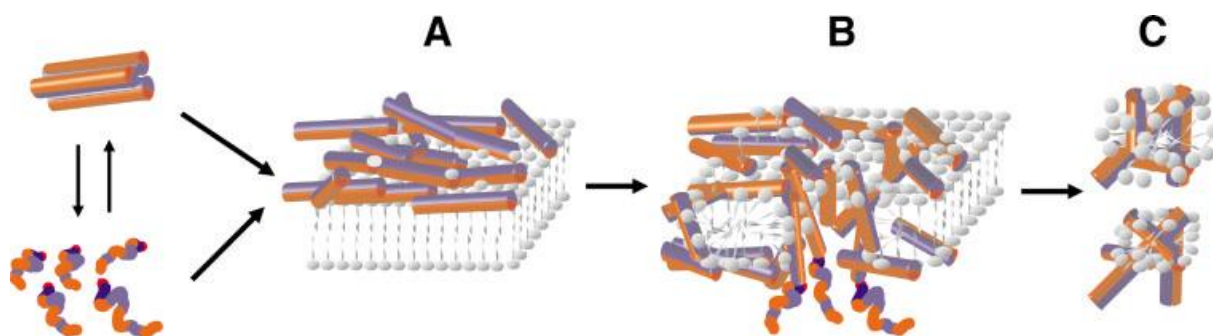


Figure 21 – *Modèle tapis. A : forte accumulation des peptides à la surface de la membrane ; B : perméabilisation de la membrane ; C : interaction forte peptide / lipide conduisant à la désintégration de la membrane. En bleu est représentée la surface hydrophobe, en marron la surface hydrophile. (Source : Réf. ⁷³)*

La formation de pores (qui peut être transitoire) semble intervenir dans les mécanismes d'internalisation des peptides TP10, pVEC (en accord avec leurs propriétés antimicrobiennes)⁷⁴ et Pep-1.⁷⁵

Transfert de phase

Le passage par diffusion est un modèle introduit par P. A Wender et ses collaborateurs, selon lequel, l'association des groupements guanidinium par formation de liaisons hydrogène bidentées avec les groupements carboxylates et phosphates des phospholipides conduit à la formation de paire d'ions neutres qui atténue la polarité du CPP. Cela permet la partition du CPP dans la bicouche lipidique et sa diffusion passive pour atteindre le cytosol.⁷⁶ La force motrice de cette diffusion semble être le potentiel membranaire. En effet, il a été montré que l'internalisation de R₈ est réduite de plus de 90 % par élimination du potentiel membranaire en présence de tampons dépolarisants (K⁺PBS).

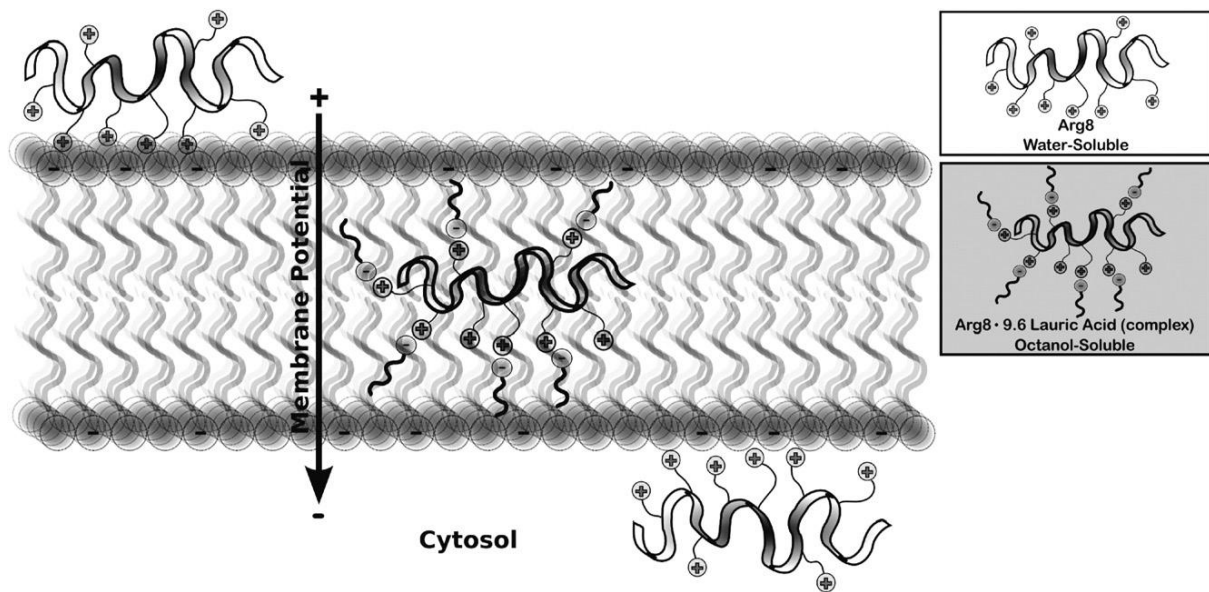


Figure 22 – Modèle de partition membranaire et traversée de la bicouche suivant le potentiel de membrane. (Source : Réf. ⁷⁶)

Récemment au laboratoire, J. M. Swiecicki *et al.* ont quantifié l'internalisation de CPP cationiques (Pénétratine, Tat, R₆W₃, et R₉) dans des vésicules unilamellaires (LUV) composées de DOPG (1,2-di-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)), un phospholipide anionique.⁷⁷ Les données ont montré que la forte accumulation intravésiculaire des CPP était liée à la quantité de phospholipide anionique transféré du feuillet externe vers le feuillet interne de la vésicule. Les résultats mettent en évidence la formation de complexes neutres peptide / DOPG favorisant l'internalisation des peptides par translocation directe.

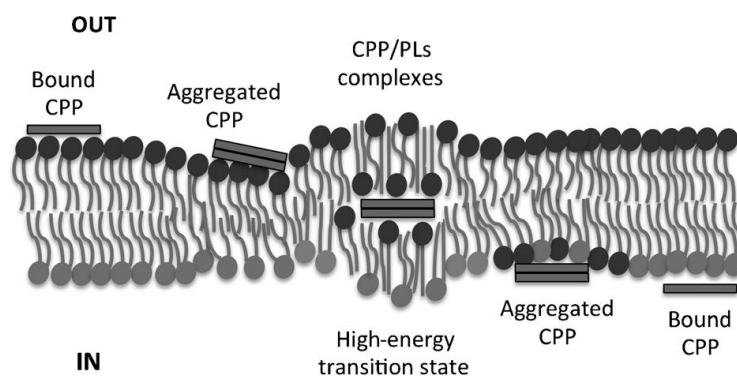


Figure 23 – Internalisation de CPP cationiques dans des LUV par co-transport de phospholipide anionique. (Source : Réf. ⁷⁷)

4. Méthodes de suivi de l'internalisation

L'étude du mécanisme d'entrée des CPP et l'évaluation des vecteurs nécessite l'utilisation de méthodes fiables permettant de mesurer les quantités de vecteur (ou de cargaison) internalisé dans la cellule, et d'analyser leur distribution et dégradation intracellulaire. Deux stratégies sont utilisées dans la littérature. La première repose sur l'utilisation de CPP (ou cargaison) marqués par une sonde (fluorophore ou radio-élément) permettant ainsi une quantification indirecte. La seconde repose sur le suivi de la réponse biologique de la cargaison vectorisée. Les méthodes les plus couramment utilisées dans la littérature sont présentées et comparées ci-dessous.

4.1 Techniques basées sur la fluorescence

Les techniques basées sur la fluorescence sont de loin les plus couramment exploitées pour évaluer l'internalisation des CPP. Les CPP (ou leur cargaison) sont marqués avec un fluorophore, correspondant le plus souvent à la fluorescéine et l'entrée cellulaire est ensuite mesurée en utilisant différentes techniques. Il convient de souligner que les propriétés d'internalisation des peptides marqués ne correspondent pas nécessairement à celles des peptides libres. En effet, le fluorophore, présentant souvent un caractère hydrophobe, peut affecter l'efficacité de pénétration et la distribution intracellulaire de certains peptides et aussi être à l'origine d'une certaine toxicité.⁷⁸ Il peut en être de même pour les autres types de sondes.

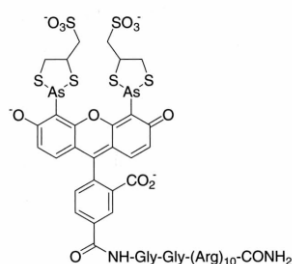
La microscopie :

Avant 2001, la plupart des études sur les CPP ont été effectuées en utilisant la microscopie confocale sur des cellules fixées. Lundberg *et al.* ont cependant montré que la fixation des cellules par du méthanol peut induire des artefacts au niveau de la localisation intracellulaire,⁷⁹ du fait de la redistribution du peptide au cours de cette étape. Il est à noter que la fixation par du formaldéhyde peut également conduire à un phénomène de redistribution,⁸⁰ lorsque le peptide ne contient dans sa séquence aucun résidu (Lys, Cys) capable de réagir. Depuis, il est donc devenu plus courant d'utiliser la microscopie confocale

sur cellules vivantes, la microscopie confocale permettant de visualiser la fluorescence des cellules dans un seul plan focal.

La microscopie est presque exclusivement utilisée pour analyser la distribution intracellulaire de l'espèce internalisée. Néanmoins il existe des techniques permettant de déterminer si les peptides sont intacts ou dégradés dans la cellule, en utilisant le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET). Stephen R. Adams et Roger Y. Tsien ont proposé un excellent procédé basé sur le FRET qui permet de mesurer en temps réel, la quantité de peptide intact internalisé dans le cytosol.⁸¹ Les peptides sont fonctionnalisés par un dérivé de la fluorescéine : FIAsH (Fluorescein Arsenical Hairpin binder, dont la longueur d'onde d'excitation est de 495 nm, **Figure 24-A**), substitué par deux atomes d'arsenic, chélatant hautement spécifique des résidus cystéine (chaque atome d'As se lie à deux Cys).

A)



B)

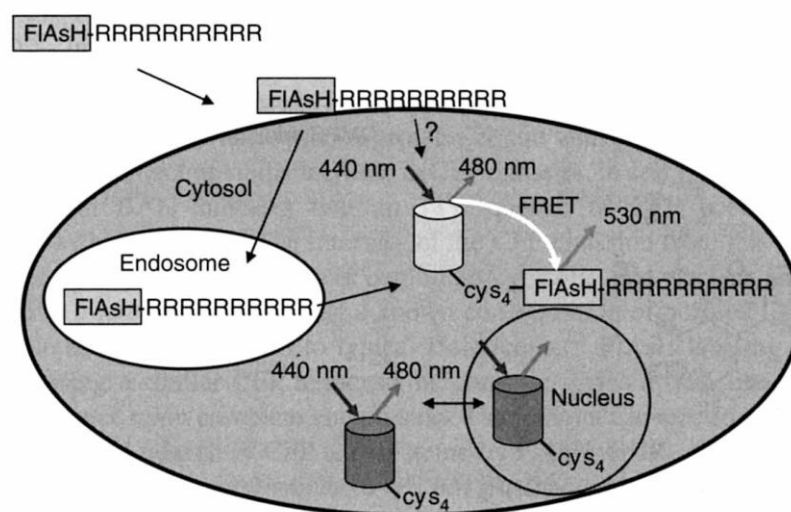


Figure 24 – A) Structure chimique de la fluorescéine modifiée FIAsH utilisée dans l'étude. B) Principe de la méthode de quantification par FRET. (Source : Réf.⁸¹)

Les cellules HeLa utilisées dans l'étude sont transfectées par un gène codant pour la protéine fluorescente CFP, fusionnée à une étiquette peptidique comportant quatre Cys. La CFP émet de la fluorescence à une longueur d'onde de 480 nm lorsqu'elle est excitée par une lumière de longueur d'onde de 440 nm. Après internalisation, une fois dans le cytosol (par translocation directe, ou fuite des endosomes) les peptides FIAsh-(R)_n se lient *via* les quatre Cys aux CFP (le ratio étant de 1/1). L'excitation des cellules à 440 nm induit une émission de fluorescence de la CFP à 480 nm, qui est transmise au FIAsh par FRET, induisant la baisse de fluorescence des CFP. Cette baisse de fluorescence comparée au signal avant l'internalisation, permet de déduire la concentration de CPP dans le cytosol.

FACS :

L'une des méthodes les plus couramment utilisée est la Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) qui est dérivée de la cytométrie en flux. C'est une technique qui permet de déterminer la fluorescence, cellule par cellule, ce qui conduit à des mesures beaucoup plus fines. Ainsi, il est possible de comparer de façon relative l'efficacité d'entrée d'un CPP dans diverses conditions (concentration, température) ou de comparer l'entrée de différents CPP. Il faut cependant garder à l'esprit que l'intensité de fluorescence d'une sonde peut varier selon la séquence du peptide auquel elle est liée et qu'il peut également exister des phénomènes d'extinction de fluorescence (par exemple lors de l'auto-association du peptide).

Les CPP présentent généralement une forte affinité pour la membrane plasmique et le peptide lié à la surface des cellules (ou peptide membranaire) ne peut être éliminé par simples lavages. Pour éviter toute surestimation des quantités internalisées, il est donc impératif de soumettre les cellules à un traitement permettant de distinguer le peptide internalisé du peptide membranaire. Ceci peut être réalisé, par exemple, par traitement des cellules au bleu de trypan qui permet d'éteindre le signal de la fluorescéine. Drin *et al.* ont également utilisé la sonde NBD (nitrobenzoxadiazole), fluorophore de petite taille et peu hydrophobe qui perturbe peu les propriétés des CPP et dont la fluorescence est éteinte en présence de dithionite de sodium, un agent réducteur non perméant.⁸² Une autre stratégie consiste à dégrader le peptide membranaire par traitement enzymatique de type pronase ou trypsine, les fragments de dégradation ayant, en principe, une affinité plus faible pour la membrane plasmique.⁸⁰ Cependant en dépit de ces précautions, comme avec la plupart des

techniques d'étude des CPP, il sera très difficile de faire la distinction entre les peptides dans la cellule et les peptides totalement enfouis dans la bicouche lipidique et non accessibles aux traitements chimiques et enzymatiques. D'autre part, cette technique n'apporte pas directement d'information sur la localisation intracellulaire du peptide, en particulier, elle ne permet pas de distinguer le peptide piégé dans les endosomes.

Des approches ont été proposées pour résoudre ce problème, notamment l'utilisation de constructions fonctionnalisées par un couple fluorophore / quencheur. L'acide aminobenzoïque (Abz), un fluorophore couplé au peptide transporté, a été utilisé par Hallbrink et ses collaborateurs pour l'étude de l'internalisation de plusieurs CPP. Tous les vecteurs portent un quencheur de l'Abz (la 3-nitrotyrosine) et ont été conjugués à la cargaison *via* un pont disulfure (**Figure 25**). Cette approche permet de mesurer uniquement la fluorescence du peptide « cargaison » internalisé, puisque c'est l'environnement cytosolique réducteur qui va permettre la libération de la cargaison et la visualisation d'un signal fluorescent.⁸³

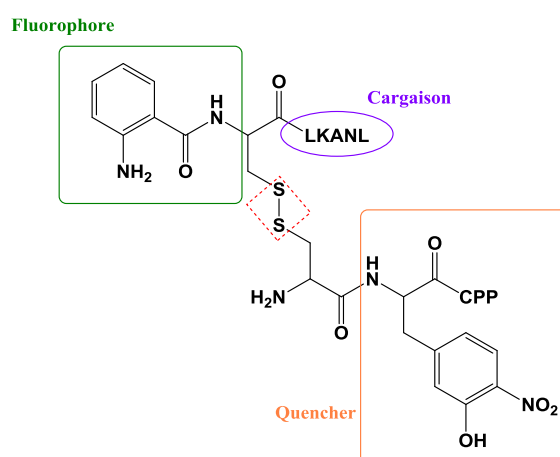


Figure 25 – Structure générale des conjugués utilisés lors de l'étude. La cargaison (cargaison en anglais) comportant le fluorophore Abz est conjuguée via un pont disulfure aux CPP comportant le quencheur de Abz. (Source : Réf. ⁸³)

L'HPLC :

La dégradation des peptides internalisés est une problématique qui, malheureusement, reste peu abordée dans la littérature. Cette question est cependant importante car elle peut donner des informations sur le mécanisme d'entrée. Par ailleurs, l'intégrité de la molécule transportée est souvent indispensable à l'observation de son activité biologique. En 1998, Oehlke *et al.* ont proposé une méthode analytique pour

distinguer les peptides internalisés intacts des peptides dégradés. Pour éviter toute surestimation de la quantité de peptide internalisé, le peptide membranaire est modifié par traitement des cellules avec la nitroaniline diazotée (réactif non perméant réagissant notamment avec les Lys). Après internalisation du CPP et lyse cellulaire, le lysat est analysé par HPLC en phase inverse couplé à un détecteur de fluorescence. Cette méthode permet de déterminer la quantité totale de peptide internalisé et également les proportions de peptide intact et dégradé.⁶ Cette technique a été exploitée par Palm *et al.* en 2007 dans l'étude de la cinétique de dégradation intracellulaire et extracellulaire de la Pénétratine et du peptide MAP.⁸⁴ Malgré tous ces avantages, cette méthode se limite à l'étude de peptides contenant des groupements capables de réagir avec la nitroaniline diazotée (amines) mais aussi une sonde fluorescente pour permettre le suivi en HPLC.

4.2 Technique basée sur la spectrométrie de masse

Au laboratoire, a été mis au point par F. Burlina *et al.* une méthode de quantification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.⁸⁵ C'est l'unique méthode qui permet à la fois de quantifier de manière absolue et directe le peptide internalisé et d'identifier ses différents fragments issus de la dégradation par les protéases intracellulaires. Cette méthode de suivi, utilisée dans mes travaux de recherche, sera présentée dans la partie résultats de ce manuscrit (chapitre IV.2).

4.3 Microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission (TEM), représente un puissant outil de visualisation à très haute résolution des compartiments cellulaires. Il est donc possible de suivre avec précision la localisation subcellulaire des peptides internalisés. Bien qu'étant la méthode offrant le meilleur suivi, la plupart des laboratoires ne sont pas équipés. Le groupe de M. Pooga a souvent eut recours à cette technique, notamment dans l'étude du trafic intracellulaire du Transportan.⁸⁶

4.4 Techniques basées sur une réponse biologique induite

Dans le cas du suivi de l'activité biologique associée à l'espèce transportée, la cible intracellulaire choisie est le plus souvent localisée dans un compartiment bien défini de la cellule (cytosol ou noyau). Cette stratégie est donc extrêmement intéressante pour la sélection de vecteurs ciblant un compartiment précis. Les données obtenues ne permettent cependant pas à elles seules d'étudier les différentes voies d'entrée d'un CPP. En effet, cette stratégie ne permet de « visualiser » que les espèces ayant rejoint leur cible intracellulaire qui ne représentent généralement qu'une faible proportion des espèces internalisées. De plus, l'intensité de la réponse biologique dépend de nombreux facteurs dont bien évidemment, la quantité d'espèce bioactive transportée dans le compartiment cellulaire ciblé mais aussi de la stabilité métabolique du composé dans la cellule et de son affinité pour sa cible biologique.

Correction d'épissage :

L'utilisation d'oligonucléotides de correction d'épissage SCO (splice correcting oligonucleotides) comme outils d'évaluation de la capacité de délivrance des CPP est de plus en plus utilisée. Cette méthode repose sur l'utilisation des cellules HeLa^{Luc} 705 transfectées par le gène rapporteur de la luciférase qui est muté et contient un site d'épissage aberrant conduisant à l'expression de luciférase non fonctionnelle.⁸⁷ La vectorisation de SCO capables de masquer ce site d'épissage permet d'induire la production de luciférase fonctionnelle. Ainsi il est possible d'évaluer la capacité des CPP en tant que vecteurs de délivrance en les couplant aux SCO. De plus, comme l'épissage est un processus qui se déroule dans le noyau, ce test révèle les conjugués CPP-SCO ayant pu rejoindre ce compartiment.

Cre-recombinase :

Une autre méthode intéressante, cette fois-ci pour l'étude de la vectorisation de protéines par les CPP est basée sur le système Cre-loxP. La Cre-recombinase est une enzyme qui catalyse la recombinaison d'ADN entre les domaines loxP (**Figure 26**).⁶¹ Le groupe de S. Dowdy a mis en œuvre ce système pour étudier le mécanisme d'entrée de Tat. Pour cela les

cellules sont transfectées par et avec un gène rapporteur de la GFP (Green Fluorescent Protein), mis sous contrôle d'un système loxP-STOP-loxP (qui bloque l'expression de la GFP). L'internalisation de Tat-Cre dans ces cellules, permet, l'excision du segment d'arrêt, et l'expression de la GFP. Ainsi, cette méthode a montré l'efficacité de Tat pour la délivrance dans le noyau d'une cargaison de taille importante. Cette méthode reste cependant peu utilisée. En effet, elle repose sur l'expression recombinante de CPP-Cre, plutôt laborieuse, et parfois difficile à produire en quantités importantes. De plus, Cre est une protéine de poids moléculaire élevé, il faut donc garder à l'esprit, notamment lors d'études mécanistiques, que sa conjugaison au CPP peut modifier les propriétés du vecteur.

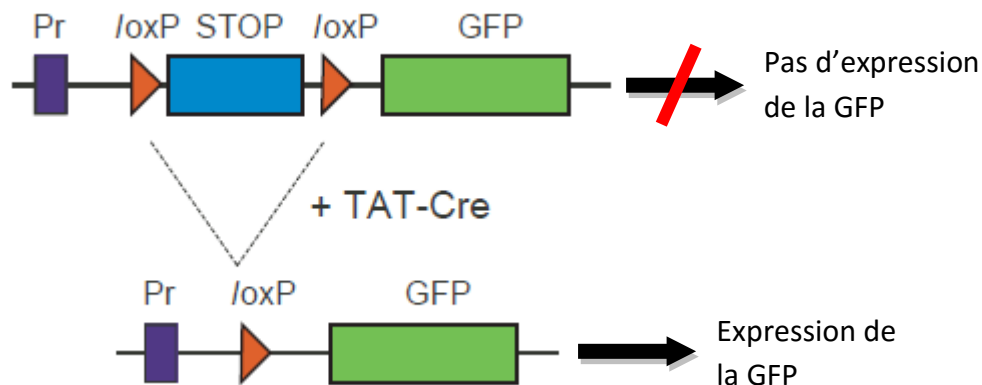


Figure 26 – Régulation de l'expression du gène de la GFP sous l'action de la Cre-recombinase
(Source : Réf. ⁶¹)

Le tableau ci-dessous récapitule les avantages et inconvénients des différentes méthodes exposées.

Méthode	Résultat	Avantages	Inconvénients
Microscopie	Localisation intracellulaire des CPP	Non biaisé par les peptides liés à la membrane	Pas de discrimination entre peptides intacts et dégradés
Microscopie électronique	Localisation intracellulaire des CPP	Visualisation haute résolution de la cellule	Préparation laborieuse des échantillons
HPLC	Quantification du CPP internalisé intact	Distinction du peptide intact et dégradé	Limité aux séquences réagissant avec la nitroaniline diazotée. Pas de localisation intracellulaire
FACS	Quantification relative de l'internalisation des CPP	Données sur le pourcentage de cellules transfectées et discrimination entre cellules vivantes et mortes	Pas de distinction entre peptides intacts et dégradés. Pas de localisation intracellulaire
Quantification par MALDI-TOF MS	Quantification absolue du CPP internalisé intact	Analyse de la dégradation intracellulaire des CPP	Pas de localisation intracellulaire
Suivi de l'activité biologique de la cargaison	Quantification indirecte de la cargaison ayant rejoint sa cible	Etude de la vectorisation dans un compartiment spécifique de la cellule	Visualisation uniquement de la cargaison ayant rejoint sa cible

Tableau 4 – Comparaison des différentes méthodes utilisées dans les études d'internalisation des CPP.

5. Optimisation des propriétés des CPP

5.1 Favoriser la fuite des endosomes

Les endosomes sont des vésicules qui permettent le tri des molécules internalisées par endocytose. Ces molécules peuvent être soit recyclées et redirigées vers la membrane plasmique (cas des récepteurs membranaires), être dégradées par des complexes enzymatiques dans les lysosomes, ou enfin être dirigées vers d'autres compartiments intracellulaires (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique, *etc.*) pour agir dans la cellule. Ainsi, une fraction plus ou moins importante des conjugués CPP-cargaison internalisés par endocytose restent piégés dans les endosomes ou sont prématurément dégradés. Ce phénomène représente un des facteurs qui limite l'efficacité des CPP. Plusieurs approches ont été développées dans la littérature afin de promouvoir la sortie des endosomes et permettre à la cargaison de rejoindre sa cible intracellulaire. La première stratégie correspond à l'utilisation d'agents lysosomotropes comme la chloroquine (CQ), le sucrose ou le calcium. La CQ est une base faible, relativement hydrophobe, qui pénètre dans les cellules et s'accumule dans les endosomes et lysosomes. A faible concentration, la CQ agit comme inhibiteur de l'acidification des endosomes empêchant ainsi leur maturation. A forte concentration, l'accumulation de cette base tamponnant les endosomes, entraîne leur gonflement et leur rupture par entrée de molécules d'eau.⁸⁸ Il est à noter que la CQ est également utilisée pour mettre en évidence l'entrée des CPP par endocytose. Ainsi, dans l'étude de Tat-Cre par le groupe de S. Dowdy,⁶¹ les auteurs ont relaté une augmentation de l'efficacité de délivrance du CPP en présence de chloroquine. Cependant la dose efficace de chloroquine ($\geq 100 \mu\text{M}$) est souvent associée à une cytotoxicité qui limite son utilisation *in vivo*. Afin de contourner ce problème de cytotoxicité, le groupe de U. Langel a conçu le CPP PepFect6 qui est fonctionnalisé par un analogue de la chloroquine (trifluorométhylquinoline, QN) (**Figure 27**).⁸⁹

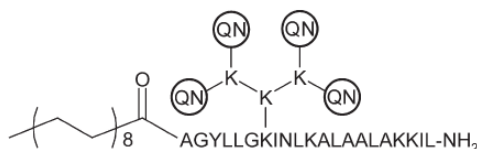


Figure 27 – Structure chimique du CPP PepFect6. QN= trifluorométhylquinoline (Source : Réf.⁸⁹⁾)

D'autres approches existent, non toxiques, comme l'incorporation d'histidines dans la séquence des CPP. Le groupement imidazole des histidines (pK_a 6.0) peut agir comme « éponge à protons ». Non protoné à pH physiologique, il se protone au pH plus acide des endosomes tardifs (pH 5-6,5). La protonation des résidus histidines se traduit par un gonflement des endosomes (par entrée d'eau), à la rupture de leur membrane et à la libération des CPP. Ainsi le peptide Tat a été conjugué à la séquence His₁₀ pour la transfection d'ADN plasmidique codant pour le gène rapporteur de la luciférase. Cette modification a permis d'améliorer l'efficacité de transfection de façon considérable (7000 fois) par rapport à la valeur obtenue avec le peptide Tat original.⁹⁰

L'induction photochimique (PCI, photochemical internalization) est une autre méthode utilisée pour stimuler la sortie des endosomes des CPP ou de leur conjugués. Cette technique consiste en la co-incubation du conjugué CPP-cargaison avec un agent photo-sensibilisateur qui se localise préférentiellement dans la membrane cellulaire, puis l'irradiation des cellules à une longueur d'onde spécifique (**Figure 28**). L'excitation du photo-sensibilisateur induit la formation d'espèces d'oxygène réactives (ROS). Les ROS sont responsables de la rupture des vésicules endosomales favorisant ainsi la libération du CPP dans le cytosol.⁹¹ Cette technique a été employée dans plusieurs études, notamment dans la délivrance de PNA.⁹² M. Pooga *et al.* ont montré qu'il était possible d'utiliser le principe de la PCI sans ajout extérieur d'agent photo-sensibilisateur. En effet, en conjuguant covalamment TP10 à un fluorophore (Alexa fluor 633, ou Texas Red) et sous l'effet d'une brève irradiation (545 – 580 nm), le conjugué était en mesure de promouvoir une sortie endosomale.⁹³

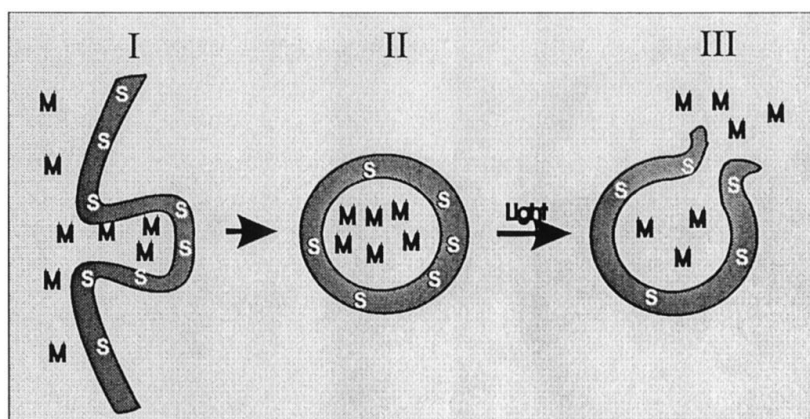


Figure 28 – Transport de molécules dans le cytosol par PCI. I : co-incubation du photo-sensibilisateur (S) avec le CPP (M) ; II : endocytose, et piégeage dans l'endosome ; III : irradiation, et libération, dans le cytosol. (Source : Réf.⁹¹)

Il existe encore plusieurs approches permettant l'amélioration de la sortie endosomale, comme, l'utilisation de peptides fusogènes sensibles au pH,⁶¹ ou encore l'augmentation de l'hydrophobie du CPP en utilisant des chaînes aliphatiques afin de déstabiliser la membrane endosomale.⁹⁴ HA2, un peptide composé des 20 aminoacides de la séquence N-terminale de la protéine hémagglutinine du virus grippal, est un peptide fusogène. A pH faible, HA2 permet la déstabilisation de la membrane endosomale permettant le relargage du contenu de l'endosome dans le cytosol. Ainsi, l'efficacité de transduction de la protéine Tat-Cre a été accrue en co-traitant les cellules avec le conjugué Tat-HA2, sans induire la moindre cytotoxicité.⁶¹

5.2 Modifications chimiques des CPP

De nombreuses modifications chimiques des CPP ont été proposées dans la littérature pour augmenter leur efficacité. Elles correspondent à des modifications au niveau du squelette peptidique du vecteur ou à des fonctionnalisations du CPP, essentiellement par des groupements lipophiles.

5.2.1 Pseudo-peptides linéaires

De très nombreuses recherches ont visé à modifier la distribution spatiale des groupements fonctionnels des CPP importants pour l'internalisation en modifiant le squelette peptidique du vecteur. L'impact de la distribution des groupements guanidinium dans les séquences de CPP riches en Arg a été largement étudié par Wender *et al.*⁷ La première modification a porté sur la chiralité des résidus. Il a été montré que des séquences Arg_n constituées d'acides aminés de série D sont quasiment deux fois mieux internalisées que leurs homologues de configuration naturelle L. Cela a été attribué à une stabilité métabolique accrue du CPP permettant une accumulation plus importante dans la cellule. Les auteurs ont par la suite conçu une série de peptoides achiraux fonctionnalisés par des groupes guanidinium préservant, dans un premier temps, l'écartement (1-4) entre les chaînes latérales. La structure du squelette est composée d'unités de glycine *N*-substituée. La chaîne latérale étant portée par l'azote (et non plus par le C α) (**Figure 29**) ceci rend impossible la formation de structures secondaires et confère de plus une résistance totale vis-à-vis des protéases.

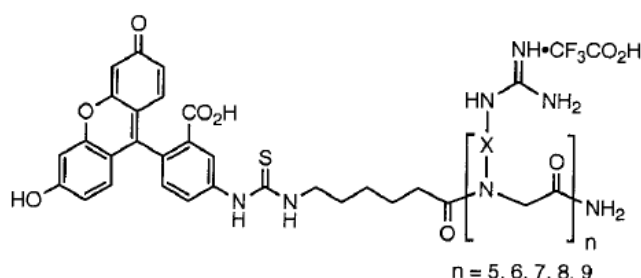


Figure 29 – Structure de peptoides proposés par l'équipe de P. Wender. Abréviations : **N-etg**, $X = (CH_2)_2$; **N-arg**, $X = (CH_2)_3$; **N-btg**, $X = (CH_2)_4$; **N-hxg**, $X = (CH_2)_6$; **N-ocg**, $X = (CH_2)_8$; **N-chg**, $X = \text{trans-1,4-cyclohexyle}$. (Source : Réf. ⁷)

Le CPP R₉ et son homologue modifié N-arg₉ présentent des efficacités similaires. Ceci suggère que l'établissement de liaisons hydrogène au niveau du squelette peptidique n'est pas nécessaire pour une bonne efficacité d'entrée dans les cellules. Par la suite, l'effet de la longueur des chaînes latérales a été évalué. Une relation linéaire entre le nombre croissant

de méthylènes de la chaîne latérale et l'efficacité d'internalisation a été établie ($N\text{-hxxg9} > N\text{-btg9} > r_9 \approx N\text{-Arg9} > N\text{-etg9}$) (**Figures 29 et 30**). Afin d'établir si ce gain d'efficacité est dû à une augmentation d'hydrophobie ou plutôt à une plus grande flexibilité de la chaîne latérale, le composé $N\text{-chg9}$ a été testé. $N\text{-chg9}$ comprend comme chaîne latérale un cyclohexyle, comportant le même nombre d'atomes de carbone que $N\text{-hxxg9}$ mais ayant une flexibilité réduite du fait de sa forme cyclique. Les résultats révèlent une très faible pénétration du dérivé $N\text{-chg9}$ par rapport à toute la série de peptoïdes synthétisés. Il est donc important d'après cette étude, d'avoir une chaîne latérale stériquement non encombrée et offrant un degré de liberté important aux groupements guanidinium.

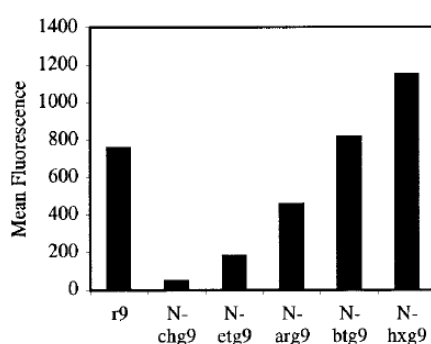


Figure 30 – Effet de la longueur de la chaîne latérale des différents analogues sur l'efficacité d'internalisation. Tous les peptides sont marqués par de la fluorescéine et l'internalisation dans les cellules Jurkat est quantifiée par cytométrie en flux. (Source : Réf. ⁷)

Une autre modification du squelette peptidique consiste à utiliser des acides β -aminés (**Figure 31**), modification qui permet d'augmenter l'espacement entre les chaînes latérales des résidus adjacents (1-5 et/ou 1-6 au lieu de 1-4) et apporte également une certaine flexibilité à la structure et une meilleure résistance vis-à-vis de la dégradation par les protéases. De plus, les β -peptides adoptent des structures secondaires différentes de celles des α -peptides.⁹⁵ Ainsi, la capacité d'internalisation d'homologues modifiés des vecteurs Tat,⁹⁶ K_7 , et R_7 ⁹⁷ a été évaluée sur cellules par microscopie confocale. Les résultats ont montré que l'efficacité d'internalisation cellulaire était préservée (voir améliorée) malgré une modification importante au niveau du squelette peptidique et ce en accord avec les travaux précédents réalisés par Wender et ses collaborateurs.⁷

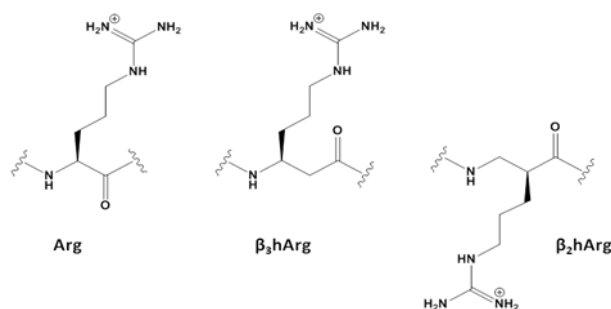


Figure 31 – Structure d'un acide β -aminé.

L'incorporation de résidus Ahx (acide 6-aminohexanoïque) au sein de la séquence de CPP afin d'espacer les résidus cationiques, a aussi pour effet d'accroître son hydrophobie et confère une certaine souplesse au peptide. Il a été observé que cette modification diminue l'interaction du vecteur avec les héparanes sulfate situés à la surface de la cellule.⁹⁸ Cette diminution d'interaction permet, d'après les auteurs, au conjugué de s'échapper plus efficacement des endosomes. Abes *et al.* ont appliqué cette démarche sur le CPP R₈, en intercalant les arginines avec des dérivés Ahx.⁹⁹ Le CPP modifié (R-Ahx-R)₄ a été conjugué à un PMO (Phosphorodiamidate morpholino oligomer) conçu pour corriger l'épissage de pré-ARNm. Les données ont révélé une augmentation de l'activité biologique suite à l'internalisation du conjugué (R-Ahx-R)₄-PMO par rapport à son analogue R₈-PMO.

Il a été décrit dans la littérature que les peptides riches en résidus proline pouvaient s'internaliser dans les cellules eucaryotes.¹⁰⁰ Les homopolymères de proline adoptent en solution aqueuse une structure secondaire hélicoïdale compacte, appelée polyproline II (PPII). L'hélice PPII est gauche et constituée de 3 résidus par tour. Par ailleurs, les peptides riches en Pro présentent l'avantage d'avoir une bonne solubilité. Le groupe de E. Giralt a élaboré une série de séquences peptidiques amphipatiques (VRLPPP)_n¹⁰¹ adoptant une conformation en PPII. Dans cette série, le peptide (VRLPPP)₃ présente la meilleure efficacité de pénétration cellulaire mais reste quinze fois moins efficace que Tat. Cependant, le remplacement d'un résidu proline par son analogue γ -(diméthylsila)-proline (Sip), un dérivé plus hydrophobe qui ne change pas la structure secondaire, augmente l'efficacité d'internalisation du peptide d'un facteur 20 (**Figure 32**).¹⁰²

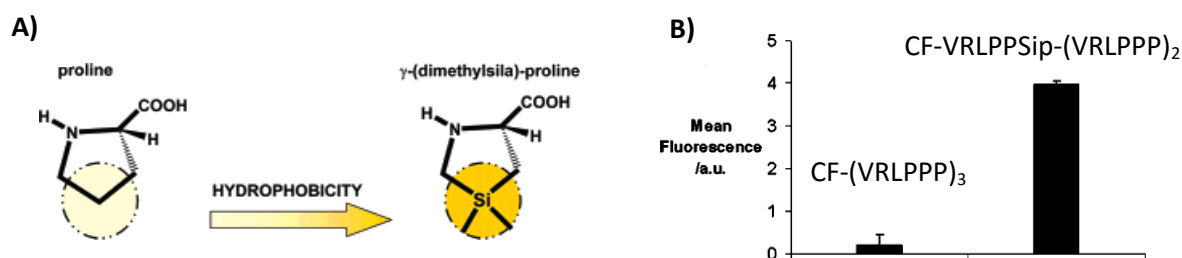


Figure 32 – A) Structures de la proline et de la γ -(dimethylsila)-proline (Sip). B) Effet du remplacement d'une Pro par un Sip sur l'efficacité d'internalisation. Tous les peptides sont marqués par de la fluorescéine (CF) et l'internalisation dans les cellules HeLa est quantifiée par cytométrie en flux. (Source : Réf. ¹⁰²)

D'autres modifications chimiques sur les prolines sont encore possibles, comme l'utilisation d'hydroxyprolines. La fonction hydroxyle peut être modifiée par O-alkylation, c'est ainsi que Fillon *et al.* ont incorporé au sein d'unités monomériques d'hydroxyproline, des groupements hydrophobes (isobutyle, pour mimer la leucine, P_L) et cationiques (guanidinium, pour mimer l'arginine, P_R) (**Figure 33-A**).¹⁰³ En prenant en compte la structure de l'hélice PPII, les auteurs ont conçus des vecteurs amphiphiles secondaires (**Figure 33-B**). Le peptide de séquence (P_LP_RP_R)₃P_L avec 6 groupements guanidinium a montré une internalisation dans les cellules MCF-7, avec une efficacité accrue d'un ordre de grandeur par rapport au vecteur Tat.

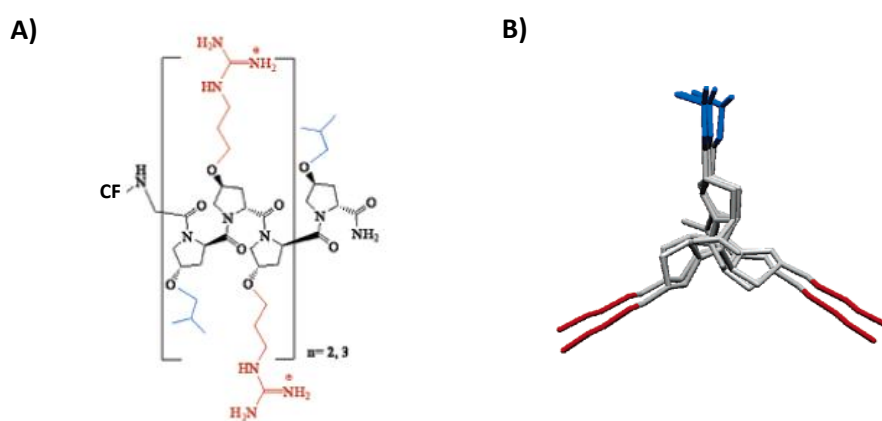


Figure 33 – A) Structure de l'oligomère polyproline fonctionnalisé par des groupements guanidinium P_R en rouge, et des groupements isobutyle P_L en bleu; CF = carboxyfluorescéine. B) Vue du dessus d'une hélice PPII contenant des chaînes latérales modifiées : cationiques en rouge, et hydrophobes en bleu). (Source : Réf. ¹⁰³)

5.2.2 Structures arborescentes

En 1988, l'équipe de J. Tam a développé un système permettant la présentation de multiples sites antigéniques et résultant de l'oligomérisation sur support solide d'unités Lys par acylation simultanée des amines α et ε de l'acide aminé. Ce système a été testé biologiquement sur des modèles animaux induisant dans la majorité des cas (selon le nombre de branches fonctionnalisées) une réponse immunitaire, et montrant ainsi l'utilité d'un tel outil pour la conception de futurs vaccins.¹⁰⁴

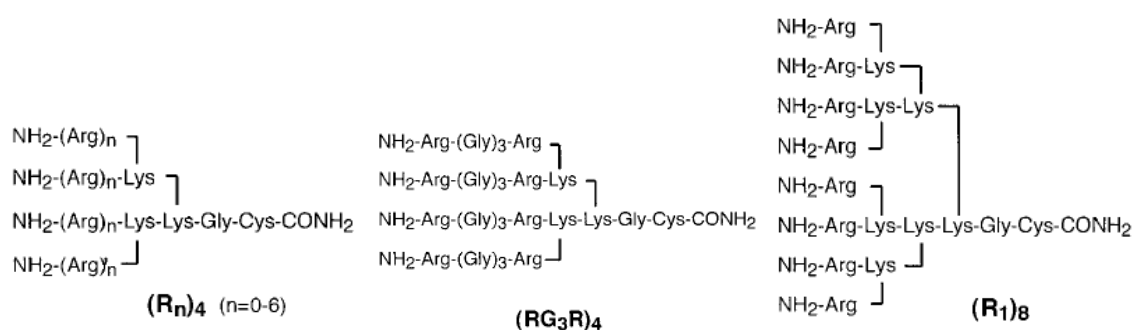


Figure 34 – Structures des vecteurs à chaînes branchées riches en arginine. (Source : Réf.¹⁰⁵)

S. Futaki et ses collaborateurs se sont inspirés du système proposé par Tam pour le développement des nouveaux vecteurs à l'architecture arborescente présentés dans la Figure 34.¹⁰⁵ De façon intéressante, comme pour les CPP linéaires (Arg)_n, l'efficacité d'internalisation des CPP branchés dépend majoritairement du nombre de résidus arginine. Le composé (R₂)₄ possède la meilleure capacité d'internalisation avec le plus fort niveau de localisation nucléaire. Les dérivés (RG₃R)₄ et (R₁)₈ sont aussi internalisés efficacement, montrant ainsi la non nécessité d'avoir un squelette peptidique linéaire pour la présentation des groupes guanidinium. Le CPP (R₂)₄ a par la suite été conjugué à l'anhydrase carbonique et son potentiel de délivrance de larges protéines a ainsi été évalué. Les analyses de microscopie confocale du conjugué ont démontré une localisation prédominante dans le cytoplasme et dans le noyau.

Les différentes études menées par Wender *et al.* avaient suggéré l'importance de la flexibilité du squelette du vecteur et de l'éloignement des charges portées par les

groupements guanidinium pour une internalisation cellulaire efficace. Ces auteurs ont synthétisé par la suite une série de neuf dendrimères polycationiques portant des branches de longueurs variables et fonctionnalisés par huit groupements guanidinium (**Figure 35**).¹⁰⁶ L'étude de cette librairie de vecteurs a montré à nouveau que plus la chaîne hydrocarbonée est longue ($n = 5$, $k = 5$) et la structure du dendrimère flexible, meilleure est l'internalisation.

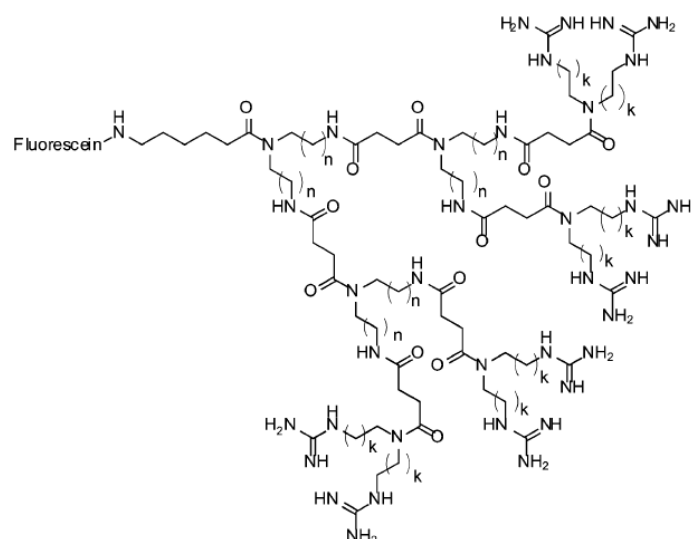


Figure 35 – Structure générale des dendrimères polycationiques à chaînes modulables (n et $k = 1, 2$ ou 5). (Source : Réf.¹⁰⁶)

Afin d'étudier l'impact de la distribution spatiale des groupements fonctionnels des vecteurs, B. Aussedat *et al.* ont conçu dans notre laboratoire une unité monomérique (**Figure 36-A**) comportant la bis-ornithine (bisOrn), un nouvel acide aminé α,α -disubstitué, permettant un accès facile à des composés de structure linéaire ou arborescente.¹⁰⁷ Tous les vecteurs ont été conjugués *via* pont disulfure à un peptide inhibiteur de protéine kinase C (peptide PKCi) et le PKCi vectorisé a été quantifié par spectrométrie de masse MALDI-TOF. De façon inattendue, les pseudo-peptides linéaires fonctionnalisés par 8 groupes ammonium ou guanidinium possèdent la même efficacité d'internalisation. Par ailleurs, en dépit de la présence d'un nombre optimal de groupes guanidinium (9), les pseudo-peptides linéaires ou dendrimères (**Figure 36-B**) purement cationiques sont légèrement moins efficaces que le CPP Arg₉. L'élongation des chaînes latérales du pseudo-peptide linéaire permettant d'augmenter l'accessibilité des groupes guanidinium n'améliore pas l'efficacité d'entrée. Les squelettes développés ici ne permettent donc pas une présentation optimisée des groupes

cationiques, ces structures restent néanmoins intéressantes car achirales (simplification des processus de synthèse) et résistantes vis-à-vis des protéases.

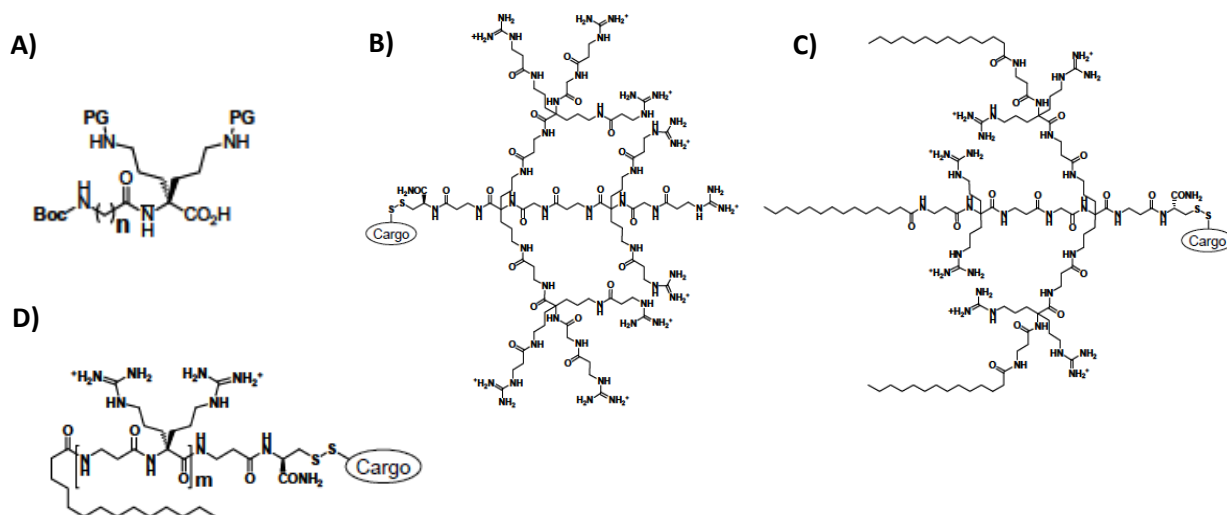


Figure 36 – A) Structure de l'unité monomérique contenant la bis-ornithine : $n = 1$ glycine, $n = 2$ β -alanine, PG = groupement protecteur. B) Exemple de dendrimer monofonctionnalisé par des guanidiniums. C) Exemple de dendrimer fonctionnalisé par des chaînes aliphatiques. D) Structure d'un lipo-pseudeptide linéaire. (Cargo = peptide transporté = PKCi) (Source : Réf. ¹⁰⁷)

5.2.3 CPP fonctionnalisés par des chaînes d'acide gras

Parmi les nombreuses modifications introduites dans la structure des CPP afin d'améliorer leurs propriétés de vectorisation, l'incorporation de groupes hydrophobes s'est révélée particulièrement prometteuse. L'association covalente ou non de ces groupements aux CPP, change leurs propriétés physico-chimiques, influençant ainsi leur potentiel de pénétration. L'augmentation de l'hydrophobie a pour objectif de favoriser la translocation directe ou la fuite des endosomes. Ainsi dès le début des années 1990, il a été montré que l'acylation de pseudo-substrats peptidiques par une chaîne d'acide myristique (C14) en position N-terminale de leur séquence, augmente leur pénétration et leur capacité à atteindre leur cible cytosolique.^{108,109} Par la suite l'incorporation de chaînes d'acides gras dans les séquences de CPP a été envisagée. S. Futaki et ses collaborateurs, ont étudié l'effet

de l'acylation des CPP polyArg sur leur efficacité de transfection d'ADN plasmidique.⁹⁴ L'acylation de R₈ en position *N*-terminale par une chaîne d'acide stéarique (C18) a pour effet d'augmenter la stabilité du complexe non covalent CPP-oligonucléotides en le rendant plus compact. L'acylation de R₈ a considérablement augmenté son efficacité de transfection, au point d'égaliser l'efficacité de la lipofectamine, l'un des plus puissants agents de transfection disponible dans le commerce. Quelque temps après, Pham et ses collaborateurs ont mis en avant l'effet de la longueur de la chaîne lipidique sur le potentiel de pénétration du vecteur R₇ marqué par de la fluorescéine.¹¹⁰ Les tests réalisés sur des cellules HeLa indiquent que l'acylation par un acide myristique confère une meilleure efficacité par rapport aux autres chaînes aliphatiques (de 6 à 16 résidus) (**Figure 37-A**). Il est intéressant de signaler que d'après cette étude, une séquence minimale de 4 Arg couplée à un acide myristique en extrémité *N*-terminale (C14-R₄), a la même efficacité de pénétration que les peptides Tat et R₇.

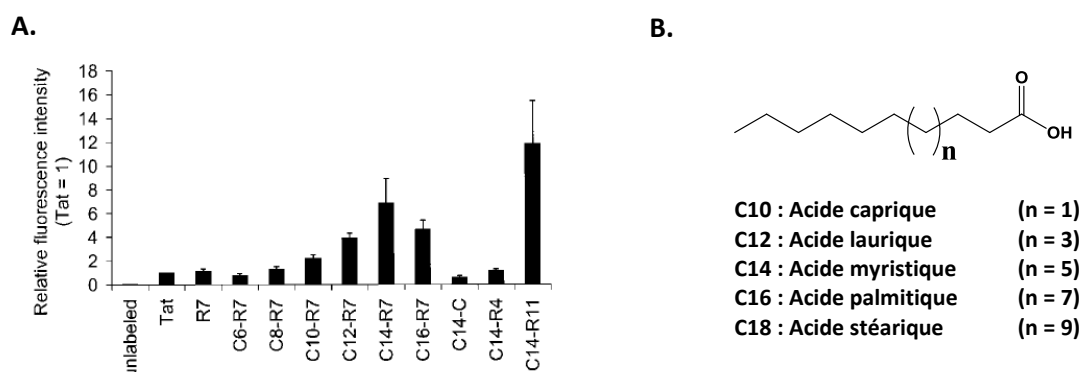


Figure 37 – A : Résultats de quantification par FACS de la librairie de lipopeptides fluorescents. (Source : Réf. ¹¹⁰). B : exemples de chaînes d'acides gras saturés

K. Parang et son équipe ont minimisé la structure et synthétisé un dérivé amphiphile nommé PA4, composé d'un seul résidu arginine et de deux lysines acylées par l'acide palmitique : K(C16)-R-K(C16).¹¹¹ L'étude a révélé que PA4 augmente significativement l'efficacité d'internalisation et la localisation cytosolique du nucléoside 3TC agissant comme un inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH. Au laboratoire B. Aussedat a également montré que l'introduction d'une ou de trois chaînes myristyl (**Figure 36-C**) augmente significativement l'internalisation de pseudo-peptides linéaires ou dendrimériques

possédant de 2 à 8 groupes guanidinium.¹⁰⁷ Par la suite, l'influence de la nature de la chaîne lipidique a été étudiée au laboratoire lorsque le domaine cationique des CPP était minimisé à 4 Arg.¹¹² Ces travaux seront discutés plus en détail dans le chapitre II « justification du design et de l'approche synthétique ».

5.2.4 CPP cycliques

Un grand nombre de peptides cycliques naturels ont été isolés, que ce soit d'organismes marins, de plantes ou de microorganismes. Depuis, ils ont fait l'objet de nombreuses études conduisant à la mise en valeur de leurs propriétés biologiques intéressantes. Cet intérêt grandissant pour les peptides cycliques, a fait d'eux d'excellents candidats pour le développement de nouveaux composés thérapeutiques. La ciclosporine (un agent immunosuppresseur largement employé dans le domaine de la transplantation), la gramicidine S (un antibiotique efficace contre certaines bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que certains champignons), ou encore la daptomycine (un puissant antibiotique lipopéptidique) en sont des exemples.

Malgré les nombreuses modifications chimiques de CPP déjà proposées, le besoin de développer des CPP enzymatiquement plus stables et qui évitent le piégeage dans les endosomes persiste. La cyclisation tête-queue du squelette des peptides (par ligation des extrémités *N* et *C*-terminales) permet d'augmenter leur stabilité métabolique et également de restreindre leur espace conformationnel. L'utilisation de peptides cycliques dans le domaine de la délivrance intracellulaire de molécules bioactives n'est explorée que depuis peu d'années. Je vais m'attacher dans ce chapitre à présenter les différentes études de CPP cycliques qui ont été, à ma connaissance, décrites à ce jour. Nous verrons selon les études l'effet de la cyclisation sur l'efficacité d'entrée et sur le mécanisme employé. L'aspect synthétique (obtention des CPP cycliques, rendements, stratégies employées) sera peu discuté du fait du peu de données disponibles dans certaines des publications présentées ci-dessous, celles-ci s'attachant plus à l'aspect biologique.

Note : Pour plus de facilité de lecture des séquences peptidiques, dans ce manuscrit, les crochets *[]* ont été utilisés pour représenter les CPP cycliques.

Le premier laboratoire à s'être intéressé à la synthèse de CPP cycliques est celui de K. Parang. En 2011, ce groupe a évalué une série de onze peptides cycliques amphiphiles comportant alternativement des résidus hydrophobes (W, F, L) et des résidus chargés positivement ou négativement (K, R, E), présentés dans la **Figure 38**.¹¹³

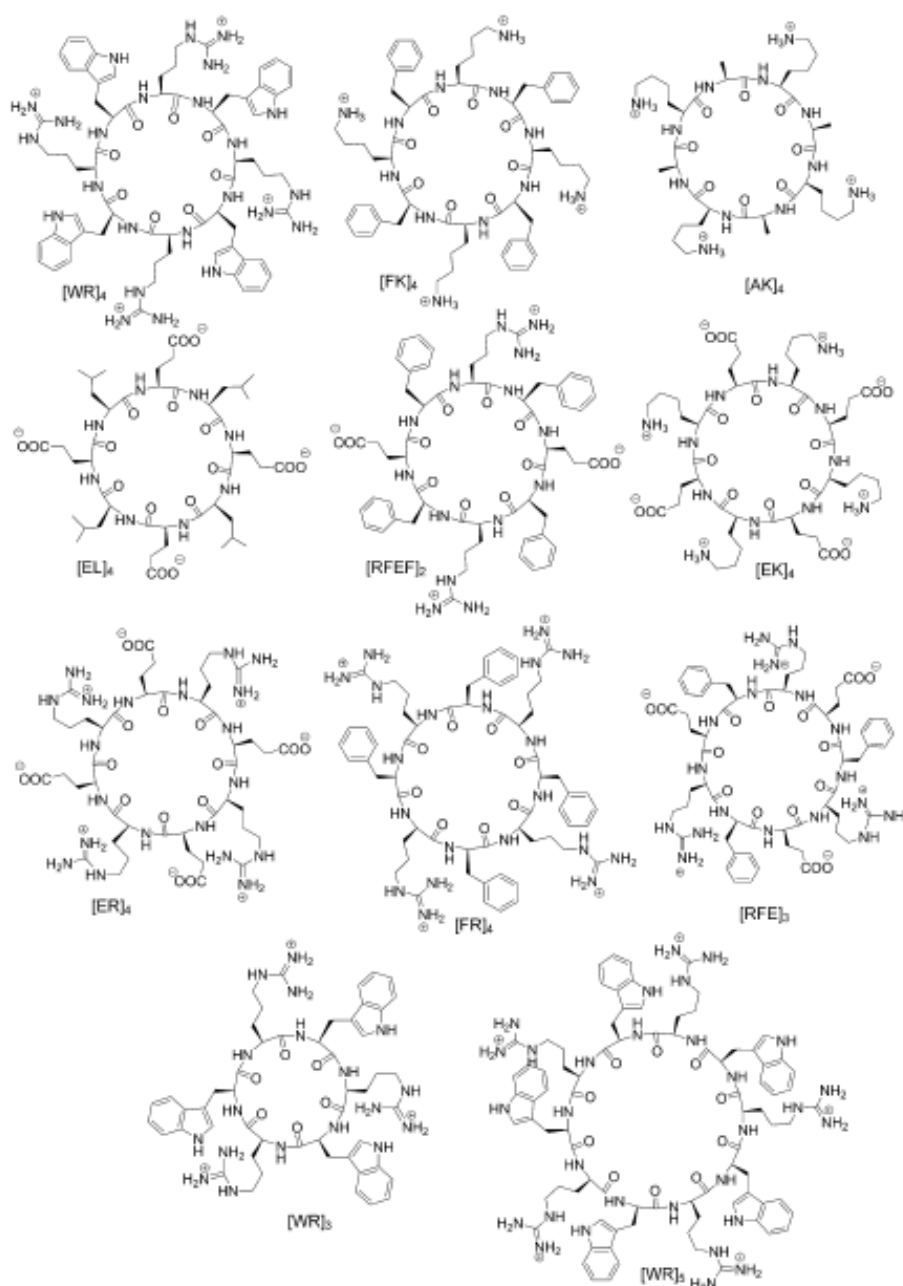


Figure 38 – Structures des peptides cycliques utilisés dans l'étude effectuée par le laboratoire de Parang. (Source : Réf. ¹¹³)

[I. INTRODUCTION]

Le potentiel de ces CPP a été évalué par le transport d'un analogue de nucléoside marqué par un fluorophore (la lamivudine, un inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH) sur des cellules leucémiques lymphoblastiques humaines (CCRF-CEM). Les analyses par FACS et microscopie confocale (après digestion trypsique de la fraction membranaire) ont révélé que seuls les peptides $[WR]_4$ et $[WR]_5$ sont capables de se complexer à la cargaison et de permettre sa délivrance efficace. Pour confirmer l'efficacité de ces deux vecteurs, leurs analogues marqués par la fluorescéine (**Figure 39**) ont été testés sur quatre lignées cellulaires différentes.

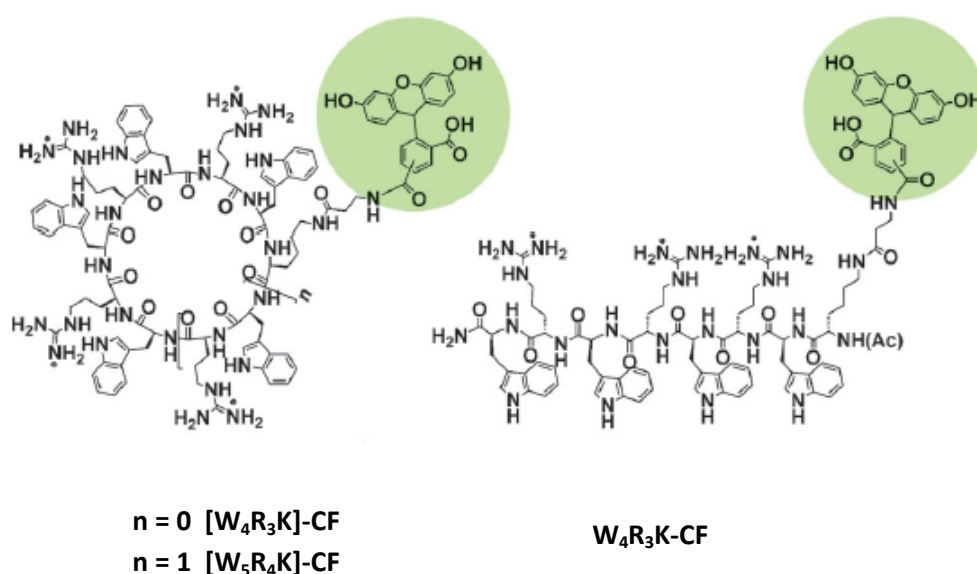


Figure 39 – Structures des analogues cycliques et linéaires couplés à la carboxyfluorescéine CF (en vert). (Source : Réf. ¹¹³)

L'efficacité d'internalisation et la localisation intracellulaire (principalement nucléaire) de ces deux CPP sont semblables sur les 4 lignées utilisées (CCRF-CEM, SK-OV-3, HT-29 et MDA-MB-468). De plus, une étude mécanistique (utilisation d'inhibiteurs d'endocytose, incubation des cellules à 4°C) a conduit les auteurs à proposer que ces CPP cycliques pénètrent exclusivement par translocation directe. K. Parang et son équipe ont aussi montré que la cyclisation d'une séquence peptidique composée de Trp et de Arg doublait son efficacité d'entrée (**Figure 40**). Toutefois, aucune comparaison par rapport à un CPP « classique » plus couramment utilisé comme Tat ou R_9 n'a été faite dans cette étude.

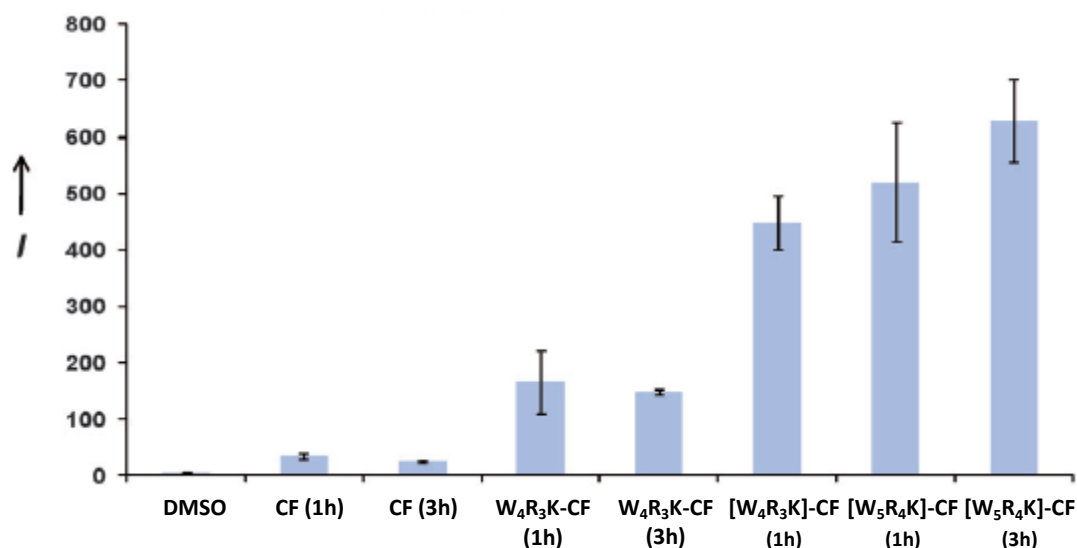


Figure 40 – Comparaison de l'efficacité d'internalisation des analogues cycliques [W₅R₄K]-CF et [W₄R₃K]-CF, et de la version linéaire W₄R₃K-CF. Les peptides sont marqués par de la carboxyfluorescéine (CF) et l'internalisation dans les cellules CCRF-CEM est quantifiée par FACS. (Source : Réf. ¹¹³)

Au même moment, l'équipe de M. Cristina Cardoso s'intéressait également à l'impact de la cyclisation du squelette de CPP.¹¹⁴ Afin de ne s'intéresser qu'à la fraction de CPP internalisé par translocation directe, les auteurs ont choisi d'analyser uniquement les espèces ayant pu atteindre le noyau. Ils ont ainsi montré que Tat cyclique avait la même efficacité de translocation que son homologue linéaire mais que son entrée dans les cellules était plus rapide. Afin d'expliquer ce phénomène, les auteurs ont analysé la dynamique conformationnelle des résidus arginine. Bien que le peptide cyclique ait une structure plus compacte, les groupes guanidinium des Arg sont plus éloignés que dans la version linéaire. Il avait été montré par D. Seebach avec l'utilisation de β -peptides⁹⁵ ou encore par J. Rothbard en introduisant une Gly entre les résidus Arg,¹¹⁵ que l'efficacité d'entrée était augmentée lorsque les groupes guanidinium étaient éloignés. L'étude du groupe de C. Cardoso suggère aussi un effet sur la cinétique d'entrée. Par simple cyclisation, il serait donc possible d'augmenter la distance entre les groupements guanidinium sans avoir à introduire de mutations dans la séquence. Dans le cas de R₁₀, l'effet de la cyclisation est plus prononcé que pour Tat. Le groupe de C. Cardoso attribue l'augmentation de l'efficacité de translocation lors de la cyclisation à une présentation plus rigide des chaînes latérales des arginines. Cela conduirait à une accumulation plus dense et plus rapide du peptide au niveau de la

membrane plasmique ce qui augmenterait la vitesse de translocation. Toutefois il nous semble important de signaler que dans cette étude les peptides linéaires sont constitués uniquement d'acides aminés de configuration D alors que les analogues cycliques sont constitués d'une alternance de résidus L et D, il est donc difficile d'évaluer l'effet dû à la seule cyclisation.

Trois années plus tard, en 2014, K. Parang et son groupe ont publié l'évaluation d'une nouvelle classe de vecteurs amphiphiles contenant deux domaines cycliques composés respectivement de tryptophanes et d'arginines.¹¹⁶ Deux peptides bi-cycliques [W₅]-triazole-[R₅] et [W₅]-(β -Ala)-[R₅] ont été synthétisés afin de déterminer l'effet de la flexibilité de l'espaceur entre les deux motifs cycliques. Les auteurs ont aussi synthétisé comme référence, l'analogue linéaire W₅-triazole-R₅ et le conjugué hybride [W₅]-triazole-R₅ (Figure 41).

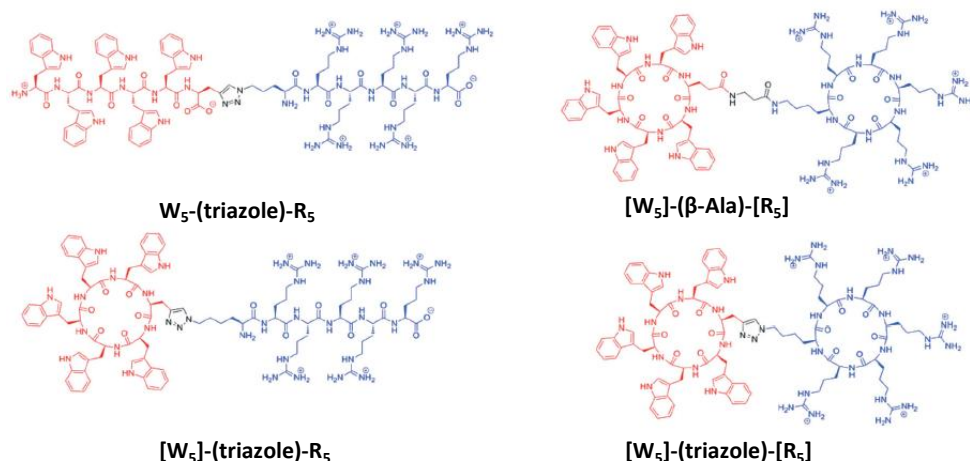


Figure 41 – Structures chimiques des peptides amphiphiles linéaires, monocycliques et bi-cycliques proposés par le groupe de K. Parang. En rouge est représenté le domaine hydrophobe, en bleu la région cationique (Source : Réf.¹¹⁶)

Le composé [W₅]-(β -Ala)-[R₅] est le plus efficace et améliore l'internalisation dans des cellules SK-OV-3 du phosphopeptide Gp-YEEI (substrat de la kinase Src) marqué par de la fluorescéine, d'un facteur 19,3 (et d'un facteur 7,6 pour [W₅]-triazole-[R₅]). La nature du bras espaceur a donc un impact important. Par ailleurs, il apparaît que la cyclisation du domaine hydrophobe est bénéfique, alors que celle du domaine cationique semble sans

effet sur les efficacités d'entrée. Afin d'étudier au mieux le mécanisme d'entrée, une version $[W_5]-(\beta\text{-Ala})-[R_5]$ marquée par la fluorescéine a été synthétisée. L'analyse de l'internalisation dans les mêmes cellules, par microscopie confocale, a montré que le peptide bi-cyclique est localisé dans le cytosol et dans le noyau. Les auteurs ont par la suite comparé son efficacité d'entrée par rapport au CPP cyclique $[W_5R_5]$ décrit précédemment.¹¹³ Les études par FACS indiquent que la version bi-cyclique s'internalise 3 fois mieux que la version monocyclique. Cependant, à 4°C, la pénétration du peptide bi-cyclique est diminuée de manière significative, suggérant ainsi que son entrée est très majoritairement dépendante de l'endocytose, contrairement à $[W_5R_5]$. L'utilisation d'inhibiteurs d'endocytose (**Figure 42**) montre que $[W_5]-(\beta\text{-Ala})-[R_5]$ s'internalise essentiellement en empruntant les voies dépendantes des cavéolines (inhibées par la nystatine) et des clathrines (inhibées par la chlorpromazine).

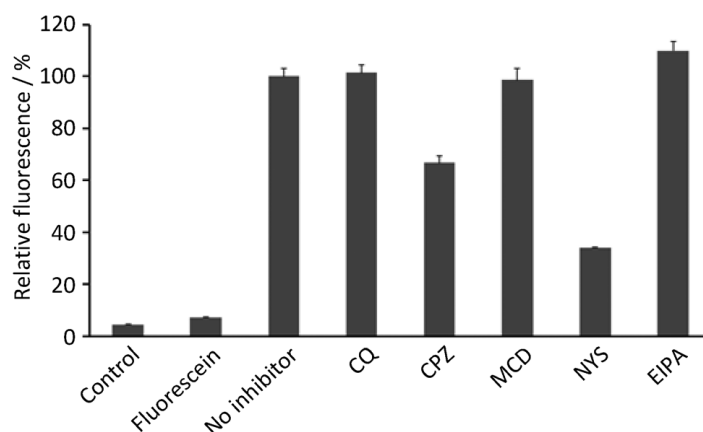


Figure 42 – Quantification par cytométrie en flux de l'internalisation de $[W_5]-(\beta\text{-Ala})-[R_5]$ couplé à la fluorescéine dans des cellules SK-OV-3 en présence d'inhibiteurs de l'endocytose : CQ chloroquine ; CPZ chlorpromazine ; MCD methyl β -cyclodextrin ; NYS nystatine ; EIPA 5-(N-éthyl-N-isopropyl) amiloride (Source : Réf.¹¹⁶)

Pour finir, les auteurs ont comparé la capacité de délivrance intracellulaire du phosphopeptide Gp-YEEI par $[W_5]-(\beta\text{-Ala})-[R_5]$ et des CPP classiques comme les peptides Tat et Arg₇, la cargaison étant associée non covalamment au CPP. La vectorisation par $[W_5]-(\beta\text{-Ala})-[R_5]$ est 4,5 et 3 fois plus élevée par rapport à Tat et (Arg)₇, respectivement. Il faut cependant garder à l'esprit que la stabilité des complexes CPP/cargaison peut varier selon le CPP utilisé, les quantités de cargaison transportées dans la cellule ne dépendent donc pas uniquement des efficacités d'internalisation des différents vecteurs.

Dans la continuité de leurs travaux, Parang et son équipe ont étudié l'effet de l'acylation de CPP cycliques par des chaînes aliphatiques de longueurs variables.¹¹⁷ Ils ont conçu une série de peptides penta- ou hexa-arginine cycliques (R_5 et R_6) fonctionnalisés soit par l'acide caprylique (C8), soit par l'acide laurique (C12), ou bien par l'acide palmitique (C16) (**Figure 43**). Le CPP cyclique C16- $[R_5]$ est le plus efficace et la voie principale d'internalisation est l'endocytose.

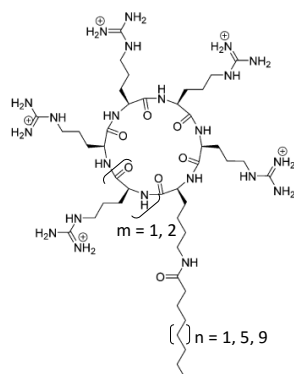


Figure 43 – Structures chimiques des peptides amphiphiles cycliques synthétisés pour l'étude. $n = 1$ acide caprylique C8, $n = 5$ acide laurique C12, $n = 9$ acide palmitique C16. (Source : Réf. ¹¹⁷)

Au même moment, D. Pei et son groupe s'intéressaient également à l'introduction de motifs hydrophobes au sein de séquences riches en Arg et marquées par la fluorescéine.¹¹⁸ Les auteurs ont d'abord montré que le peptide linéaire R_6 est très peu internalisé dans les cellules par rapport au CPP R_9 , en accord avec les données précédentes de la littérature. De façon intéressante, le remplacement des deux résidus Arg N -terminaux de R_6 par deux résidus Phe (peptide F_2R_4) restaure partiellement l'efficacité d'entrée. La cyclisation de F_2R_4 permet un gain supplémentaire d'efficacité, F_2R_4 cyclique pénétrant deux fois plus dans les cellules que le CPP linéaire R_9 . Afin d'apporter plus d'hydrophobie à la structure, les auteurs ont remplacé un des résidus Phe de la séquence par le motif 2-naphthylalanine (notée Φ) pour donner le peptide $F\Phi R_4$. Les études par FACS sur cellules MCF-7 après digestion trypsique du peptide membranaire, révèlent que le CPP cyclique $[F\Phi R_4]$ est 13 fois plus efficace que le peptide R_9 . Par la suite, sa capacité de délivrance intracellulaire a largement été étudiée, en le conjuguant à une grande variété de cargaisons telles que de petites molécules fluorescentes, des séquences peptidiques linéaires ou cycliques ou bien même des protéines.¹¹⁹ De la même manière que les peptides cycliques fonctionnalisés par des

chaînes aliphatiques proposés par K. Parang (ex. C16-[R₅]), le CPP [FΦR₄] s'internalise exclusivement par endocytose (à 4°C, le peptide ne pénètre pas).

II – JUSTIFICATION DU DESIGN ET DE L'APPROCHE SYNTHETIQUE

II. Justification du design et de l'approche synthétique.

1. Objectifs

Ce projet de thèse a été motivé par le développement de nouveaux peptides vecteurs ayant une capacité accrue à délivrer une substance bioactive au sein des cellules. Les CPP sont des outils prometteurs pour le transport intracellulaire de telles substances aussi bien pour des utilisations en recherche fondamentale que pour des applications médicales. Depuis leur découverte, de très nombreuses applications des CPP ont été présentées dans la littérature. L'utilisation des CPP a permis dans de nombreux cas l'observation de l'activité biologique de l'espèce transportée et des traitements reposant sur l'utilisation de CPP comme vecteurs font l'objet d'essais cliniques.¹ Cependant, on constate également dans de nombreux cas une efficacité de vectorisation limitée, principalement liée au fait que la majorité des composés internalisés dans la cellule restent piégés dans les endosomes. Il est donc important de s'intéresser à l'optimisation des CPP. Augmenter l'efficacité de délivrance dans les bons compartiments de la cellule, permettrait dans le cadre d'une utilisation thérapeutique, la diminution de la dose administrée de médicament, et ainsi une réduction des coûts de production.

Parmi les nombreux CPP décrits dans la littérature, les peptides riches en arginine ont fait l'objet d'une attention particulière. Nous avons vu que la présence de groupements guanidinium dans les séquences joue un rôle essentiel pour améliorer la capacité du peptide à traverser la membrane de la cellule. Diverses recherches structurales ont été effectuées pour déterminer le nombre minimal de résidus arginine requis pour une entrée cellulaire efficace. D'autre part, nous avons vu dans le chapitre I, que certaines modifications chimiques au niveau du squelette peptidique conduisant à une distribution spatiale différente des groupes fonctionnels du CPP, ou encore l'introduction de chaînes lipidiques, favorisent la vectorisation au niveau de compartiments intracellulaires cibles. En outre, les CPP composés d'acides aminés de configuration naturelle ne sont pas stables dans le sérum et ont donc une application limitée pour les études *in vivo*. L'introduction de résidus de configuration D améliore la stabilité du peptide mais conduit à un coût de production plus élevé. Les peptides cycliques représentent une alternative. La cyclisation confère une

meilleure stabilité protéolytique. Elle peut également permettre de modifier l'arrangement spatial des groupes fonctionnels des peptides ou de stabiliser leur structure secondaire. La cyclisation est ainsi mise à profit depuis un certain nombre d'années pour augmenter l'affinité de ligands peptidiques pour des récepteurs.¹²⁰ Beaucoup plus récemment, la cyclisation a également été appliquée aux CPP.

Mon travail de thèse a porté sur la conception de nouveaux peptides vecteurs cycliques contenant une séquence cationique minimale et pouvant être acylés par une chaîne lipidique. L'objectif était d'étudier l'impact de la cyclisation du squelette des CPP et de leur fonctionnalisation sur leur efficacité et leur mécanisme d'entrée. Afin d'évaluer la capacité de délivrance de nos CPP, nous avons choisi de les conjuguer *via* un pont disulfure à un peptide bioactif et de doser la quantité de cargaison transportée dans les cellules par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Nous avons tiré profit du résidu cystéine, introduit dans la séquence des CPP afin de le conjuguer au peptide bioactif, dans notre stratégie de cyclisation tête - queue du peptide utilisant la ligation chimique native.

2. Structures des conjugués

2.1 Incorporation de chaînes aliphatiques et cyclisation

Plusieurs travaux ont été réalisés pour augmenter la vectorisation cellulaire des polyarginines. Il a été montré que leur acylation par des acides gras peut faciliter l'internalisation.^{94,121,122} Cependant, les polyArg acylés qui contiennent de 7 à 15 résidus arginine peuvent potentiellement induire une toxicité. En effet, Lee *et al.* ont étudié une série de lipopeptides dont la composition varie en nombre de résidus Arg et en taille de la chaîne hydrocarbonée.¹²² Les résultats indiquent qu'un lipopeptide composé de 13 résidus Arg ou plus et / ou fonctionnalisé par une chaîne palmitique (C16), diminue la viabilité cellulaire. Dans une étude réalisée précédemment dans le laboratoire, B. Aussedat *et al.* ont étudié l'influence de la diversité structurale sur l'efficacité de pénétration. Une distribution globulaire des groupes guanidinium obtenue par l'utilisation de structures dendrimériques n'améliorait pas l'efficacité d'internalisation par rapport au CPP R₉. En revanche, la

fonctionnalisation des CPP linéaires ou dendrimériques par une ou trois chaînes myristyl augmentait significativement la pénétration cellulaire.¹⁰⁷ Quelque temps après au sein de la même équipe, dans l'objectif de réduire la taille des vecteurs afin de simplifier leur accès synthétique mais aussi d'identifier la structure minimale permettant une entrée efficace, S. Bode *et al.* ont développé une série de peptides amphiphiles comportant un domaine cationique réduit à 4 arginines et un domaine lipophile composé de chaînes de tailles variables (4 à 18 atomes de carbone) ou de pyrène (**Figure 44**).¹¹² Afin d'éviter tout problème de solubilité, le nombre d'arginine n'a pas été réduit en dessous de 4. Les lipopeptides ont été conjugués *via* pont disulfure au peptide PKCi, inhibiteur de protéine kinase C. La quantité de peptide internalisé a été quantifiée par spectrométrie de masse (SM) MALDI-TOF.

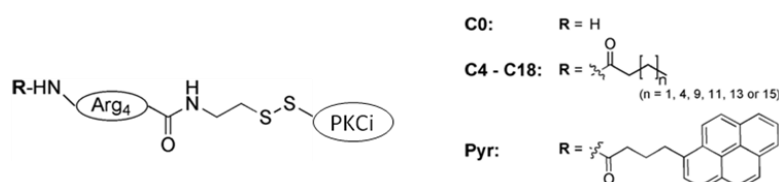


Figure 44 – Structure chimique des peptides amphiphiles conjugués au PKCi synthétisés pour l'étude. $n = 1$ acide butyrique C4, $n = 4$ acide énanthique C7, $n = 9$ acide laurique C12, $n = 11$ acide myristique C14, $n = 13$ acide palmitique C16, $n = 15$ acide stéarique C18, Pyr = Pyrène (Source : Réf.¹¹²)

Les conjugués ont d'abord été testés à 37°C sur des cellules CHO-K1. Dans ces conditions, C0-R₄, C4-R₄ et C7-R₄ s'internalisent peu, contrairement aux peptides fonctionnalisés avec une chaîne carbonée plus longue (C12 à C18) ou avec du pyrène (**Figure 45**).

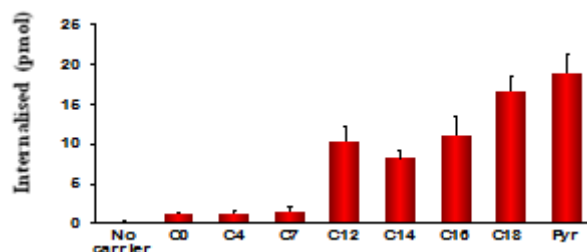


Figure 45 – Effet de la longueur de la chaîne lipidique sur l'efficacité de vectorisation. La quantité du peptide PKCi transporté à 37°C dans des cellules CHO-K1 a été mesurée par SM-MALDI-TOF (Source : Réf.¹¹²)

Pour étudier le mécanisme d'entrée des conjugués C0-R₄, C7-R₄, C12-R₄ et Pyr-R₄, l'internalisation a été réalisée à 4 °C, température à laquelle l'endocytose est inhibée. La pénétration des vecteurs est alors diminuée de manière significative, montrant que le mécanisme d'entrée de ces composés dans la cellule est très majoritairement dépendant de l'endocytose (**Figure 46**). Seul le peptide C12-R₄ semble s'internaliser à la fois par endocytose et par translocation directe.

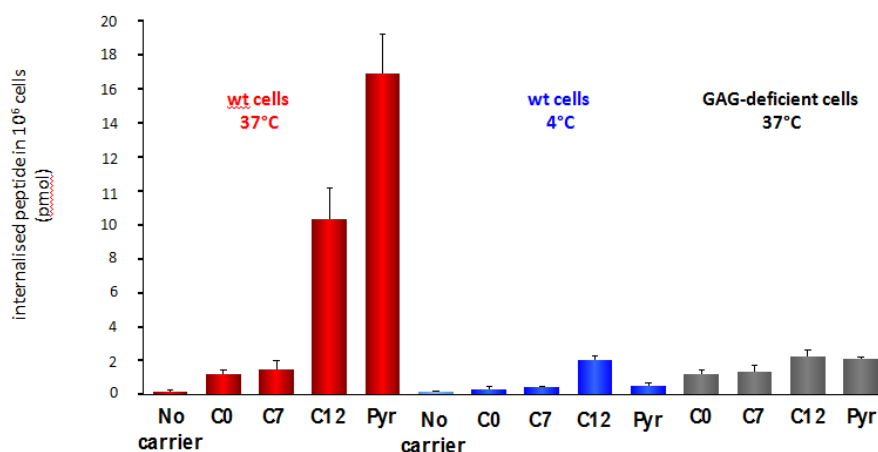


Figure 46 – Etude du mécanisme d'entrée. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur des cellules CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur des CHO-K1. En gris, est représentée la quantité de peptide internalisé sur des cellules CHO-745 déficientes en GAG. La quantité de peptide PKCi internalisé a été mesurée par SM MALDI-TOF. (Source : Réf.¹¹²)

Pour évaluer la participation des GAG de surface dans le mécanisme d'entrée de ces conjugués, la vectorisation a été réalisée à 37°C dans des cellules mutantes, CHO-pgsA745, déficientes en héparanes et chondroïtines sulfate. Les données d'internalisation montrent une forte baisse de l'entrée des vecteurs C12-R₄ et Pyr-R₄ par rapport aux résultats obtenus sur les cellules sauvages CHO-K1. En revanche aucun effet n'a été observé pour les peptides C0-R₄ et C7-R₄. Ces résultats indiquent que seuls les vecteurs ayant un domaine hydrophobe assez étendu (C12 et Pyr) sont capables de recruter efficacement les GAG de surface pour pénétrer dans les cellules. Ce résultat était inattendu car l'interaction avec les GAG sulfatés devrait essentiellement impliquer le domaine cationique des conjugués (*via* des interactions électrostatiques). Or, celui-ci est identique pour tous les conjugués. Afin d'expliquer le rôle de la chaîne lipidique dans le recrutement des GAG, des études de DLS (Dynamic Light

Scattering) ont été entreprises. Les résultats montrent une auto-association des conjugués comportant une longue chaîne lipidique (C12 à C18) ou fonctionnalisé par le pyrène (**Figure 47**). En revanche, les conjugués C0 à C7 ne s'auto-associent pas. L'auto-assemblage des lipopeptides induit vraisemblablement la formation d'agrégats ayant une forte densité de résidus cationiques à leur surface. Cette étude a donc permis de mettre en évidence qu'un regroupement (« clustering ») des résidus basiques de ces CPP était nécessaire pour le recrutement efficace des GAG, stimulant ainsi une voie d'entrée par endocytose. C12-R₄ est aussi internalisé par translocation directe, contrairement aux dérivés C0, C7 et Pyr. Ceci suggère que l'entrée par translocation directe implique une forme non agrégée de C12-R₄ et que la chaîne C12 intervient directement dans l'interaction avec la bicouche lipidique.

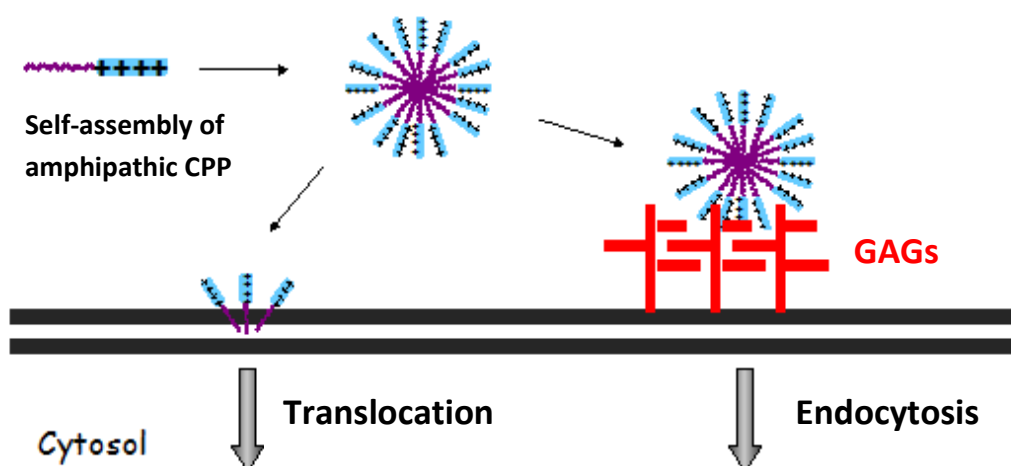


Figure 47 – Mécanisme d'entrée des lipopeptides Cn-R₄. L'auto-assemblage permet une interaction efficace avec les GAG de surface et l'entrée par endocytose. C12-R₄ est aussi capable de pénétrer dans les cellules par translocation directe, vraisemblablement sous forme monomérique. (Source : Réf.¹¹²)

Cette étude a permis de montrer qu'un CPP constitué d'un petit domaine cationique de 4 arginines fonctionnalisé par une chaîne lauryl permet la délivrance intracellulaire efficace de séquences peptidiques. De façon intéressante, elle a également mis en évidence que selon la distribution spatiale des groupements cationiques et lipophiles du CPP (CPP

libre vs auto-associé), il est possible de favoriser l'interaction avec certains composants de la membrane plasmique et d'influencer ainsi le mécanisme d'entrée.

Le but de mon travail de recherche était de combiner la fonctionnalisation des CPP par des groupements lipophiles à la cyclisation tête-queue du squelette peptidique qui constitue un moyen de contraindre la structure des peptides et de modifier l'arrangement spatial de leurs groupes fonctionnels. Nous avons voulu évaluer l'impact de la cyclisation à la fois sur des peptides contenant un nombre minimal de résidus Arg et sur des séquences classiques de CPP. J'ai donc constitué une petite librairie de CPP dont j'ai étudié l'efficacité mais aussi le mécanisme d'entrée.

Nous souhaitons mettre en évidence la capacité de ces CPP à transporter des peptides bioactifs dans la cellule. Nous avons donc également dû faire un choix sur le type de lien introduit entre le peptide cargaison et le peptide vecteur.

2.2 Nature du lien entre le CPP et l'espèce transportée

Différentes stratégies sont utilisées dans la littérature pour lier l'espèce transportée au CPP correspondant à la formation de conjugués covalents ou de complexes non covalents.

Complexes non covalents :

La formation de complexes non covalents *via* des interactions électrostatiques et/ou hydrophobes entre les deux espèces a été initialement proposée par le groupe de F. Heitz.¹²³ Les CPP étant souvent riches en résidus basiques, cette stratégie est tout à fait adaptée à la vectorisation d'oligonucléotides ou analogues conservant un caractère polyanionique. Elle a cependant également été adaptée au transport de protéines.⁹ Il est à noter que dans les deux cas, un réel travail de conception des CPP a dû être réalisé pour permettre la formation de complexes stables dans le milieu extracellulaire mais capables de se dissocier une fois internalisés afin de libérer la substance active. Cette stratégie est de plus en plus utilisée du fait de sa facilité de mise en œuvre une fois la séquence du CPP optimisée. En effet, le CPP et

la cargaison sont simplement mélangés pour former le complexe, aucune fonctionnalisation de ces deux espèces n'est requise. Un excès molaire de CPP par rapport à la cargaison est cependant généralement nécessaire.

Malgré ces avantages, cette stratégie ne nous est pas semblée adaptée à l'étude que nous voulions réaliser visant à identifier l'effet direct de modifications de la structure des CPP sur leur capacité à pénétrer dans les cellules par endocytose ou translocation directe. En effet, des paramètres tels que la stœchiométrie réelle des deux espèces (CPP/cargaison) au sein des complexes et la stabilité des complexes sont difficilement contrôlables et peuvent varier avec la structure du CPP. Ceci aurait donc compliqué l'interprétation mécanistique de nos résultats.

Liaisons covalentes :

Différents type de liaisons covalentes ont été introduites entre les CPP et leur cargaison correspondant à des liens stables (amide, thioether, triazole...) ou réversibles. Le pont disulfure est très utilisé en vectorisation car il est considéré comme stable dans le milieu extracellulaire oxydant alors qu'il peut être réduit dans certains compartiments de la cellule, en particulier le cytosol.¹²⁴ La réduction permet alors la libération du composé bioactif. Ceci devrait, en principe, réduire le risque de perturbation par le CPP de l'activité biologique de l'espèce transportée. Nous avons opté dans ce projet de recherche pour le pont disulfure qui avait d'ailleurs déjà été très employé dans le laboratoire dans les travaux sur les CPP. Celui-ci présente en outre l'avantage d'être facile à introduire entre deux peptides.

3. Choix de l'approche synthétique utilisée

3.1 Méthodes de synthèses des CPP cycliques utilisées dans la littérature

Nous avons vu au chapitre précédent, que l'utilisation de CPP cycliques pour la délivrance de molécules bioactives était encore peu explorée. Les publications présentées détaillent peu l'aspect synthétique. Deux stratégies ont été employées. Pour la synthèse de leurs CPP cycliques, Pei *et al.*, ont introduit un acide glutamique en position C-terminale des

peptides, le résidu Glu étant couplé à la résine *via* sa chaîne latérale.¹¹⁹ La cyclisation a été effectuée sur support solide après déprotection sélective des extrémités *N* et *C*-terminales des peptides et activation de la fonction acide. En revanche, Parang et son groupe ont préféré cycliser les peptides protégés en solution.¹¹⁷ L'utilisation de la résine chlorotrityle permet de cliver le peptide de son support sans toucher à l'intégrité des groupements protecteurs des chaînes latérales. Après activation de l'extrémité *C*-terminale et couplage avec l'amine *N*-terminale, les chaînes latérales sont déprotégées en solution.

3.2 Synthèse des peptides cycliques par ligation chimique native (Native Chemical Ligation *NCL*)

Afin de permettre la conjugaison *via* pont disulfure de nos CPP au peptide bioactif, un résidu Cys est introduit dans la séquence de chacune des deux espèces. Nous avons tiré avantage du résidu Cys présent sur le CPP, dans notre stratégie de cyclisation. Ainsi nous avons décidé d'avoir recours à la ligation chimique native, réaction dans laquelle, le résidu Cys joue un rôle central.

3.2.1 La ligation chimique native

La ligation chimique native est une réaction chimiosélective, initialement proposée par le groupe de S. Kent pour la synthèse de protéines. Elle permet par exemple l'incorporation de résidus non naturels, sondes ou modifications post-traductionnelles en positions choisies de la protéine cible.

Il est généralement mentionné dans la littérature que les techniques de synthèse peptidique supportée permettent de synthétiser des peptides de 50 aminoacides de long, bien que cela reste très dépendant de la séquence du peptide. Des polypeptides de taille plus grande sont difficilement accessibles, essentiellement à cause de rendements de couplage non quantitatifs provenant de l'agrégation de la chaîne peptidique en cours d'élongation ou de réactions secondaires lors des étapes de déprotection. L'accumulation de sous-produits empêche alors souvent la purification du produit désiré. De ce fait, une

stratégie basée sur le couplage sur support solide de fragments protégés comportant de 10 à 20 résidus a été proposée pour la synthèse de protéines.¹²⁵ Toutefois son application est limitée du fait de la faible solubilité des fragments protégés, de leur purification et caractérisation difficile et du risque d'épimérisation du résidu C-terminal lors de l'activation avant couplage. Pour finir, l'étape de déprotection finale après assemblage de la protéine peut introduire des artefacts. S.B Kent et P. E Dawson ont relevé, en 1994, le défi de la synthèse chimique de protéines en introduisant la ligation chimique native (native chemical ligation, NCL).¹²⁶ Cette découverte a joué un rôle crucial dans l'avancement de la chimie des protéines. La NCL repose sur une réaction chimiosélective qui permet le couplage en solution de deux fragments peptidiques totalement déprotégés *via* la formation d'une liaison peptidique naturelle (le squelette peptidique reste donc inchangé). La ligation se produit seulement entre une cystéine placée en extrémité C-terminale d'un premier fragment peptidique et la fonction thioester introduite en position N-terminale du second fragment (**Figure 48**). La NCL est régiosélective : la présence de résidus cystéine « internes » au niveau des deux fragments ne gêne pas la ligation.¹²⁷ Une caractéristique importante de la ligation chimique native est l'absence de racémisation au niveau du site de ligation.¹²⁸ La réaction de ligation s'effectue en milieu aqueux à pH proche de la neutralité (pH 6,5 – 7,5), en présence d'agents réducteurs, conditions qui respectent totalement l'intégrité des fragments peptidiques de départ et de la protéine finale. L'ajout d'agents dénaturants comme le chlorhydrate de guanidine permet d'augmenter la solubilité des peptides et d'effectuer la réaction à concentration plus élevée (de l'ordre de 1 mM pour les fragments de grande taille).

La ligation chimique native se déroule en deux étapes. Après attaque nucléophile du groupement thiol de la cystéine sur le thioester, suit un réarrangement intramoléculaire spontané correspondant à un transfert d'acyle du soufre vers l'azote (S→N) (*via* un intermédiaire cyclique à cinq chaînons favorable). Cette étape conduit à la formation d'une liaison peptidique entre les deux fragments peptidiques.

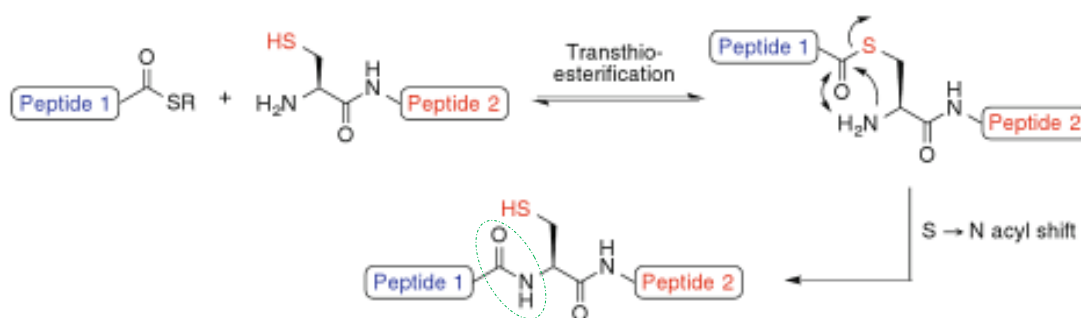


Figure 48 – Mécanisme de la ligation chimique native.

Dans leur étude effectuée en 1994, P.E Dawson *et al.* ont appliqué cette stratégie avec succès à la synthèse de l'interleukine-8 humaine (IL-8), un polypeptide contenant 72 acides aminés dont 4 cystéines. La ligation a été réalisée dans un tampon aqueux à pH 7,6 (contenant 6M de guanidine) entre un premier fragment peptidique de 33 acides aminés portant un benzyle thioester en position C-terminale et un second fragment de 39 résidus contenant une cystéine en extrémité N-terminale (**Figure 49**). Ceci a permis d'obtenir, après repliement de la protéine et formation des deux ponts disulfures, une protéine en tous points identique à la protéine naturelle.

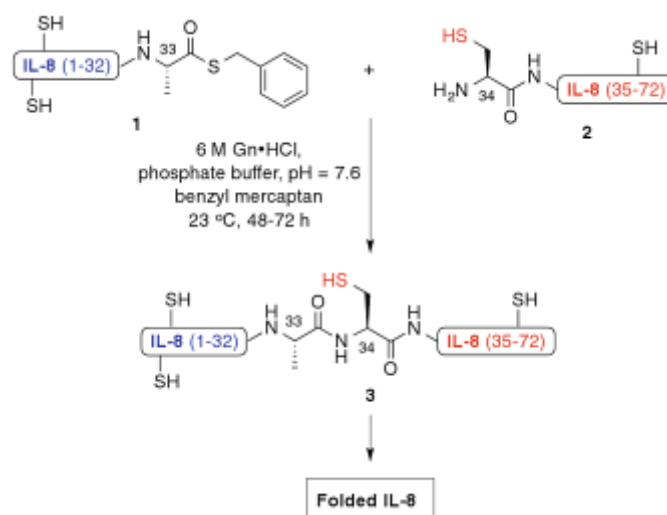


Figure 49 – Synthèse de l'interleukine-8 par ligation native.

La nature de l'acide aminé situé à l'extrémité C-terminale du fragment thioester (position Xaa, **Figure 50**) affecte de manière significative la cinétique et parfois aussi le

rendement de la réaction. Dawson et ses collaborateurs ont synthétisé une librairie de fragments peptidiques contenant chacun des 20 aminoacides protéinogènes en cette position (**Figure 50**) et ont étudié la cinétique de ligation par suivi HPLC.¹²⁹

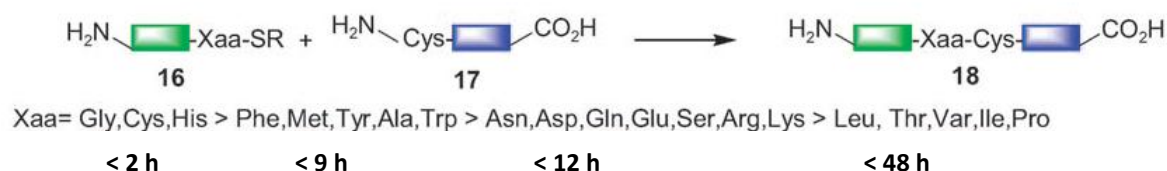


Figure 50 – Influence de la nature de l'acide aminé présent en position C-terminale du fragment thioester sur la cinétique de ligation.

La ligation la plus rapide est observée pour le peptide Gly-thioester qui réagit quantitativement en moins de quatre heures. La réaction est plus lente lorsque l'encombrement de la chaîne latérale du résidu Xaa augmente mais reste quantitative sauf pour les fragments contenant en cette position des acides aminés β -ramifiés ou une proline qui ne conduisent pas à une conversion totale même au-delà de 48h. Cependant, le rendement et / ou la cinétique de ligation, peuvent être améliorés par l'ajout de certains thiols dans le mélange réactionnel. En effet la nature du thioester a un impact énorme sur la réaction de NCL. Les peptides alkyle thioester sont généralement moins réactifs que les dérivés aryle thioester. Néanmoins ils sont plus faciles à préparer, stocker et manipuler du fait de leur meilleure stabilité. Les peptides thioester sont donc généralement synthétisés sous forme de leurs dérivés alkyles (par exemple avec l'utilisation de l'acide 3-mercaptopropionique), et sont convertis en dérivés aryle thioester, *in situ*, par l'addition d'un excès d'aryle thiol (tel que le thiophénol initialement utilisé par le groupe de S. Kent). Johnson *et al.* ont examiné l'impact sur la réaction de ligation d'une série de quatorze thiols choisis sur la base de leur pKa. Ils ont constaté que les aryle thiols sont de meilleurs additifs, en particulier le MPAA (4-mercaptophenylacetic acid, **Figure 51**), un thiol soluble dans l'eau qui possède l'avantage non négligeable de ne pas avoir une forte odeur offensive.¹³⁰ L'utilisation de peptides thioester plus réactifs, comportant un meilleur groupement partant, facilite donc la réaction de ligation en augmentant sa cinétique. Il est à noter que lors de

ligations lentes (non terminées en plus de 24 h), on observe fréquemment la réaction secondaire d'hydrolyse du thioester.

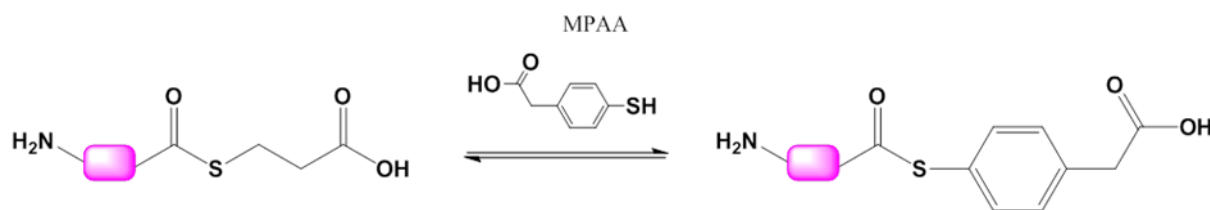


Figure 51 – *Echange de thioester avec un aryle thiol. MPAA = acide 4-mercapto phénylacétique.*

La ligation chimique native a permis depuis sa découverte par le groupe de S. Kent la synthèse d'un grand nombre de protéines dans différents laboratoires. C'est une méthode générale donnant de bons rendements. Les fragments étant déprotégés, ils sont facilement purifiés et caractérisés avant ligation (par rapport à des fragments qui seraient protégés). Après ligation, une simple étape de purification par HPLC pour éliminer les sels et additifs thiols permet d'obtenir le produit sous sa forme finale désirée. Aucun traitement chimique supplémentaire n'est requis risquant de conduire à des réactions secondaires. C'est pour ces raisons que nous avons choisi cette stratégie pour la synthèse de nos composés cibles : des CPP cyclisés au niveau de leur squelette *via* une liaison peptidique. La cystéine *N*-terminale et la fonction thioester *C*-terminale sont pour cette application introduites sur le même fragment peptide. Il est à noter que la ligation chimique native avait déjà été utilisée précédemment avec succès pour la synthèse de peptides cycliques, en particulier par le groupe de J. P.Tam.¹³¹

3.2.2 Stratégies existantes pour générer le peptide thioester sur support solide

Les peptides thioester sont facilement préparés et avec de bons rendements par synthèse peptidique en phase solide (SPPS) en stratégie Boc (*tert*-butoxycarbonyl) par

introduction d'un lien thioester entre le peptide et la résine.¹²⁹ En fin d'élongation, le clivage du peptide de la résine et sa déprotection sont effectués dans les conditions standard de la chimie peptidique Boc, par traitement au HF. Un équipement spécialisé est requis pour le traitement par le HF en raison de sa forte toxicité et de sa nature corrosive. Du fait de la dangerosité du HF, et parce que son utilisation n'est pas compatible avec la synthèse de fragments peptidiques comportant certaines modifications (en particulier certaines modifications post-traductionnelles), de nombreuses recherches portent actuellement sur le développement de méthodes de synthèse de peptides thioester en stratégie Fmoc (9-fluorénylméthoxycarbonyle).¹³² Il est à noter que l'utilisation d'un lien thioester entre le peptide et la résine n'est pas envisageable en stratégie Fmoc car ce lien est sensible au traitement par la pipéridine utilisé pour éliminer le groupement protecteur Fmoc.

Le laboratoire des Biomolécules est équipé pour l'utilisation du HF et la synthèse de nos CPP cibles est totalement compatible avec l'utilisation de ce réactif. Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai principalement utilisé la stratégie Boc pour synthétiser les peptides thioester qui ont ensuite été cyclisés par NCL. Cependant, pour pouvoir proposer une stratégie synthétique plus générale, je me suis également intéressé à la synthèse de peptides thioester en stratégie Fmoc.

Diverses approches ont été proposées dans la littérature pour contourner le problème d'instabilité du lien thioester vis-à-vis des conditions standard de la Fmoc-SPPS. Elles reposent principalement sur des stratégies qui permettent de transformer une liaison stable vis-à-vis des conditions utilisées en chimie Fmoc en une fonction thioester, correspondant soit à l'utilisation d'un lien « safety-catch » soit à la mise en jeu d'un réarrangement intramoléculaire par transfert d'acyle O→S ou N→S. Quelques exemples significatifs sont présentés ci-dessous.

Le groupe de A. Pessi a été le premier à proposer l'utilisation d'un lien 'safety-catch' (ou cran de sécurité) en exploitant le lien sulfamylbutyryl développé dans les années 70 par G. W. Kenner et R. Sheppard (**Figure 52**).^{133,134} Ce lien, stable vis-à-vis de la pipéridine, peut être activé par alkylation en fin d'élongation du peptide, devenant alors sensible à l'attaque par un nucléophile. Le dernier aminoacide couplé doit être protégé par un groupement Boc

avant alkylation. Ainsi, le traitement du peptide-résine par du sodium thiophénolate conduit au peptide thioester protégé. Les chaînes latérales sont ensuite déprotégées en solution. Cette méthode a permis la synthèse de nombreuses protéines cibles, y compris des protéines avec modifications post-traductionnelles. Il faut cependant signaler que l'étape de thiolyse sur support solide est peu efficace du fait de la faible solvation du peptide-résine. Cependant, il a récemment été montré que cette étape de thiolyse sur support solide n'est pas nécessaire et que les peptides *N*-méthylsulfonamide déprotégés, faciles d'accès, peuvent être utilisés directement dans la réaction de ligation chimique native. L'espèce thioester est formée *in situ* en présence du thiol MPAA.¹³⁵

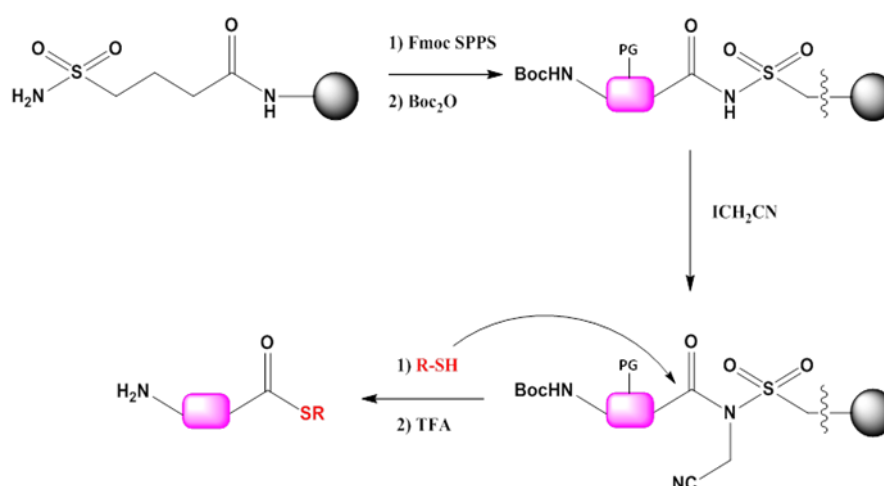


Figure 52 – Utilisation du lien sulfamylbutyryl pour générer un peptide thioester en stratégie Fmoc proposée par l'équipe de A. Pessi. PG = protection des chaînes latérales. (Source : d'après Réf. ¹³⁴)

Une autre approche a été décrite par J. B. Blanco-Canosa et P. E. Dawson et utilise le lien safety-catch 3,4-diaminobenzyle. Après assemblage du peptide, un traitement par le 4-nitrophénylchloroformiate induit, après réarrangement, la formation de *N*-acylbenzimidazolone (Nbz).¹³⁶ Le peptide-Nbz peut être clivé de la résine en condition acide (100 % TFA) sans toucher à l'intégrité de la fonction Nbz. En conditions douces, dans un tampon aqueux neutre, l'addition de thiol permet la thiolyse du peptide *N*-acyluré. Le thioester peut aussi être généré *in situ* dans les conditions de ligation chimique native (**Figure 53**).

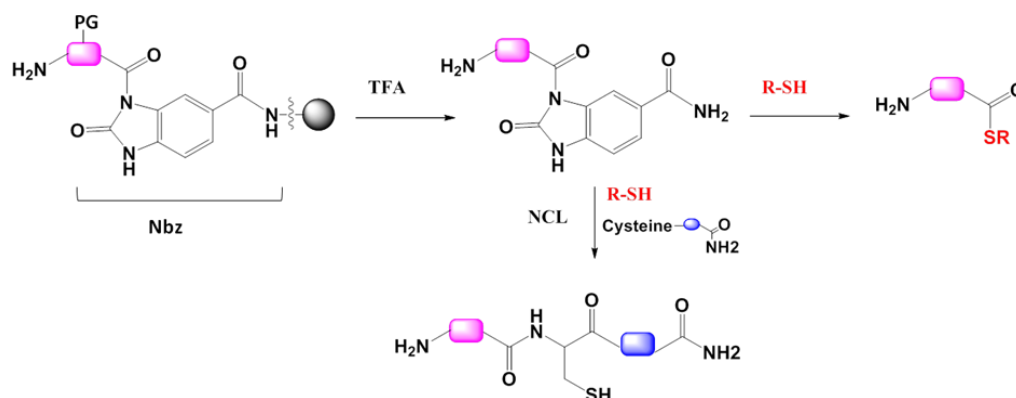


Figure 53 – Synthèse du peptide thioester grâce au lien acylurée Nbz. (Source : Réf. ¹³⁶)

P. Botti et ses collaborateurs ont été les premiers à proposer une méthode reposant sur un réarrangement par transacylation. Il s'agissait dans leur cas d'un transfert d'acyle d'un oxygène sur un soufre ($O \rightarrow S$).¹³⁷ La résine est tout d'abord fonctionnalisée par une cystéine protégée sur sa chaîne latérale par un groupement S-tert-butyle (**Figure 54**). Après oxydation de l'amine α , le peptide est synthétisé en stratégie Fmoc-SPPS. Le clivage de la résine en condition acide, permet l'accès à un fragment peptidique carboxyethylester. Dans les conditions de ligation à pH neutre, l'addition de thiophénol, permet la déprotection du thiol de la cystéine et le déclenchement d'un réarrangement intramoléculaire *via* une $O \rightarrow S$ transacylation conduisant à la formation de la fonction thioester. Les auteurs ont ainsi pu synthétiser une protéine mais mentionnent que cette méthode peut conduire à une réaction secondaire d'hydrolyse.

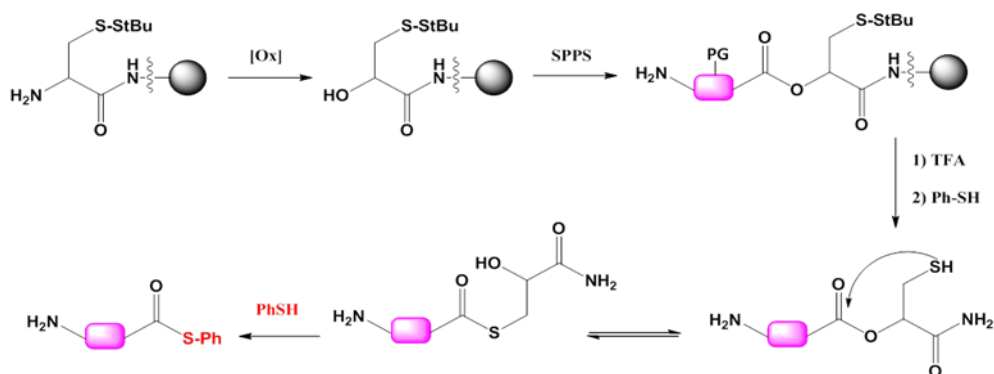


Figure 54 – Formation de peptides thioester par $O \rightarrow S$ transacylation. PG = protection des chaînes latérales.

Par la suite, d'autres groupes de recherche ont utilisé des approches basées sur le transfert d'acyle $N \rightarrow S$. Ainsi, H. Hojo et ses collaborateurs ont montré que la fonction thioester peut être générée en présence d'acide 3-mercaptopropionique (MPA) à partir de peptides contenant en leur extrémité C-terminale une *N*-alkyl cystéine (**Figure 55**).¹³⁸ Ceci implique l'attaque nucléophile du groupement thiol de la Cys sur l'amide substituée adjacente. L'amine secondaire libérée étant encombrée et moins nucléophile que le thiol, l'équilibre entre les formes amide et thioester est déplacé vers la formation du thioester. Celui-ci est ensuite piégé par réaction avec le MPA (étape irréversible). D. Macmillan et son groupe ont également montré que le chauffage (à 60°C) de peptides contenant un motif Xaa-Cys dans leur séquence (avec Xaa = Gly, His ou Cys) à pH acide et en présence de thiol, conduit à une thiolysse au niveau de ce motif.¹³⁹ Bien que la conversion en thioester ne soit pas quantitative, des peptides thioester peuvent être obtenus de cette façon à partir de peptides contenant une Cys C-terminale. Cette méthode est cependant limitée à l'accès de fragments thioester ayant une Gly, His ou Cys terminale.

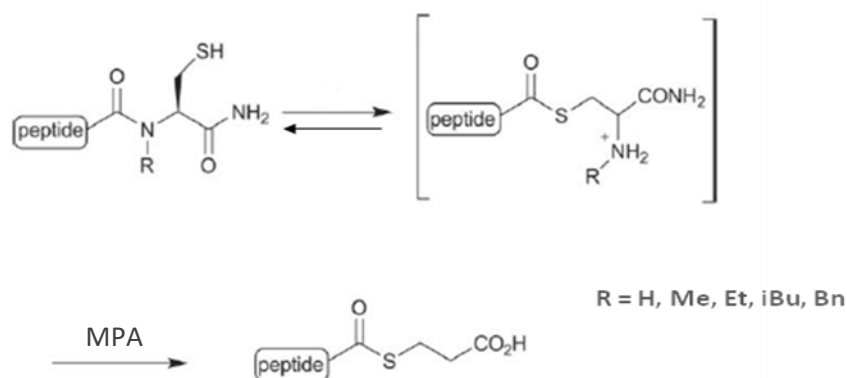


Figure 55 – Formation de la fonction thioester par transfert d'acyle $N \rightarrow S$ à partir d'un peptide porteur d'une cystéine ou *N*-alkyl cystéine C-terminale. Me = méthyle, Et = éthyle, iBu = isobutyle, Bn = benzyle, MPA = acide S-trityl-mercaptopropionique (Source : Réf.¹⁴⁰)

L'utilisation des liens bis(sulfanylethyl)amido (SEA)¹⁴¹ (**Figure 56**) et sulfanylethylanilide,¹⁴² sont également des exemples intéressants basés sur le même principe de transfert d'acyle $N \rightarrow S$ et ayant permis la synthèse de cibles protéiques difficiles.

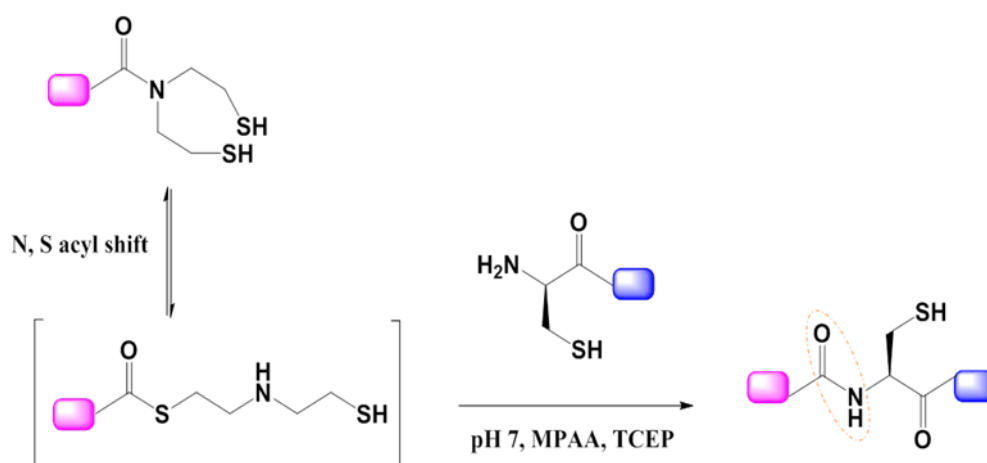


Figure 56 – Ligation chimique native entre un fragment contenant un groupement SEA en position C-terminale et un deuxième fragment peptidique contenant une cystéine en extrémité N-terminale. (Source : Réf. ¹⁴¹)

Ces deux liens, ainsi que les liens de type *N*-alkyl cystéine, sont cependant difficiles à acyler pour le couplage du premier acide aminé C-terminal. Récemment, le groupe de J. Offer en collaboration avec F. Burlina ont montré que des peptides comportant en leur extrémité C-terminale un résidu α -méthyle cystéine peuvent être utilisés directement dans la réaction de NCL, le thioester étant produit *in situ* en présence de thiol. La conversion en thioester et la ligation qui s'en suit sont totales. Le couplage de l' α -méthyle cystéine sur la résine et le couplage du résidu suivant sont réalisés dans des conditions standard et avec de bons rendements.¹⁴³ J'ai également utilisé ce type de dérivés pour la synthèse de CPP cycliques.

III – DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX PEPTIDES VECTEURS CYCLIQUES

III. Développement de nouveaux peptides vecteurs cycliques

1. Synthèses des transporteurs peptidiques

L'objectif de mon travail était d'évaluer l'impact de la cyclisation du squelette peptidique des CPP sur leur efficacité et sur leur mécanisme d'entrée dans les cellules. Je me suis intéressé à la cyclisation de CPP « classiques » (Pénétratine, R₉, Tat et R₆W₃) et ai également conçu des CPP amphiphiles constitués d'un domaine oligo-arginine cyclique de taille variable fonctionnalisé par une chaîne d'acide gras. Pour permettre la cyclisation des peptides par ligation chimique native, un résidu cystéine et une fonction thioester (ou précurseur) ont été introduits respectivement aux extrémités N et C terminales des différentes séquences de CPP. La synthèse des précurseurs linéaires, leur cyclisation et conjugaison à un peptide bioactif sont présentées ci-dessous.

1.1 Cyclisation de CPP classiques

1.1.1 Synthèse sur support solide en stratégie Boc des peptides thioester

Le greffage d'un lien thioester sur le support solide suivi de l'assemblage du peptide en stratégie Boc standard permet de facilement préparer des peptides thioester. En effet, le lien thioester est parfaitement compatible avec la chimie Boc-SPPS qui classiquement consiste en des cycles répétés comprenant i) une étape d'élimination du groupement Boc protégeant l'amine N-terminale du peptide en élongation, ii) une étape de déprotonation de l'amine et iii) une étape de couplage du résidu suivant (**Figure 57-A**). En fin de synthèse, la déprotection des chaînes latérales et le clivage de la résine se font par traitement du peptide-résine par de l'acide fluorhydrique anhydre en présence de piègeurs de carbocations. Quelques précautions sont cependant nécessaires lors de la synthèse des peptides thioester. Le lien thioester étant sensible vis-à-vis des réactifs nucléophiles, ceux-ci sont proscrits. Ainsi, pour la synthèse des peptides comportant des tryptophanes, nous avons utilisé le dérivé Boc-Trp-OH et non le dérivé Boc-Trp(CHO)-OH, parfois employé en

chimie Boc-SPPS. L'utilisation du dérivé protégé par un formyle nécessite en effet un traitement du peptide-résine par de la pipéridine pour déprotéger la chaîne latérale du Trp avant le clivage HF. De même, le cocktail de piègeurs de carbocations utilisé lors du clivage HF ne doit pas contenir de thiols.

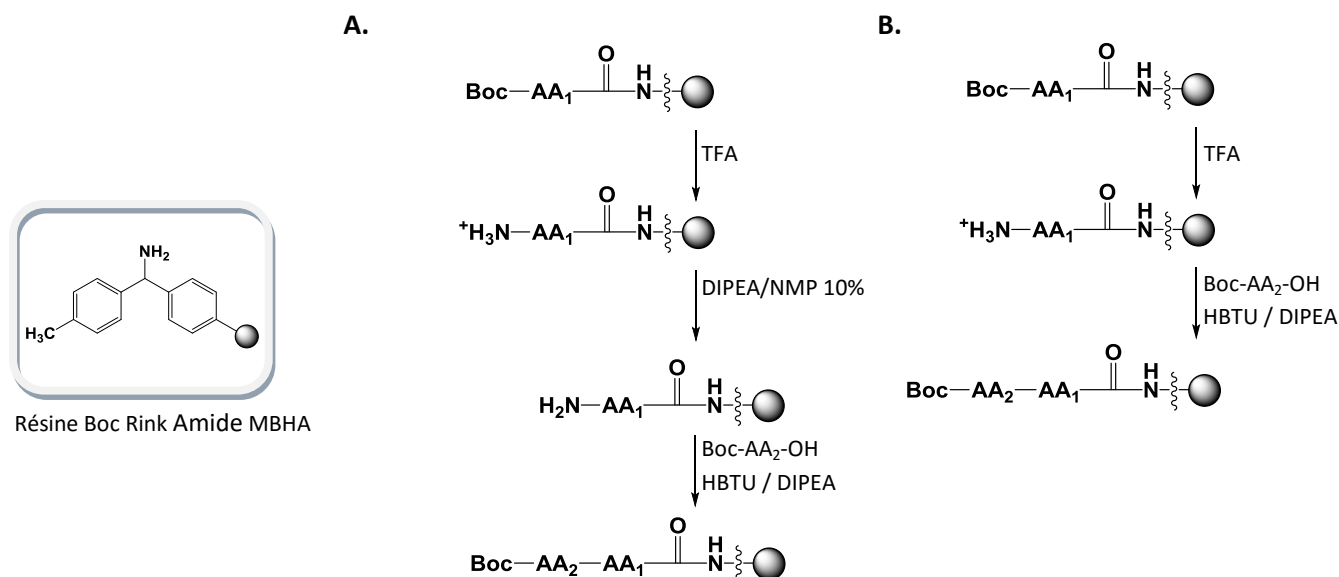


Figure 57 – A) Cycle standard de synthèse peptidique en stratégie Boc. B) Cycle de neutralisation *in situ* en stratégie Boc. DIPEA = *diisopropyléthylamine*. Ici l'agent d'activation utilisé est le HBTU.

Nous avons appliqué la méthode développée par Hackeng *et al.* pour la synthèse des thioester qui consiste à utiliser le lien MPAL (mercaptopropionic acid leucine).¹²⁹ Celui-ci est introduit facilement : après couplage d'une leucine sur la résine (jouant uniquement le rôle d'espaceur), l'acide *S*-trityl-mercaptopropionique est couplé en conditions standard (par activation au HBTU) (**Figure 58**). L'étape d'élimination du groupement trityl requiert une attention particulière afin d'assurer une déprotection totale du thiol et d'éviter son oxydation (voir partie matériels et méthodes). La détritylation est réalisée par passage en flux continu d'un mélange TFA/H₂O/triéthylsilane (95:2,5:2,5; v/v/v). Le couplage du premier Boc-amino acide est réalisé immédiatement après déprotection du lien MPA.

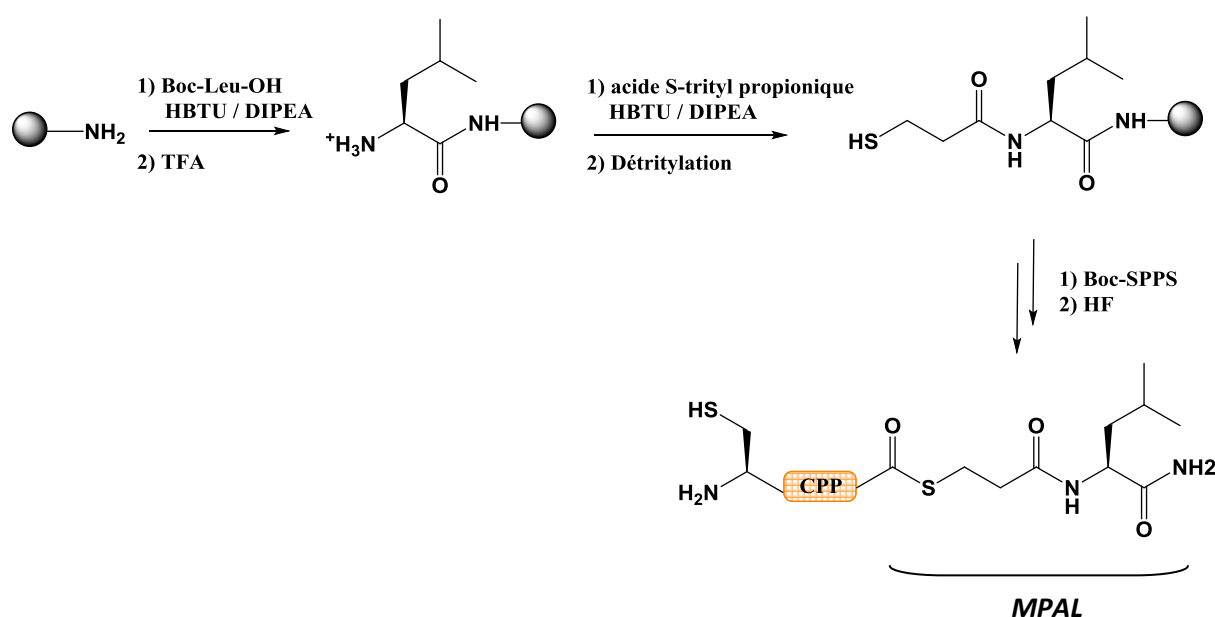


Figure 58 – Préparation des peptides thioester (CPP-MPAL) en utilisant la résine MPAL.

Après couplage du premier acide aminé, l'assemblage du peptide peut être réalisé de façon automatique. Toutefois, nous avons préféré synthétiser les peptides manuellement ce qui nous permettait de contrôler l'efficacité des couplages (par test de Kaiser) et nous donnait plus de flexibilité dans le choix des conditions de synthèse. Nous avons appliqué le protocole de neutralisation *in situ* (**Figure 57-B**) qui permet d'améliorer les rendements de synthèse des peptides en limitant leur agrégation sur support solide.¹⁴⁴ L'agrégation, lorsqu'elle a lieu, intervient lorsque les amines sont neutralisées (déprotonées) par traitement avec de la DIPEA. Les amines terminales étant moins accessibles en cas d'agrégation, le couplage de l'acide aminé qui suit n'est pas efficace et conduit à des délétions dans la séquence du peptide. La stratégie de neutralisation *in situ* consiste simplement à réaliser la déprotonation simultanément à l'addition de l'acide aminé activé. Pour le couplage, les Boc-amino acides sont activés sous forme d'ester d'oxybenzotriazole par traitement au HBTU.

Après clivage de la résine par traitement avec du HF anhydre en présence de p-crésol comme piègeur de carbocations, les peptides sont purifiés par HPLC en phase inverse. Nous avons observé des rendements de synthèse des peptides MPAL comparables à ceux obtenus pour la synthèse des peptides carboxamides de même séquence. Par exemple, les peptides

R₆W₃-MPAL et Pen-MPAL ont été respectivement isolés avec des rendements de 34 % et 29 %. Les différents dérivés de CPP classiques synthétisés sont présentés dans le Tableau 5.

Séquences des peptides	Noms
CRQIKIWFQNRRMKWKK-MPAL	Pen-MPAL
CGRKKRRQRRR-MPAL	Tat-MPAL
CRRRRRRRRR-MPAL	R ₉ -MPAL
CRRWWRRWRR-MPAL	R ₆ W ₃ -MPAL

Tableau 5 – Séquences des CPP thioester (Pen = Pénétratine, MPAL = mercaptopropionic acid leucine)

1.1.2 Cyclisation des peptides thioester par ligation chimique native

Dès le premier CPP-MPAL synthétisé (R₆W₃-MPAL), des réactions de cyclisation ont été réalisées afin de définir les paramètres importants pour la réaction de ligation et de l'optimiser. La réaction est suivie par HPLC en phase inverse. Le mécanisme de cyclisation par NCL est représenté sur la Figure 59.

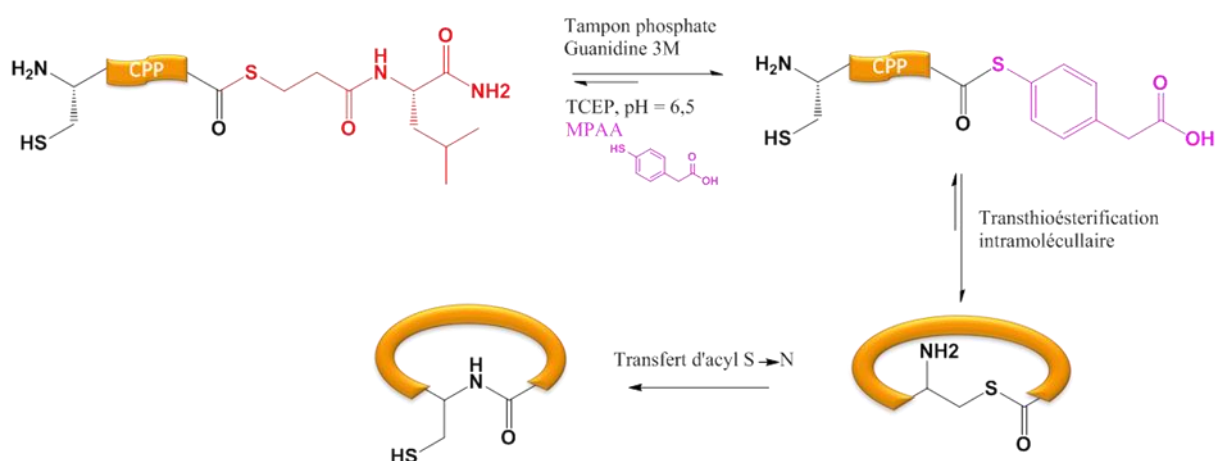


Figure 59 – mécanisme de cyclisation des CPP-MPAL via ligation chimique native (NCL) classique (à partir d'un thioester préformé).

Les réactions de cyclisation se font en solution aqueuse dans un tampon phosphate à pH neutre, en présence d'un additif thiol (le MPAA, **Figure 59**) et d'un agent réducteur (le TCEP) et éventuellement d'un agent dénaturant, le chlorhydrate de guanidine. Bien que le tampon soit soigneusement dégazé et purgé à l'argon avant mise en solution du peptide, l'addition de TCEP est nécessaire pour maintenir les thiols (cystéine et MPAA) sous forme réduite. Il n'est en revanche pas nécessaire de conserver le mélange sous argon pendant la réaction.

Facteurs influençant la cinétique de la réaction :

- Le pH

Les réactions de ligation chimique native sont classiquement effectuées à un pH proche de la neutralité (pH 6,5 à 7,5). La réaction est accélérée lorsque le pH est augmenté du fait de la déprotonation des espèces nucléophiles impliquées dans la réaction. Cependant, au delà de pH 8, des réactions secondaires sont observées. Il s'agit principalement de l'hydrolyse de la fonction thioester. De plus, à pH basique, la réaction n'est plus chimiosélective : le thioester peut dans certaines conditions réagir avec les amines des chaînes latérales des Lys (par exemple lors de ligations de deux fragments utilisant un excès du fragment thioester). Il a aussi été montré, qu'à pH élevé et lors du chauffage modéré du mélange réactionnel, le TCEP peut conduire à la désulfuration des cystéines.¹⁴⁵ Cette réaction secondaire est observée lors de ligations réalisées en absence de thiol externe (thiophénol, MPAA, ...). L'introduction d'ascorbate de sodium permet alors d'éviter la désulfuration.¹⁴⁶ Enfin, un pH plus élevé favorise l'oxydation des thiols. Le contrôle du pH du mélange réactionnel est donc indispensable.

- La concentration et la nature des thiols ajoutés au mélange réactionnel

Sans ajout de thiol externe dans le mélange réactionnel, nous n'avons pas détecté de cyclisation après 48 heures. L'ajout du MPAA permet de convertir *in situ* le peptide alkyl thioester (MPAL) en aryle thioester plus réactif vis-à-vis de l'attaque nucléophile par le thiol de la cystéine (un meilleur groupe partant étant introduit). Lors de l'optimisation des conditions de ligation, nous avons observé que l'augmentation de la concentration en MPAA, de 30 à 300 mM, augmente la cinétique de la réaction. Cependant, une

concentration élevée en MPAA peut, dans certains cas, gêner le suivi de la réaction par HPLC du fait de la co-migration du thiol avec les espèces d'intérêt (peptide linéaire ou cyclique). Nous avons dans certains cas testé l'ajout du 2-mercaptoéthanesulfonate de sodium (MESNa), préconisé dans certains protocoles de ligation chimique.¹⁴⁷ La réaction est totale comme avec le MPAA mais plus lente comme attendu, le MESNa étant un dérivé thioalkyl.

- La concentration en guanidine

La guanidine est ajoutée si nécessaire au milieu pour augmenter la solubilité du peptide. Cet agent dénaturant est indispensable lors de la ligation de fragments peptidiques de poids moléculaire élevé pour la synthèse de protéines. L'ajout de guanidine s'est également révélé indispensable pour certains de nos peptides afin d'atteindre des concentrations de l'ordre du mM. Nous avons comparé pour la cyclisation du peptide R_6W_3 -MPAL, la cinétique de la réaction à deux concentrations différentes de guanidine (3 ou 6 M). Dans les deux cas, le peptide, totalement soluble, était à la concentration de 2 mM. Cette expérience a montré que la vitesse de ligation diminue (réactions finies en 5h au lieu de 3h) lorsque la concentration en guanidine augmente, peut-être du fait de la viscosité plus élevée de la solution. Nos ligations ont donc été réalisées quand cela était possible en absence de guanidine ou à la concentration minimale.

Dans un tampon à pH ~ 7 , en l'absence de chlorhydrate de guanidine, avec 30 mM de MPAA et autant de TCEP, la cyclisation de R_6W_3 -MPAL (1mM) est pratiquement terminée au bout de 1h30. On observe une conversion totale du peptide thioester en peptide cyclique sans aucune réaction secondaire (**Figure 60**). Dans les mêmes conditions, la ligation de R_9 -MPAL est quasi instantanée, tandis que celle de Tat-MPAL est finie en moins de 6h. La cyclisation de Pen-MPAL, en présence de 3 M de guanidine, est totale en 10 heures. Une fois la réaction terminée, les peptides cycliques sont purifiés par HPLC. Il semble important de signaler que bien que le suivi par HPLC analytique de la cyclisation de R_9 ne pose aucun problème, la purification du produit s'est avérée difficile et conduit à un mauvais rendement. Il semble en effet que le produit cyclique précipite lors de l'injection en HPLC de quantités plus importantes de produit. Ce problème a pu être partiellement surmonté en purifiant le peptide par de multiples injections HPLC.

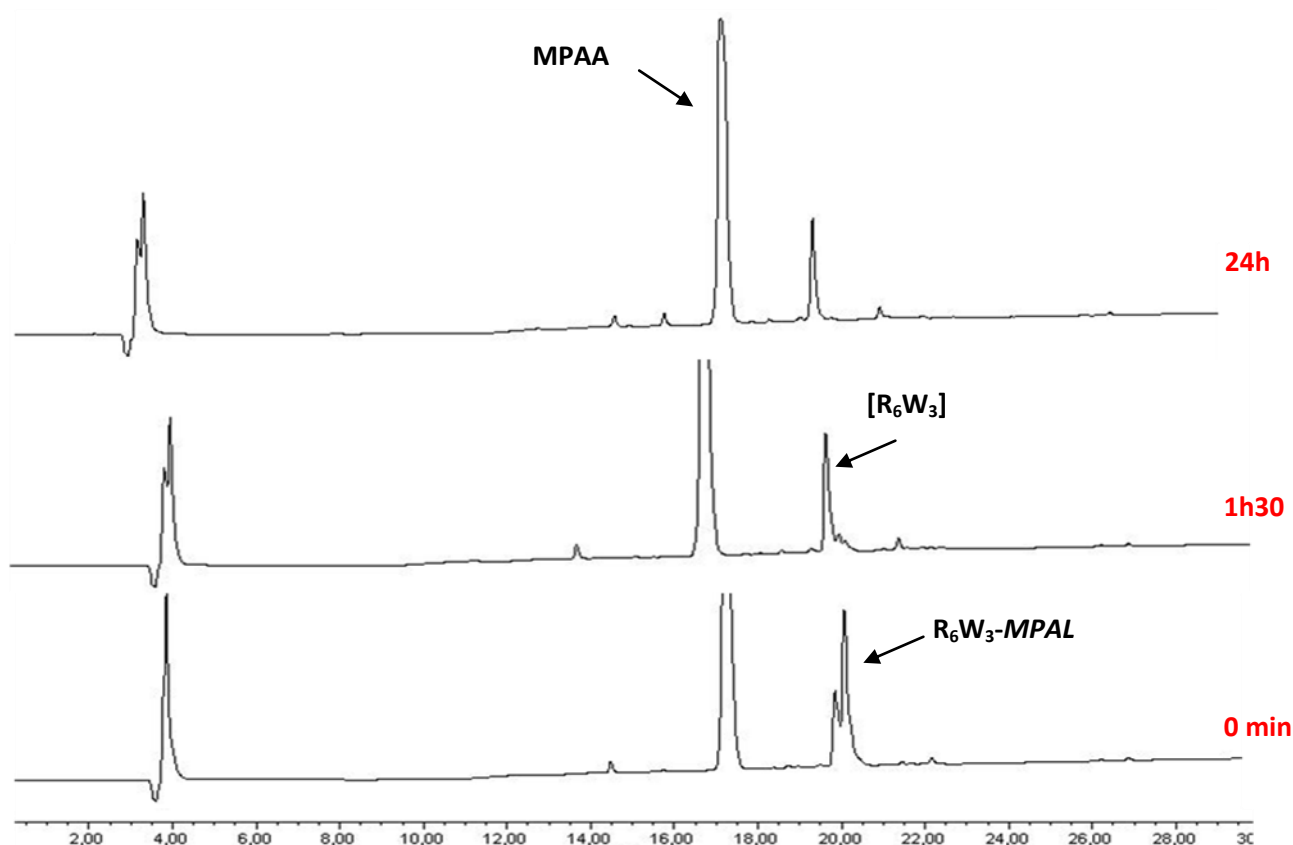


Figure 60 – Suivi de la cyclisation de R_6W_3 -MPAL par HPLC en phase inverse. Des échantillons du mélange réactionnel ont été prélevés à différents temps (indiqués en rouge) et injectés en HPLC phase inverse. Conditions de la réaction de ligation : $[R_6W_3] = 1\text{mM}$ dans un tampon contenant 200 mM phosphate de sodium, 2 mM EDTA, 30 mM MPAA, 30 mM TCEP, pH : 7.

2. Synthèse sur support solide en stratégie Fmoc de peptides comportant une α -méthyle cystéine C-terminale

Bien que notre laboratoire soit équipé pour le clivage HF, nous avons voulu mettre au point une méthode plus générale pour l'accès aux peptides cycliques par ligation chimique native, reposant sur l'utilisation d'un précurseur de peptide thioester obtenu en stratégie Fmoc. Nous avons ainsi appliqué la stratégie récemment développée qui utilise l' α -méthyle cystéine (α MeCys) comme précurseur de thioester.¹⁴³ Le résidu α MeCys (de configuration L) est commercial, il suffit de le protéger sur son amine et sa chaîne latérale avant greffage sur la résine.

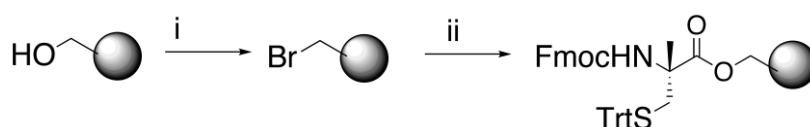


Figure 61 – Fonctionnalisation de la résine Wang avec le dérivé α MeCys. i) PBr_3/CH_2Cl_2 , 45 min, température ambiante, ii) Fmoc- α Me-L-Cys(Trt)-OH, DIPEA (2 eq, 0,2 M), DMF, 16h, température ambiante.

Le greffage est réalisé selon la procédure proposée par Topping *et al.* (**Figure 61**).¹⁴⁸ La résine Wang est traitée par du tribromure de phosphore en conditions anhydres. L'estérification par la Fmoc- α MeCys(Trt)-OH est ensuite réalisée. La résine ainsi fonctionnalisée nous a été fournie par le groupe de J. Offer (MRC NIMR, UK). L'élongation des peptides est réalisée dans les conditions standard de la stratégie Fmoc, en utilisant à nouveau le HBTU comme agent de couplage. Après clivage de la résine par traitement au TFA en présence des piègeurs de carbocations usuels (TFA/H₂O/triisopropylsilane/éthanedithiol), le peptide- α MeCys est purifié par HPLC. Nous avons choisi la Pénétratine comme exemple. Elle a été isolée avec un rendement de 34 %, comparable à celui obtenu pour la synthèse de Pen-MPAL.

2.1 Cyclisation des dérivés α -méthyle cystéine

Dans cette stratégie, l'espèce thioester est générée *in situ* (dans les conditions de ligation) par transfert d'acyle N \rightarrow S (**Figure 62**). Le dérivé thioester est alors activé par transthioestérification, en présence de MPAA. Le MPAA permet également de déplacer l'équilibre amide-thioester vers la formation du thioester, en piégeant le dérivé S-acyl formé. La cyclisation s'effectue ensuite selon le mécanisme classique de ligation chimique native, par capture du thioester par le groupement thiol de la cystéine puis transfert d'acyle S \rightarrow N conduisant à la formation de la liaison peptidique.

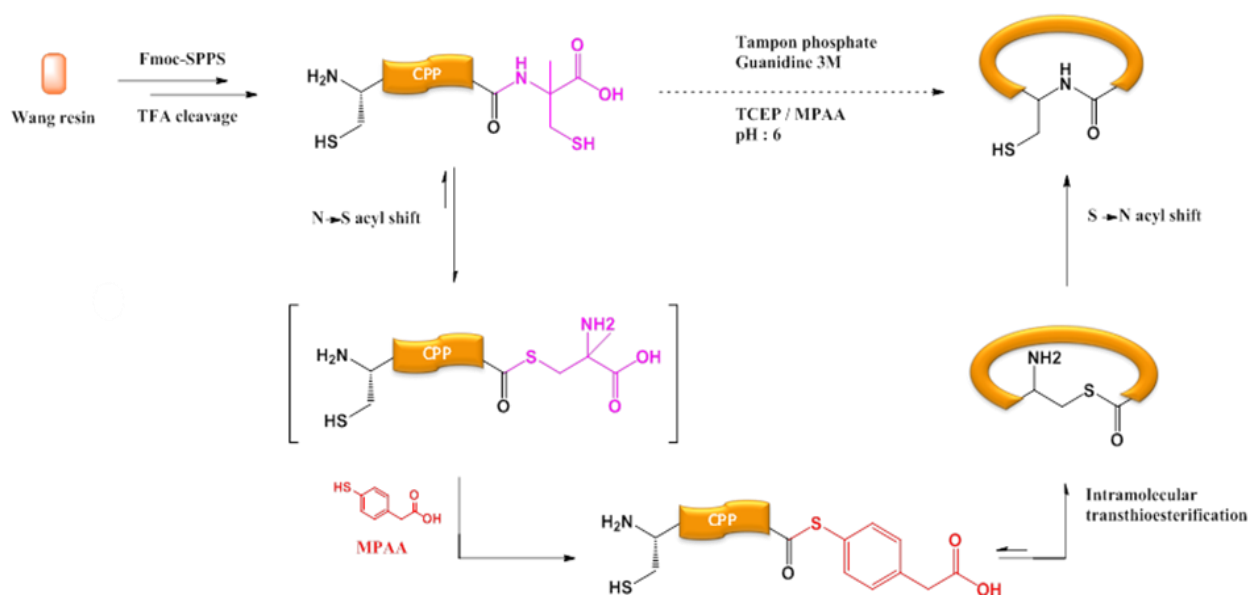


Figure 62 – Mécanisme de cyclisation des peptides α MeCys.

La stratégie utilisant les peptides α MeCys avait été initialement développée pour la synthèse de protéines.¹⁴³ Au cours de cette étude il avait été mis en évidence que l'étape cinétiquement limitante correspondait au transfert d'acyle N \rightarrow S. Il avait alors été montré que bien que la ligation soit totale à pH 7,5 en présence de 60 mM de MPAA, elle est beaucoup plus lente que la ligation chimique native classique (utilisant un thioester préformé) effectuée dans les mêmes conditions. L'augmentation de la concentration en MPAA à 300 mM avait permis d'accélérer de façon notable la cinétique de la réaction.

Nous avons optimisé ici les conditions de ligation des dérivés α MeCys pour l'obtention de peptides cycliques. J'ai évalué l'impact de différents paramètres (pH, nature et concentration du catalyseur thiol, concentration en guanidine, ...) sur la cinétique de la réaction (**Tableau 6**). On note, comme pour la NCL classique, un ralentissement significatif de la réaction lorsque que la concentration en guanidine est augmentée de 3 à 6 M (le temps de demi réaction, $\tau_{1/2}$, passe de 8 à 15 h). L'augmentation de la concentration en MPAA de 300 à 450 mM accélère modérément la réaction (le $\tau_{1/2}$ passe de 6 à 5 h). En revanche, contrairement à ce qui est observé pour la NCL classique, la diminution du pH accélère de façon notable la réaction (le $\tau_{1/2}$ passe de 6 h à pH 7 à 3h30 à pH 5). Ceci reflète une accélération de l'étape de transfert d'acyle N \rightarrow S lorsque le pH diminue. Enfin, nous avons

observé que l'utilisation de MESNa comme catalyseur (seul ou en mélange avec du MPAA) permet une réaction totale mais plus lente que lors de l'utilisation de MPAA seul. Sans ajout de thiol, et en présence d'ascorbate de sodium, aucune réaction n'est observée. Enfin, le chauffage du mélange réactionnel (45°C) accélère modérément la cyclisation.

	Pen (mM)	Guanidine (M)	MPAA (mM)	pH	$\tau_{1/2}$ (h)
MPAA	1	3	<u>300</u>	5.5	6
	1	3	<u>450</u>	5.5	5
Guanidine	1	<u>6</u>	300	6.5	>15
	1	<u>3</u>	300	6.5	8
[I]	<u>1</u>	3	300	5.5	6
	<u>0.5</u>	3	300	5.5	5.5
pH	0.5	3	450	<u>7</u>	6
	0.5	3	450	<u>6</u>	4
	0.5	3	450	<u>5</u>	3.5

Tableau 6 – Effet de différents paramètres sur la vitesse de cyclisation de la Pénétratine- α MeCys. Les temps de demi-réaction ($\tau_{1/2}$) ont été estimés à partir des suivis HPLC des réactions, en considérant que le peptide linéaire et le produit cyclique donnent, à concentrations égales, des signaux de mêmes intensités.

Dans les conditions les plus favorables (encadrées en rouge, **Tableau 6**) la cyclisation de la Pénétratine est terminée en moins de 10h. La réaction est totale dans toutes les conditions testées et aucun produit secondaire n'est détecté (**Figure 63**). De façon intéressante, même dans les conditions où la réaction est très lente (réaction finie en 3 jours), on n'observe pas d'hydrolyse de l'espèce thioester. Ceci s'explique par le fait que l' α MeCys induit une production lente du thioester, qui dès formation et activation par le MPAA réagit immédiatement avec la Cys pour former le produit de ligature. Le problème d'hydrolyse de thioester est par contre souvent rencontré dans le cas de NCL classiques

(utilisant un dérivé thioester préformé) lentes (cas de ligation de deux fragments au niveau de sites défavorables, à faible concentration en peptides, non terminées en 24 h).

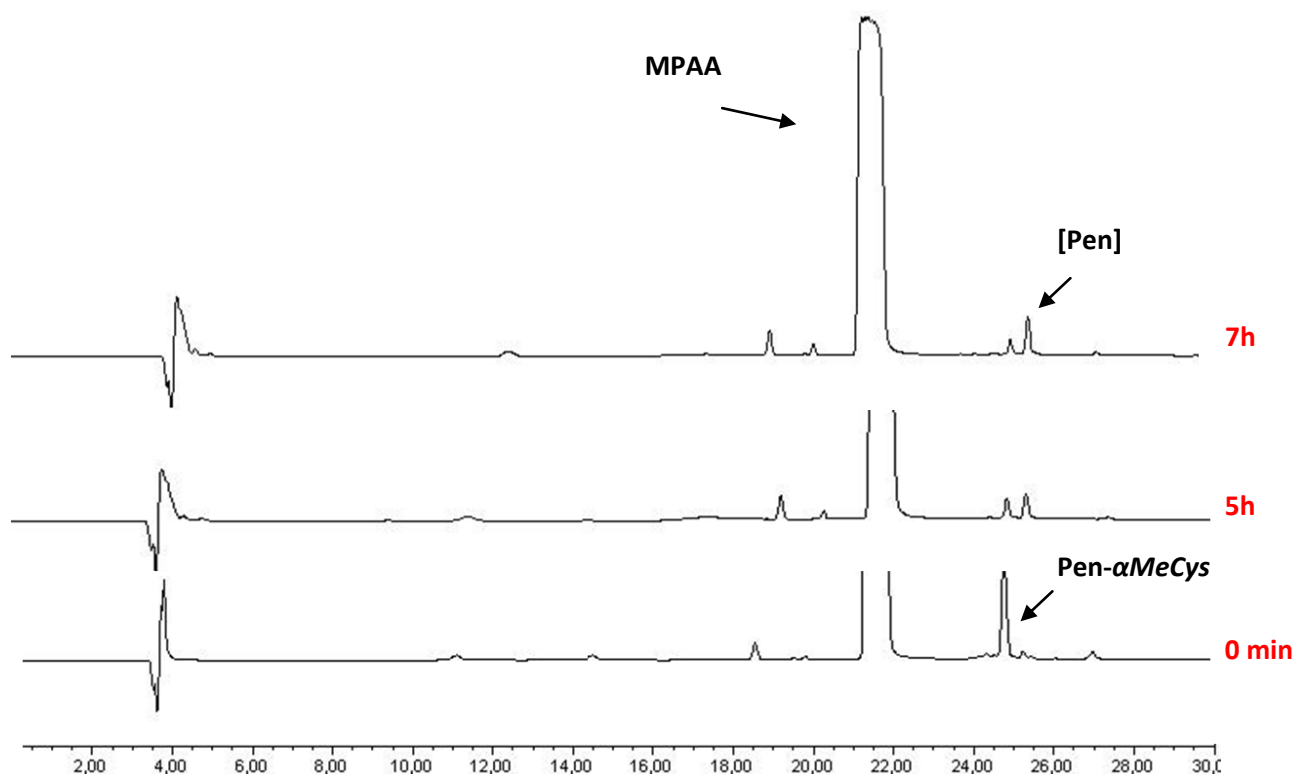


Figure 63 – Suivi de la cyclisation de Pen- α MeCys par HPLC. Condition réactionnelles: [Pen] = 0,5 mM dans un tampon contenant 200mM phosphate de sodium, 2 mM EDTA, 3 M guanidine, 450 mM MPA, 450 mM TCEP, pH : 6.

Nous avons également utilisé cette stratégie pour la cyclisation du peptide Lifeact, un peptide de 17 acides aminés, se liant à l'actine.¹⁴⁹ Des études de liaison à l'actine du peptide cyclique sont en cours au MRC NIMR (UK).

3. Synthèse des vecteurs lipopeptidiques cycliques

Nous avons choisi pour la synthèse de notre petite librairie de lipopeptides cycliques (**Tableau 7**) la stratégie Boc. Ceci a été motivé par différentes raisons : la stratégie Boc donne de façon générale de meilleurs rendements de synthèse que la stratégie Fmoc car moins

sujette aux problèmes d'agrégation et l'accès au motif thioester est plus simple en stratégie Boc.

Séquences des peptides	Noms
$CC_{12}RRRR-MPAL$	$C_{12}-R_4-MPAL$
$CK(C_{12:0})RRRR-MPAL$	$K(C_{12:0})-R_4-MPAL$
$CK(C_{18:0})RRRR-MPAL$	$K(C_{18:0})-R_4-MPAL$
$CRRC_{12}RR-MPAL$	$R_2-C_{12}-R_2-MPAL$
$CRRRC_{12}R-MPAL$	$R_3-C_{12}-R-MPAL$
$CWRRRR-MPAL$	$W-R_4-MPAL$
$CFRRRR-MPAL$	$F-R_4-MPAL$
$CC_{12}RRFRR-MPAL$	$C_{12}-R_2-F-R_2-MPAL$
$CC_{12}WRRRR-MPAL$	$C_{12}-W-R_4-MPAL$
$CC_{12}RRC_{12}RR-MPAL$	$C_{12}-R_2-C_{12}-R_2-MPAL$
$CC_{12}RRRC_{12}RRR-MPAL$	$C_{12}-R_3-C_{12}-R_3-MPAL$
$CC_{12}RQIKIWFQNRRMKWKK-MPAL$	$C_{12}-Pen-MPAL$
$CC_{12}RRRRRRRRR-MPAL$	$C_{12}-R_9-MPAL$
$CC_{12}RRRRRRRR-MPAL$	$C_{12}-R_8-MPAL$
$CC_{12}RRRRRRR-MPAL$	$C_{12}-R_7-MPAL$

Tableau 7 – Séquence des lipopeptides thioester. $K(C_{12:0})$ et $K(C_{18:0})$ correspondent à la fonctionnalisation de la chaîne latérale de la lysine par un acide laurique ou stéarique, respectivement. C_{12} correspond à l'acide (R,S)-Boc-2-amino-tétradécanoïque.

Cette petite librairie inclue des CPP comportant un domaine oligo-Arg de taille variable (4 à 9 Arg). Sur la base des travaux antérieurs du laboratoire, les CPP ont été fonctionnalisés par une chaîne d'acide gras ayant un minimum de 12 atomes de carbone. La chaîne lipophile a été introduite soit par couplage direct de l'acide (R,S)-Boc-2-amino-tétradécanoïque (nommé C_{12}) soit par couplage sur la chaîne latérale d'une lysine de l'acide laurique ou stéarique (notés $K(C_{12:0})$ et $K(C_{18:0})$, respectivement). Pour la synthèse des peptides comportant une lysine fonctionnalisée, le résidu Boc-Lys(mtt)-OH a été utilisé. Le groupement protecteur de la chaîne latérale (4-méthyltrityle, mtt) peut être éliminé en

conditions acides douces (1 % de TFA dans le DCM) sans toucher à l'intégrité du groupement protecteur Boc de l'amine α . Les acides laurique ou stéarique peuvent alors être couplés dans des conditions standard sur la chaîne latérale de la Lys. La position de la chaîne grasse dans la séquence du CPP a été modulée, de façon à créer des domaines contenant un nombre variable de résidus Arg contigus. Des peptides *MPAL* comportant deux chaînes d'acide gras ont également été synthétisés, ainsi que le dérivé Pénétratine cyclique acylé. Pour finir, deux petits CPP cycliques sans chaîne lipidique mais incorporant un acide aminé hydrophobe (Trp ou Phe) ont été préparés. Les réactions de cyclisation à partir des peptides-*MPAL* ont été réalisées comme décrit précédemment. Nous avons choisi de nous placer dans la plupart des cas à pH 6,5 et à faible concentration en TCEP (3,5 mM) et MPAA (3 mM), pour simplifier les suivis de réactions et purifications des produits par HPLC. Dans ces conditions, les cyclisations sont totales et terminées en 18 h maximum (**Figure 64**). Tous les peptide-*MPAL* présentés dans le Tableau 7 ont pu être cyclisés à l'exception des séquences C_{12} -W-R₄-*MPAL*, C_{12} -R₂- C_{12} -R₂-*MPAL* et C_{12} -R₃- C_{12} -R₃-*MPAL*. Une fois introduits dans le tampon de ligation, ces lipopeptides très hydrophobes semblent précipiter ou s'agréger rendant la cyclisation impossible. Nous n'avons pas poursuivi les tentatives de cyclisation, la disposition à l'agrégation de ces dérivés présageant des difficultés pour les étapes à suivre (conjugaison au peptide cargaison et études sur cellules en culture). Une cyclisation en présence de DMF aurait pu être tentée, bien que la présence de DMF complique l'isolement du produit. Cependant, une tentative de ligation précédente (d'une autre séquence) avait montré que l'utilisation de DMF nécessite des précautions particulières. Notre tentative de cyclisation avait échoué du fait de la formation de thiazolidine entre la cystéine *N*-terminale et du formaldéhyde (contaminant le DMF ou consommables utilisés).

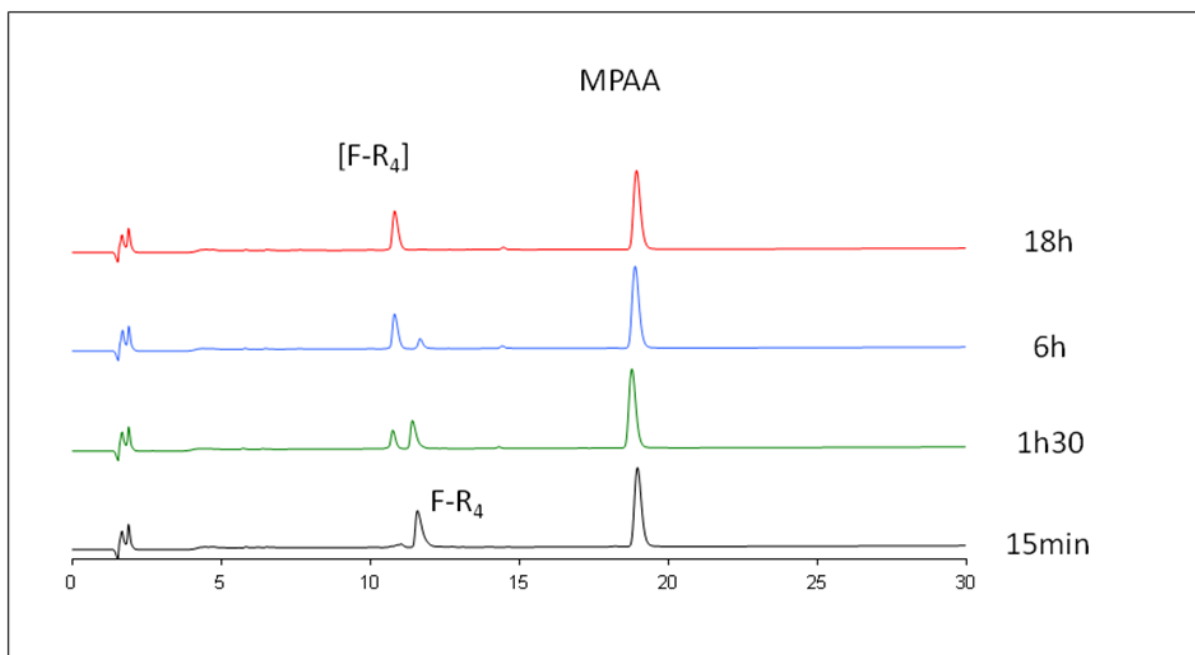


Figure 64 – Suivi de la réaction de cyclisation du peptide $F-R_4$ -MPAL. $[F-R_4] = 1 \text{ mM}$ dans un tampon 200 mM phosphate de sodium, 2 mM EDTA, 3 M guanidine, 3,5 mM MPAA, 30 mM TCEP, pH : 6,5.

4. Conjugaison des CPP cycliques à leur cargaison

L'ensemble des CPP cycliques décrits précédemment ont été conjugués *via* pont disulfure au peptide cargaison PKCi (**Tableau 8**). Celui-ci a été fonctionnalisé en son extrémité *N*-terminale par un résidu cystéine et une étiquette de marquage isotopique Biotine(O_2)-GGGG pour permettre la quantification de l'internalisation cellulaire par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La Cys introduite sur le peptide PKCi est protégée par le groupement NPys (nitropyridine sulfenyl) pour favoriser la conjugaison ultérieure (**Figure 65-A**). Le groupement Npys est stable vis-à-vis de la chimie Boc-SPPS et du traitement HF. Ce groupement est cependant sensible aux nucléophiles et agents réducteurs, qui sont donc proscrits pendant la préparation du peptide. Pour cette raison également, l'activation du résidu Boc-Cys est réalisée en présence de DCC seul. Les autres résidus sont activés par du HBTU. L'assemblage du peptide, en stratégie Boc, est effectué sur une résine MBHA conduisant après clivage HF au peptide carboxamide.

Le groupement Npys est un bon groupe partant. Lors de la ligation *via* pont SS de deux peptides (**Figure 65**), sa présence sur la Cys d'un des deux peptides permet de favoriser la formation d'hétérodimères. Les réactions de conjugaison sont de plus réalisées à pH acide (tampon acétate de sodium pH 4,5 soigneusement dégazé) en utilisant un léger excès du peptide porteur de la Cys(NpyS). On évite ainsi la dimérisation du peptide portant la Cys libre.

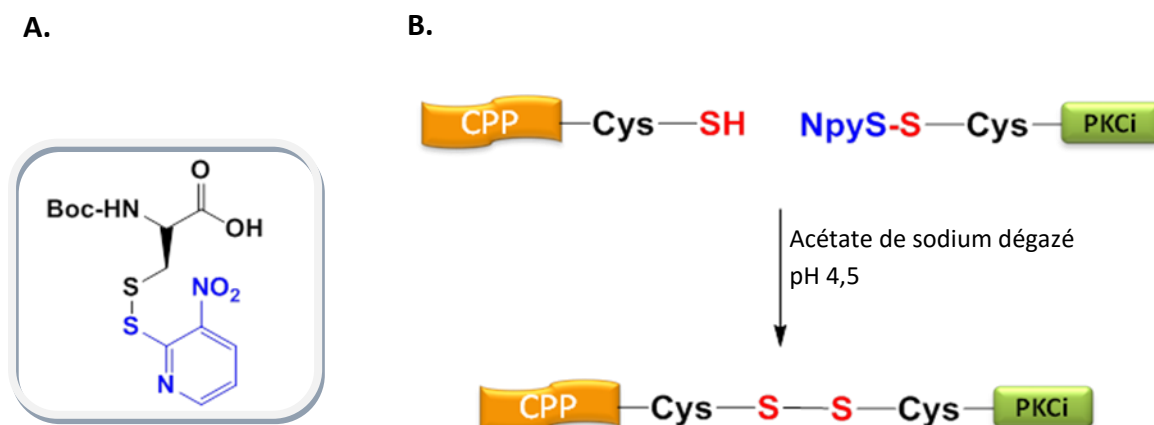


Figure 65 – A) Structure chimique de la Boc-L-Cys(Npys)-OH. B) Réaction de conjugaison entre un vecteur portant une cystéine non protégée et le peptide PKCi porteur d'une cystéine activée par un groupe Npys.

4.1 Synthèse et conjugaison des CPP linéaires de référence

Les CPP classiques (linéaires) Pénétratine, Tat, R₉ et R₆W₃ ont également été synthétisés comme référence. Cette fois-ci ce sont les CPP qui portent la Cys activée par le groupement Npys et ils ont été conjugués à du peptide PKCi ayant une Cys libre que nous avons déjà en stock au laboratoire. Enfin, il faut préciser qu'une version du peptide PKCi marqué par du deutérium a également été synthétisée : les 4 résidus glycine de l'étiquette N-terminale sont bi-deutériées. Les CPP ont été conjugués au PKCi non deutérié (¹H-PKCi), le PKCi deutérié (²H-PKCi) est quant à lui utilisé comme étalon interne pour les quantifications par spectrométrie de masse (et ne nécessite pas de conjugaison aux CPP).

Séquences des peptides	Noms
CPP classiques :	
Ac-C(Npys)RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂	Pen
Ac-C(Npys)GRKKRRQRRR-NH ₂	Tat
Ac-C(Npys)RRRRRRRRR-NH ₂	R ₉
Ac-C(Npys)RRWWRRWRR-NH ₂	R ₆ W ₃
Cargaison :	
Biot-GGGGCRFARKGALRQKNV-NH ₂	PKCi

Tableau 8 – Séquences des CPP classiques linéaires et du peptide transporté. (Ac = acétyle, Biot = biotine sulfone).

IV - EVALUATIONS BIOLOGIQUES

IV. Evaluations biologiques.

Notre objectif était d'évaluer le potentiel des différents CPP en tant que transporteurs de peptides bioactifs. Nous nous sommes intéressés en premier lieu à la vectorisation du peptide PKCi qui a été très largement étudié dans le laboratoire.^{107,112,150} Ceci nous permettait de positionner nos nouveaux vecteurs par rapport à ceux développés précédemment dans le laboratoire, en particulier le vecteur minimaliste C₁₂-R₄, qui était apparu comme intéressant. Nous avons souhaité voir l'impact de la cyclisation combinée à l'acylation par des chaînes d'acides gras de CPP sur leur voie d'entrée dans les cellules (translocation vs endocytose) et leur capacité de recrutement des GAG de surface.

1. L'espèce vectorisée : le PKCi, un peptide inhibiteur des protéines kinases C.

Les protéines kinases (PK) sont des enzymes qui catalysent la phosphorylation de protéines par transfert d'un groupe phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP) sur le groupement hydroxyle des chaînes latérales des aminoacides sérine, thréonine et tyrosine. Elles sont impliquées dans diverses fonctions physiologiques de la cellule, comme les phénomènes d'apoptose, la modulation des canaux ioniques, l'organisation du cytosquelette ou bien encore dans la sécrétion et la prolifération cellulaire. Leur dysfonctionnement peut être à l'origine de certaines pathologies, dont le cancer.¹⁵¹ Les PK sont regroupées en deux grandes familles en fonction de la nature du résidu phosphorylé. Les protéines kinases C (PKC), dont il existe plusieurs isoformes, sont des sérine / thréonine kinases. Elles sont constituées d'une seule chaîne protéique composée de deux domaines. Le premier, situé du côté *N*-terminal, a une fonction de régulation, le deuxième correspond au domaine catalytique. Sur la région *N*-terminale des PKC- α/β , se trouve une séquence « pseudo-substrat » qui permet l'auto-inhibition de l'enzyme par occupation du site catalytique. Les activateurs allostériques de l'enzyme (diacylglycérol, ester de phorbol) lèvent cette auto-inhibition en se liant à la protéine. Le peptide correspondant à la séquence du pseudo-substrat (RFARKGALRQKNV, nommé ici PKCi) a été proposé pour l'inhibition des PKC.¹⁵² Cependant ce peptide, bien que riche en résidus basiques, pénètre peu efficacement dans

les cellules. Alain Prochiantz et ses collaborateurs ont montré que le peptide PKCi conjugué à la Pénétratine était capable d'inhiber spécifiquement la PKC dans des cellules neuronales. Cette inhibition provoque une modification de la morphologie des cônes de croissance des neurones.¹⁵⁰ En revanche, aucune activité biologique n'est observée lorsque les cellules sont incubées avec le PKCi libre (non vectorisé).

2. Quantification de l'internalisation cellulaire de peptides par spectrométrie de masse

2.1 Principe de la technique

Nous avons comparé l'efficacité de nos différents CPP en utilisant une méthode basée sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF développée précédemment au laboratoire.^{85,153} Cette technique peut être appliquée soit à la quantification du CPP, soit comme nous avons choisi de le faire dans ce projet, au dosage du peptide vectorisé. La spectrométrie de masse permet la caractérisation directe des espèces internalisées, ainsi que leur dégradation intracellulaire éventuelle, qui peut être détectée et analysée. La spectrométrie de masse MALDI-TOF n'est pas une technique directement quantitative car l'efficacité de désorption/ionisation d'un peptide dépend de sa séquence. De plus, les peptides ne se répartissent pas forcément de façon homogène lors de leur co-cristallisation avec la matrice ce qui conduit à des variations d'intensité du signal selon le point d'impact du laser sur le dépôt. Il est cependant possible de quantifier un peptide par MALDI-TOF, en utilisant un étalon interne de même séquence que le peptide à doser mais marqué par un isotope stable (^2H , ^{15}N ...). Les deux peptides étant chimiquement équivalents, ils se répartiront de la même façon sur le dépôt et auront la même efficacité de désorption/ionisation. Ils seront cependant distinguables par leur masse. Dans notre protocole, une étiquette de marquage isotopique « biotine(O_2)-Gly₄ » est introduite en position *N*-terminale des peptides à doser (CPP ou cargaison) (**Figure 67**). Les 4 résidus Gly ne sont pas deutériés dans le cas de l'espèce incubée avec les cellules (^1H -peptide) et elles sont bi-deutériées dans le cas de l'étalon interne (^2H -peptide) introduit avant lyse des cellules. Grâce à ce marquage isotopique, les deux peptides ont des masses suffisamment

différentes ($\Delta m = 8$) pour assurer une bonne séparation de leurs massifs isotopiques (pour des peptides ayant un $m/z < 4000$). La quantité de peptide internalisé peut donc être simplement calculée à partir du rapport des aires des signaux des peptides ^1H et ^2H sur le spectre de masse. Lors de l'étude de conjugués disulfure CPP-cargaison, on utilise comme étalon interne la cargaison deutériée libre (non conjuguée) (**Figure 66**). En effet, les conjugués disulfure vont être réduits dans certains compartiments de la cellule, en particulier le cytosol. De plus, le pont disulfure peut se fragmenter lors de l'analyse MALDI-TOF. La biotine, introduite sur les peptides, permet quant à elle, l'extraction facile (grâce à son affinité femtomolaire pour la streptavidine) des peptides d'intérêt après lyse des cellules.

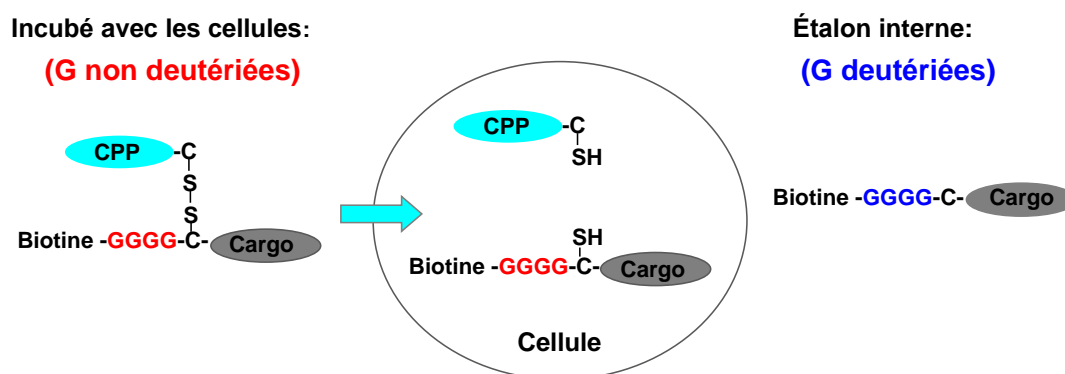


Figure 66 - Constructions utilisées pour la quantification par MALDI-TOF MS de l'espèce vectorisée. (Le terme anglo-saxon « cargo » qui signifie 'cargaison' est utilisé ici. La biotine est sous forme sulfone).

Les peptides vecteurs présentent généralement une forte affinité pour la membrane plasmique des cellules et un simple lavage des cellules ne permet pas d'éliminer le peptide lié à la membrane. Différents protocoles ont été développés au laboratoire au cours de ces dernières années permettant soit d'éliminer totalement le peptide associé à la membrane soit de modifier sa structure chimique et sa masse.¹⁵⁴ La détection directe des peptides par MALDI-TOF permet alors de distinguer sans ambiguïté les espèces internalisées des espèces liées à la membrane et d'éviter toute surestimation de l'efficacité d'internalisation. Le traitement le plus couramment utilisé correspond à la digestion du peptide extracellulaire par des protéases. Cependant, il a été montré que la digestion enzymatique n'est pas

efficace pour certaines séquences peptidiques. En particulier, les peptides contenant une cystéine (réduite ou oxydée) peuvent réagir *via* des échanges thiol/disulfure avec les cystéines des protéines membranaires pour former des adduits disulfure, espèces qui s'avèrent résistantes aux protéases. Un traitement des cellules avec l'agent réducteur TCEP avant digestion par les protéases permet alors d'éliminer tout le peptide associé aux membranes.¹⁵⁴

2.2 Protocole de quantification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les différentes étapes du protocole expérimental de quantification par spectrométrie de masse et les conditions que nous avons utilisées dans cette étude sont présentées sur la Figure 67.

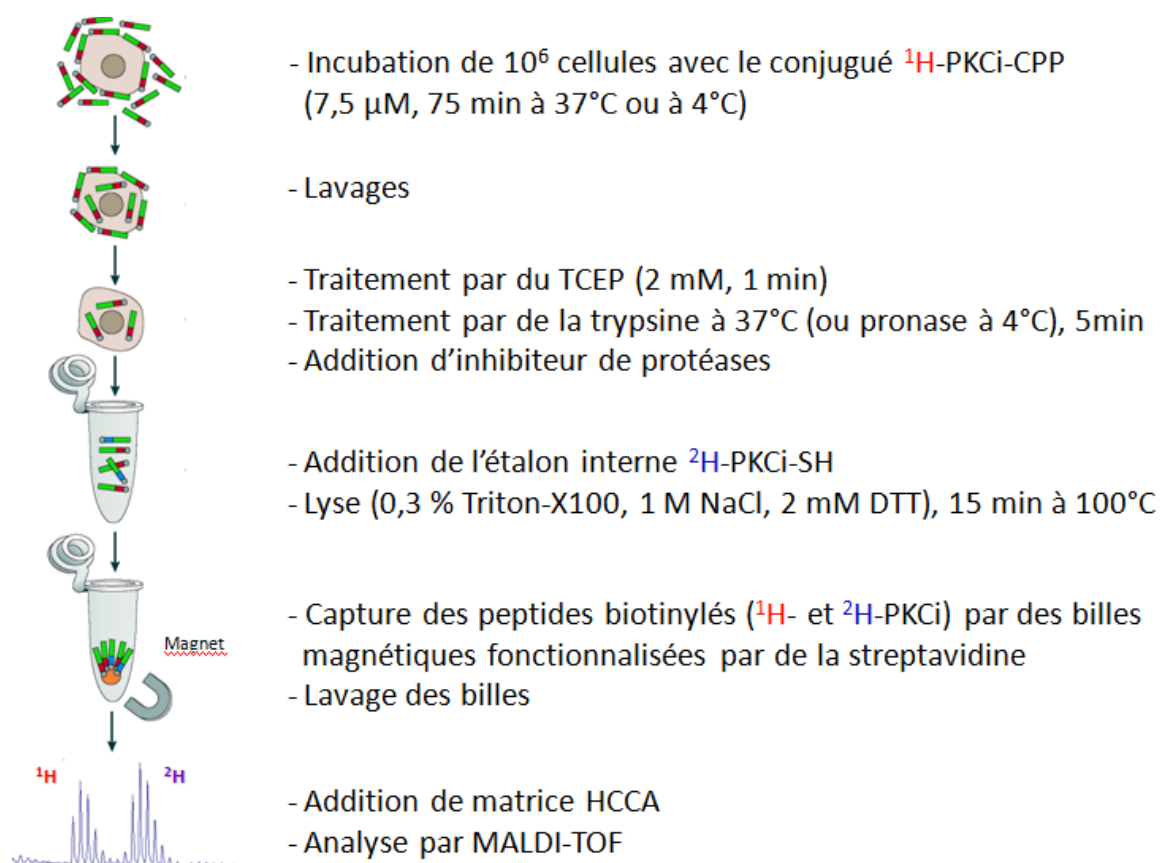


Figure 67 - Protocole de quantification de l'internalisation cellulaire par MALDI-TOF

Brièvement, après incubation des cellules adhérentes avec le conjugué dans les conditions désirées, les cellules sont lavées puis traitées avec le TCEP pour réduire les conjugués disulfure (CPP-PKCi ou adduits PKCi sur les protéines membranaires). S'ensuit une étape de digestion avec une protéase permettant de dégrader le peptide lié à la membrane des cellules et de décoller les cellules du puits. Les fragments de digestion, ayant une affinité réduite pour la membrane sont alors éliminés par lavage des cellules. Si toutefois une fraction n'était pas éliminée, elle pourrait être facilement distinguée du peptide internalisé intact dosé lors de l'analyse par MALDI-TOF. Après inhibition de la protéase, une quantité connue d'étalon interne est ajoutée aux cellules. Celles-ci sont alors lysées à 100°C en conditions réductrices. L'étape de lyse est la plus critique de tout le protocole car elle conduit à la libération des protéases intracellulaires. Le chauffage à 100°C permet leur dénaturation instantanée, évitant ainsi toute dégradation des peptides d'intérêt. Le chauffage permet également de soumettre les peptides ^1H - et ^2H -PKCi aux mêmes interactions avec les composants du lysat cellulaire, évitant de la sorte toute discrimination entre les deux peptides au moment de leur extraction. Celle-ci est réalisée par incubation du lysat avec des billes magnétiques fonctionnalisées par de la streptavidine. Toutes les espèces biotinylées (^1H - et ^2H -PKCi intacts et éventuels fragments de digestion) sont alors capturées. S'ensuivent des étapes de lavage des billes permettant l'élimination des espèces non biotinylées. Les peptides d'intérêt sont élués par brève incubation des billes avec la solution acide de matrice (HCCA). L'échantillon est analysé par spectrométrie de masse et la quantité de peptide PKCi vectorisée est déduite des signaux des peptides ^1H et ^2H -PKCi, (**Figure 68**). L'étalon interne étant soumis à la lyse, on peut aisément contrôler que les protéases intracellulaires ont été efficacement inhibées lors de l'étape de lyse cellulaire en vérifiant l'absence de fragments de digestion deutériés sur les spectres de masse.

Pour les études d'internalisation des conjugués à 37°C, la trypsine qui clive les peptides après les résidus basiques, est utilisée pour dégrader le peptide membranaire. Le PKCi étant riche en résidus basiques, la trypsine est tout à fait adaptée. Cette protéase étant peu active à basse température, pour les études d'internalisation réalisées à 4°C, la pronase (un mélange de protéases) est alors utilisée. Il a été contrôlé que le peptide PKCi était bien totalement dégradé par la trypsine (5 min à 37°C) et la pronase (5 min à 4°C) dans des expériences *in vitro*.

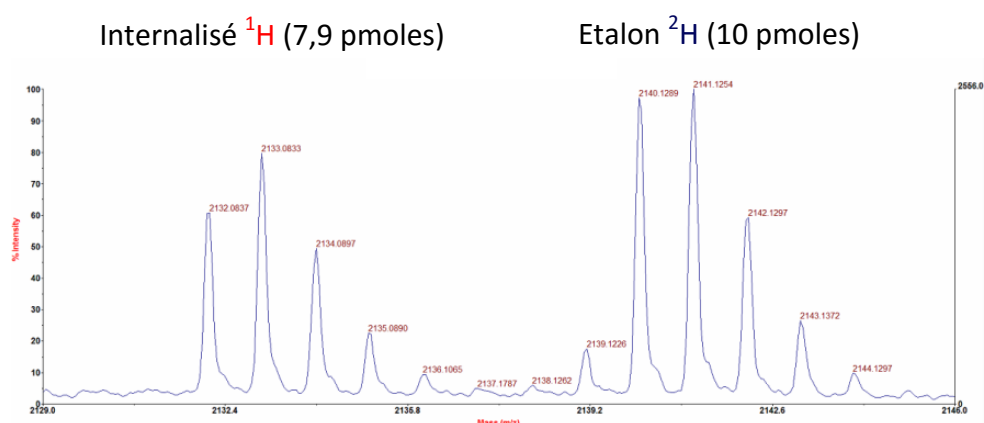


Figure 68 - Exemple de spectre de masse montrant les signaux des peptides ^1H -PKCi et ^2H -PKCi intacts : quantification des rapports des aires suite à la vectorisation du PKCi par $[R_2\text{-C}_{12}\text{-R}_2]$.

Les expériences de quantification du peptide PKCi internalisé ont toutes été réalisées au minimum deux fois de manière indépendante, chacune en triplicat. Des tests de cytotoxicité ont également été réalisés. Les résultats de ces tests sont présentés à la fin de ce chapitre. On peut cependant d'ores et déjà indiquer que les conjugués n'induisent pas de mort cellulaire dans les conditions utilisées pour le dosage par MALDI-TOF (mis à part pour $[\text{C}_{12}\text{-Pen}]$ (30 % de mort cellulaire) et dans une moindre mesure $[\text{C}_{12}\text{-R}_9]$ et $[\text{R}_9]$ (15 % de mort cellulaire)).

3. Evaluation des propriétés de vectorisation

3.1 Peptides vecteurs classiques linéaires

Nous avons d'abord évalué les efficacités de vectorisation des quatre CPP classiques linéaires Pénétratine, Tat, R_9 et R_6W_3 . Les conjugués CPP-PKCi ont été incubés pendant 75 min à 37°C avec 10^6 cellules CHO-K1 (lignée sauvage) à une concentration extracellulaire de $7,5 \mu\text{M}$ (**Figure 69**). Nous avons choisi d'étudier la pénétration cellulaire dans les CHO car il en existe des mutants déficients en GAG, permettant ainsi d'étudier l'implication des GAG dans le mécanisme d'internalisation.

On observe des différences notables entre CPP. R₉ et Tat sont peu efficaces pour le transport du peptide PKCi conduisant respectivement à 0,53 et 0,82 pmole de peptide intact dans 10⁶ cellules CHO. La Pénétratine permet la délivrance d'une quantité de peptide près de quatre fois supérieure à celle de R₉. Enfin, le CPP R₆W₃, conduit à la meilleure efficacité d'internalisation du PKCi (5,24 pmoles). Dans le cas de R₆W₃ cela correspond à une concentration intracellulaire en PKCi d'environ 5 μ M (le volume d'une cellule CHO ayant été estimé à 1 pL). Il est à noter que l'espèce très majoritairement détectée sur les spectres de masse correspond au PKCi intact. Ces valeurs sont à comparer à celles obtenues lors de l'incubation des cellules avec le PKCi non conjugué à un CPP (PKCi-SH, 0,19 pmole). Pour éviter la dimérisation du PKCi, celui-ci a été incubé avec les cellules en présence de DTT, une expérience contrôle utilisant du peptide dont la cystéine avait été préalablement alkylée par du iodoacétamide ayant donné un résultat similaire. Ainsi, R₆W₃ permet d'augmenter la concentration intracellulaire en PKCi d'un facteur 28 par rapport à la concentration obtenue en l'absence de CPP.

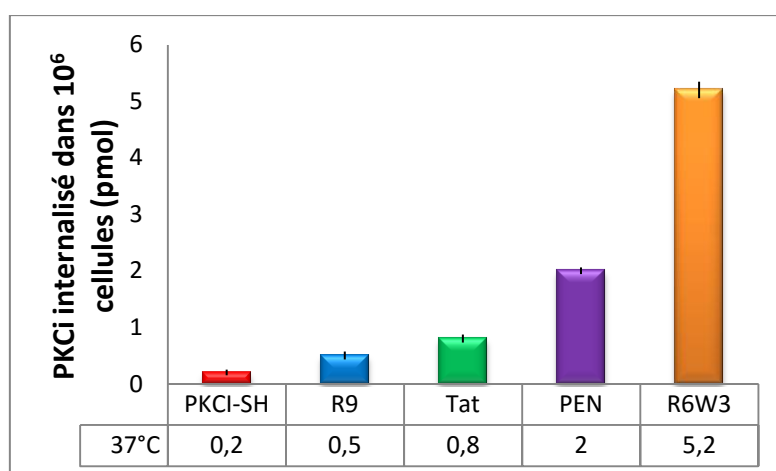


Figure 69 - Quantification du transport du peptide PKCi par différent CPP classiques dans des cellules CHO-K1 à 37°C. Les valeurs moyennes sont données, les barres d'erreurs correspondent à l'écart moyen. (10⁶ cellules incubées pendant 1h15 avec 7,5 μ M de conjugué CPP-PKCi ou PKCi-SH).

L'entrée de ces mêmes CPP non conjugués à une cargaison avait été précédemment quantifiée au laboratoire dans les mêmes conditions. Il avait alors été montré que R₉ conduisait à la concentration intracellulaire la plus élevée (\approx 7 μ M), la Pénétratine et R₆W₃

ayant des efficacités d'entrée similaires ($\approx 5 \mu\text{M}$). Une concentration intracellulaire nettement plus faible avait par contre été mesurée pour Tat ($\approx 1 \mu\text{M}$). On voit donc que la conjugaison d'une cargaison a un effet très différent sur ces CPP, affectant peu l'efficacité de R₆W₃ et Tat mais de façon significative celle de la Pénétratine et surtout de R₉.

3.2 Effet de la cyclisation de ces CPP classiques

Nous avons évalué l'impact de la cyclisation tête-queue de ces CPP sur leurs propriétés de vectorisation (**Figure 70**). Les conjugués PKCi correspondants ont été testés dans les conditions décrites précédemment, en utilisant à nouveau dans un premier temps des cellules CHO sauvages. Les vecteurs [R₉] et [Tat] donnent des résultats similaires, permettant de transporter dans 10⁶ cellules environ 1 pmole de PKCi. Les CPP [Pen] et [R₆W₃] sont plus performants, conduisant respectivement à 3,4 et 7 pmoles de peptide PKCi. Si on compare ces résultats à ceux obtenus avec les homologues linéaires, on constate que la cyclisation a un effet positif sur l'efficacité d'internalisation (augmentation d'un facteur 1,3 à 1,9). Toutefois bien que l'effet soit significatif il reste modéré.

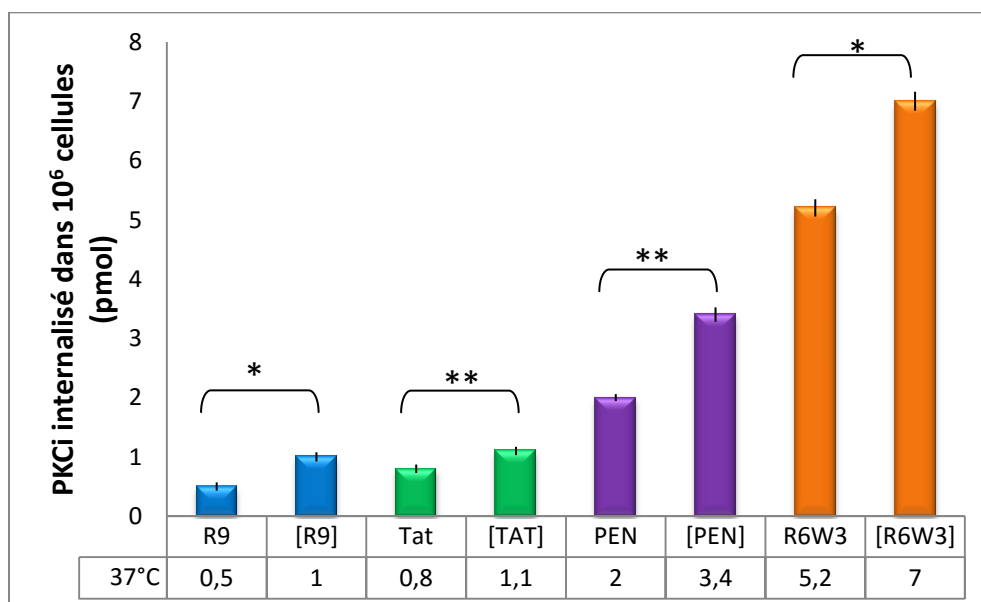


Figure 70 - Effet de la cyclisation sur l'efficacité de transport du PKCi, dans des cellules CHO-K1, à 37°C. (10⁶ cellules incubées pendant 1h15 avec 7,5 μM de conjugué). Test de Mann-Whitney, * $P < 0,05$ (significatif), ** $P < 0,01$ (très significatif)

3.3 Impact de la fonctionnalisation des CPP [R₉] et [Pen] par une chaîne lauryl.

Au laboratoire, durant la thèse de Baptiste Aussedat, l'effet de l'introduction d'un groupement lipidique sur des peptides vecteurs classiques a été évalué. Le groupement myristyl a ainsi été introduit en extrémité *N*-terminale des CPP Pen et R₉. Les valeurs obtenues suite à la vectorisation du PKCi indiquaient que la myristylation ne change pas significativement les propriétés de vectorisation de la Pénétratine. En revanche, la quantité de PKCi transportée par le CPP C₁₄-R₉ était 5 fois supérieure à celle obtenue avec R₉. Au vu de ses résultats, il avait été conclu que l'impact de la myristylation sur les propriétés d'internalisation d'un CPP, était dépendante de sa séquence peptidique. Ces informations nous ont poussés à synthétiser une version du CPP [R₉] acylé par une chaîne d'acide gras (lauryl), présenté ci-dessous.

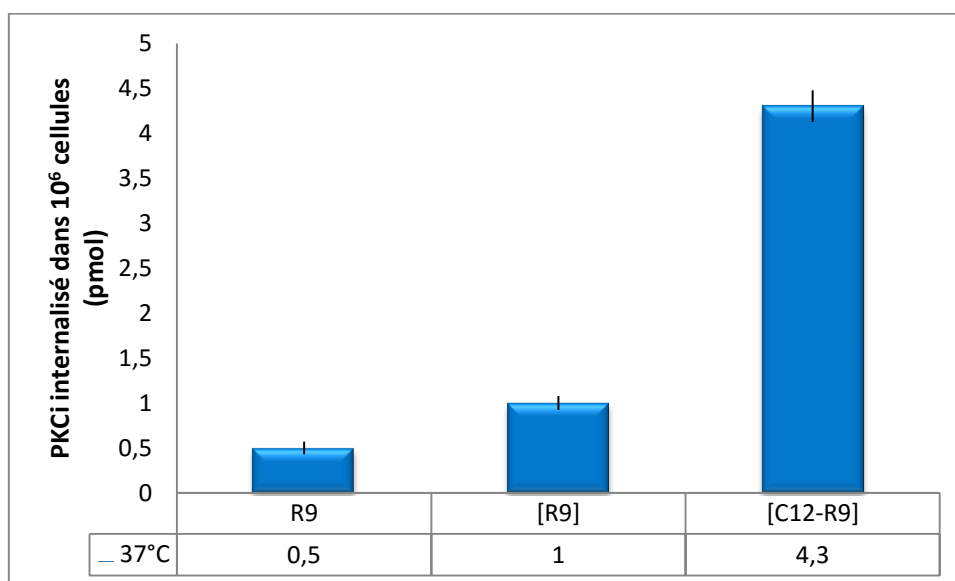


Figure 71 - Effet de la laurylation de [R₉] sur l'efficacité d'internalisation du PKCi, dans des cellules CHO-K1, à 37°C. (10⁶ cellules ont été incubées pendant 1h15 à 37°C avec 7,5 μM de conjugué)

De la même manière que pour la version linéaire, la fonctionnalisation par une chaîne lipidique de R₉ cyclique augmente de façon remarquable son habilité à franchir les

membranes cellulaires. La combinaison de la cyclisation et de l'acylation conduit dans le cas du CPP R₉ à une amélioration d'un facteur 8 de la quantité de PKCi transportée. Nous avons également testé l'effet de cette modification sur les propriétés de [Pen]. La version linéaire ne semblait pas être affectée par une acylation en position *N*-terminale, mais l'effet pourrait être différent sur la structure contrainte par cyclisation (**Figure 72**).

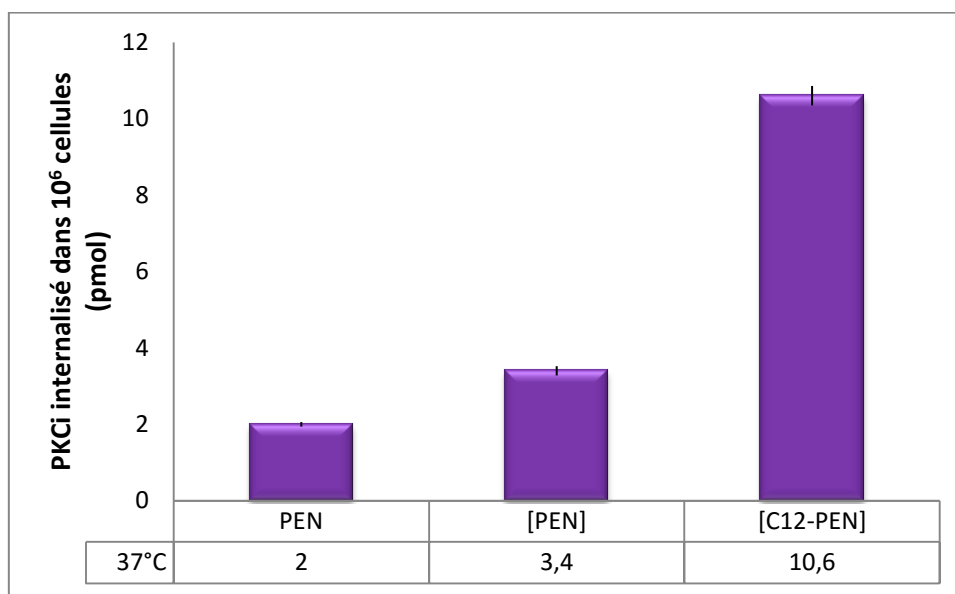


Figure 72 - Effet de la laurylation de [Pen] sur l'efficacité d'internalisation du PKCi, dans des cellules CHO-K1, à 37°C. (10^6 cellules ont été incubées pendant 1h15 à 37°C avec 7,5 μ M de conjugué)

On observe effectivement que l'incorporation d'une chaîne lauryl sur la séquence cyclique de la Pénétratine induit cette fois-ci une augmentation notable de la quantité de peptide internalisé. Il est à noter que dans ce cas, on atteint une concentration intracellulaire en PKCi ($\approx 10 \mu$ M) supérieure à la concentration à laquelle les conjugués ont été incubés avec les cellules. Ce résultat fait de [C_{12} -Pen], le peptide le plus efficace que nous avons testé dans ce projet pour la vectorisation du PKCi. Cependant, on constate également un effet cytotoxique de ce conjugué à cette concentration de 7,5 μ M (voir partie *Etude de la survie cellulaire*).

3.4 Etude du mécanisme d'entrée des CPP classiques linéaires et cycliques

Des expériences d'internalisation ont été effectuées en parallèle sur les cellules CHO-K1 à 4°C, température à laquelle l'endocytose est inhibée, pour tester si les conjugués sont capables de pénétrer dans les cellules par translocation directe (**Figure 73**). Il est cependant possible que la translocation soit moins importante à 4°C par rapport à 37°C, du fait de la fluidité réduite de la membrane à cette température.

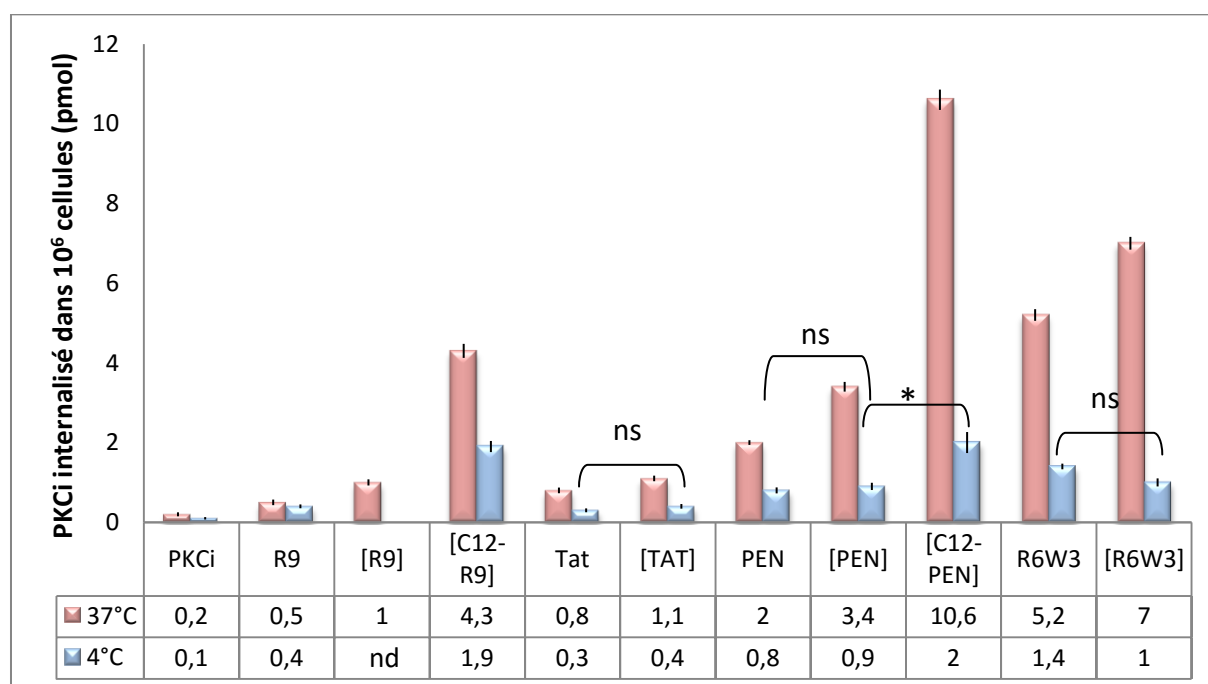


Figure 73 – Etude du mécanisme d'entrée. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur des cellules CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur des CHO-K1. nd = non déterminée. (Les cellules ont été incubées pendant 1h15 à 37°C avec 7,5 μ M de composé). Pour dégrader le peptide membranaire un traitement TCEP + trypsine a été utilisé à 37°C, et TCEP + pronase à 4°C. On note que dans les deux conditions le peptide PKCi-SH est efficacement dégradé. Test de Mann-Whitney, * $P < 0,05$. ns : non significatif.

On constate que les deux dérivés [C₁₂-R₉] et [C₁₂-Pen] pour lesquels nous avons combiné cyclisation et acylation conduisent à l'entrée la plus efficace à 4°C. Dans les deux cas on

atteint une concentration intracellulaire en PKCi de l'ordre de 2 μ M, qui n'est pas négligeable. Les conjugués pénétrant par translocation directe de la membrane plasmique vont dans un premier temps atteindre le cytosol, ils peuvent ensuite éventuellement se redistribuer dans d'autres compartiments de la cellule. La seule cyclisation des CPP n'a par contre aucun effet sur leur entrée par translocation directe. Ainsi, l'entrée plus efficace à 37°C de [Pen], [R₆W₃] et [Tat] par rapport à leur homologue linéaire est due à une internalisation accrue par une voie endosomale.

Nous avons estimé la contribution respective de l'endocytose et la translocation dans l'internalisation de chacun des conjugués en soustrayant la valeur de PKCi vectorisée à 4°C (translocation seule) à la valeur obtenue à 37°C (translocation + endocytose) (**Figure 74**). Nous sommes bien sur conscients que cette évaluation peut être biaisée, notamment par le fait que l'efficacité de translocation peut différer à 4°C et 37°C. Cette représentation permet cependant d'identifier la voie principale d'internalisation dans la cellule pour un conjugué donné. On voit ainsi que seul le conjugué R₉ utilise comme voie d'entrée principale la translocation. L'endocytose et la translocation semblent contribuer de façon équivalente à l'internalisation de [C12-R₉]. Tous les autres conjugués par contre pénètrent dans les cellules principalement par endocytose.

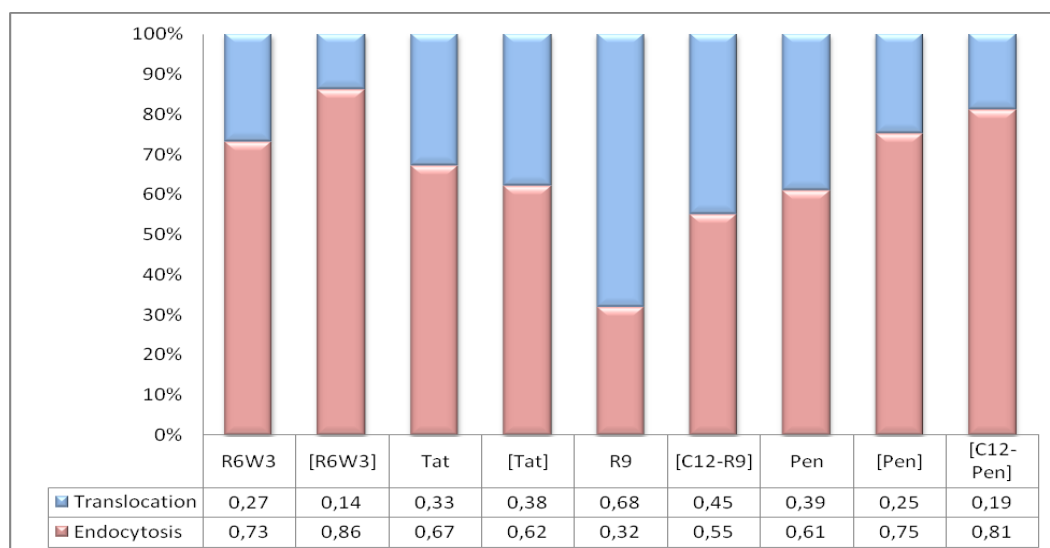


Figure 74 – Estimation de la contribution respective de l'endocytose et de la translocation directe dans le mécanisme d'internalisation des conjugués sur des cellules CHO-K1.

Pour évaluer la participation des GAG de surface dans l'entrée de ces conjugués, la vectorisation a également été quantifiée à 37°C dans des cellules mutantes, CHO-pgsA745, déficientes en héparanes et chondroïtines sulfate (**Figure 75**). Il faut souligner que ces cellules ne sont pas totalement dépourvues en GAG (~ 10 % de GAG restant par rapport aux CHO-K1). Nous avons constaté une forte baisse de l'entrée des conjugués dans les CHO-745 par rapport aux CHO sauvages. Ces résultats indiquent que l'entrée de tous ces composés est dépendante des GAG de surface. L'implication des GAG est plus importante pour les dérivés cycliques que pour leurs homologues linéaires. La cyclisation semble donc favoriser l'interaction avec les GAG ou leur recrutement.

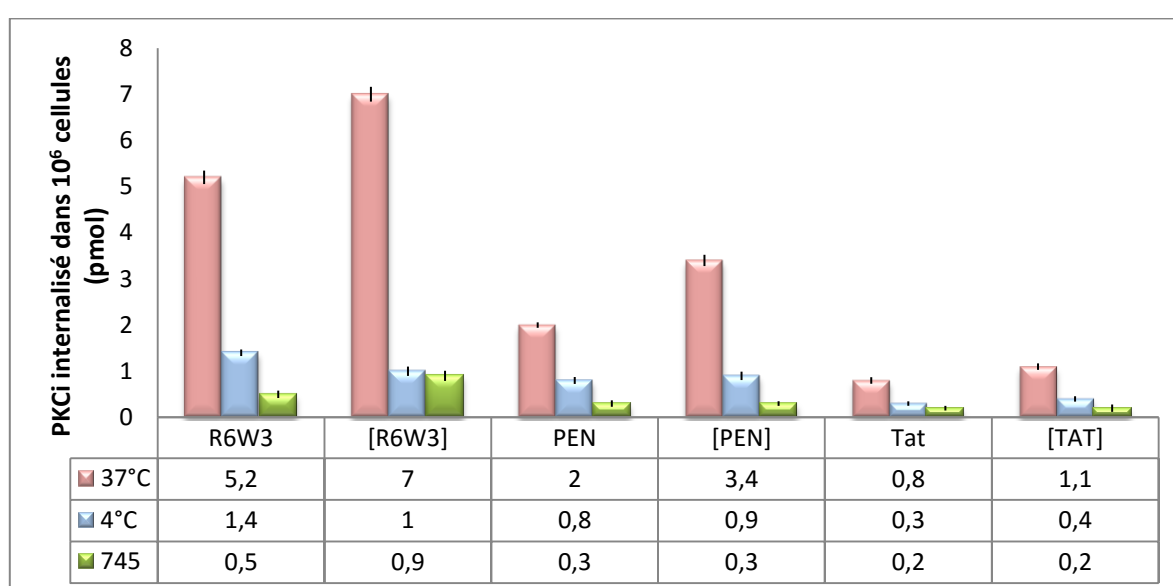


Figure 75 – Etude du mécanisme d'entrée. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur 10⁶ CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur 10⁶ CHO-K1. En vert, est représentée la quantité de peptide internalisé à 37°C sur 10⁶ CHO-745. Dans tous les cas, les cellules sont incubées pendant 75 min avec 7,5 µM de conjugué.

4. Etude de transporteurs oligo-arginine cycliques fonctionnalisés par une chaîne d'acide gras

Je me suis intéressé plus particulièrement dans ce projet à la conception de CPP comportant un domaine cationique cyclique fonctionnalisé par une chaîne carbonée. Nous avons examiné l'impact de différents paramètres structuraux : la nature et position de la chaîne lipidique et la taille du domaine peptidique.

4.1 Etude des transporteurs lipopeptidiques: influence de la taille de la chaîne aliphatique

L'influence de la longueur de la chaîne lipidique a été examinée sur des CPP cycliques comportant un domaine cationique de taille réduite (4 arginines) (**Tableau 9**). L'entrée de ces composés a été quantifiée sur CHO-K1, à 37°C et 4°C. J'ai dosé en parallèle de ces expériences le dérivé linéaire C_{12} -R₄ développé précédemment au laboratoire (**Figure 76**).¹¹²

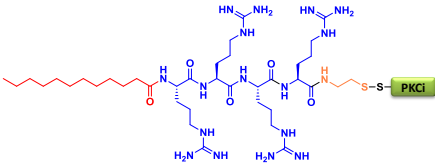
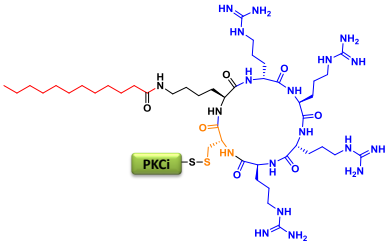
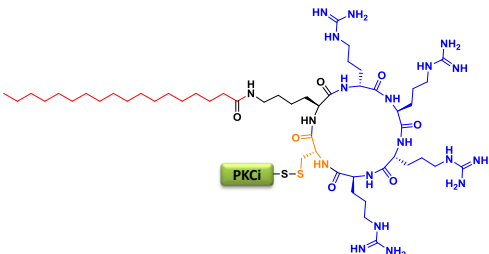
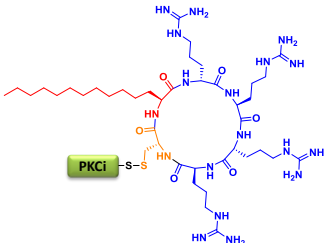
Conjugués lipopeptidiques		Abréviations
C_{12} -R ₄ -S-S-PKCi-H		C_{12} -R ₄
[K($C_{12:0}$)-R ₄]-S-S-PKCi-H		[K($C_{12:0}$)-R ₄]
[K($C_{18:0}$)-R ₄]-S-S-PKCi-H		[K($C_{18:0}$)-R ₄]
[C_{12} -R ₄]-S-S-PKCi-H		[C_{12} -R ₄]

Tableau 9 – Structures et abréviations des conjugués lipopeptidiques à chaîne lipidique variable.

La cyclisation de C_{12} -R₄ permet une faible augmentation de l'efficacité d'internalisation à 37°C (d'un facteur 1,4), la translocation à 4°C étant deux fois plus efficace pour le CPP cyclique. Les trois conjugués cycliques [C_{12:0}]-R₄, [K(C_{12:0})-R₄] et [K(C_{18:0})-R₄] donnent des résultats similaires à 37°C. En revanche, la nature et le mode de greffage de la chaîne aliphatique influent significativement sur la capacité de translocation du CPP. Dans la séquence de [K(C_{12:0})-R₄], la laurylation est réalisée sur l'amine ε d'une lysine, tandis que dans la construction [C₁₂-R₄] qui conduit à la translocation la plus efficace, la chaîne lauryl est introduite *via* l'acide 2-amino-tétradécanoïque (**Figure 76**). Ce résultat a conditionné notre choix de fonctionnalisation des CPP suivants.

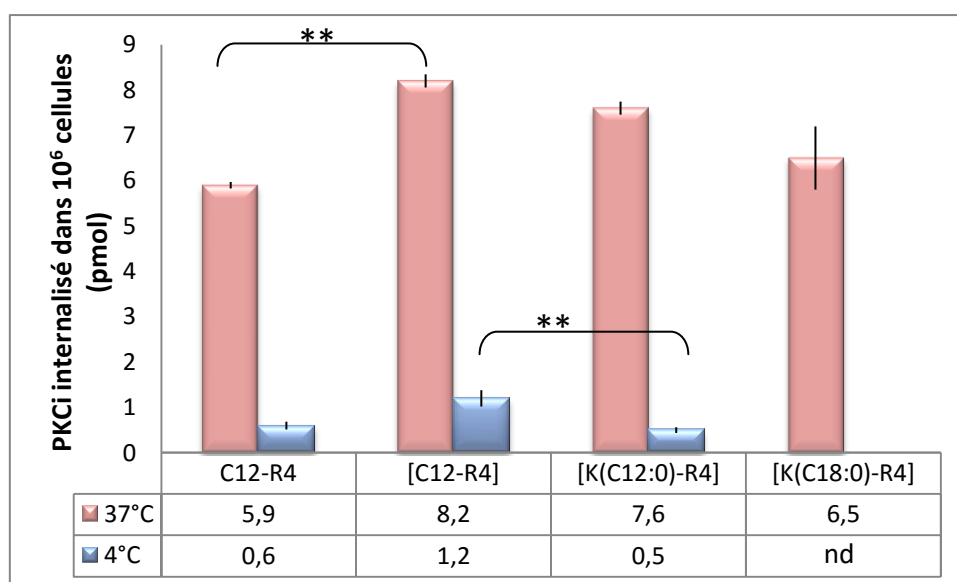
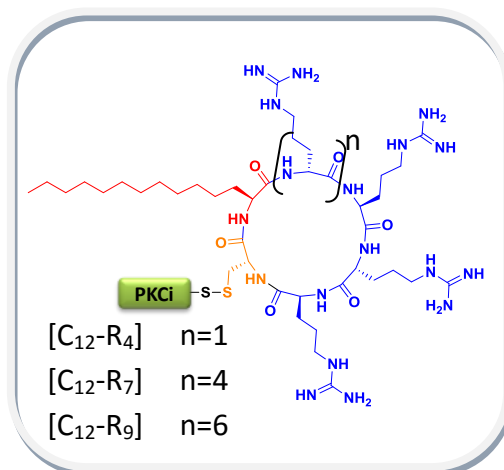


Figure 76 – Effet de la longueur de la chaîne lipidique sur le mécanisme d'entrée. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur des cellules CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur des CHO-K1. nd = non déterminée. (Les cellules ont été incubées pendant 1h15 avec 7,5 μ M de conjugué). Test de Mann-Whitney, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

4.2 Etude des transporteurs lipopeptidiques : influence du nombre d'arginines

Nos données montrent qu'en série lipopeptidique cyclique, le nombre de résidus Arg joue un rôle important. A 37°C, [C₁₂-R₄] conduit à une concentration intracellulaire de PKCi

pratiquement deux fois plus élevée que $[C_{12}\text{-R}_7]$ et $[C_{12}\text{-R}_9]$ (qui donnent tous deux des résultats identiques) (**Figure 77**). Ce résultat était inattendu car en série linéaire, l'effet inverse avait été observé dans le laboratoire et aussi dans la littérature. L'étude de Pham avait en effet montré que le vecteur R_7 fonctionnalisé par un acide myristique est plus performant que le CPP R_4 myristoylé.¹¹⁰ L'étude



de l'internalisation des dérivés cycliques à 4°C a apporté des informations intéressantes. Lorsque l'on accroît la taille du cycle en augmentant le nombre de résidus Arg, la quantité de conjugué pénétrant par translocation directe augmente (comparaison de $[C_{12}\text{-R}_4]$ et $[C_{12}\text{-R}_7]$). L'ajout de trois à cinq résidus Arg au sein du cycle favorise donc la translocation directe mais a l'effet inverse sur l'endocytose. Ainsi, on peut estimer que les deux voies ont une contribution équivalente dans l'entrée de $[C_{12}\text{-R}_7]$ à 37°C, alors que $[C_{12}\text{-R}_4]$ s'internalise majoritairement par endocytose (à $\approx 85\%$).

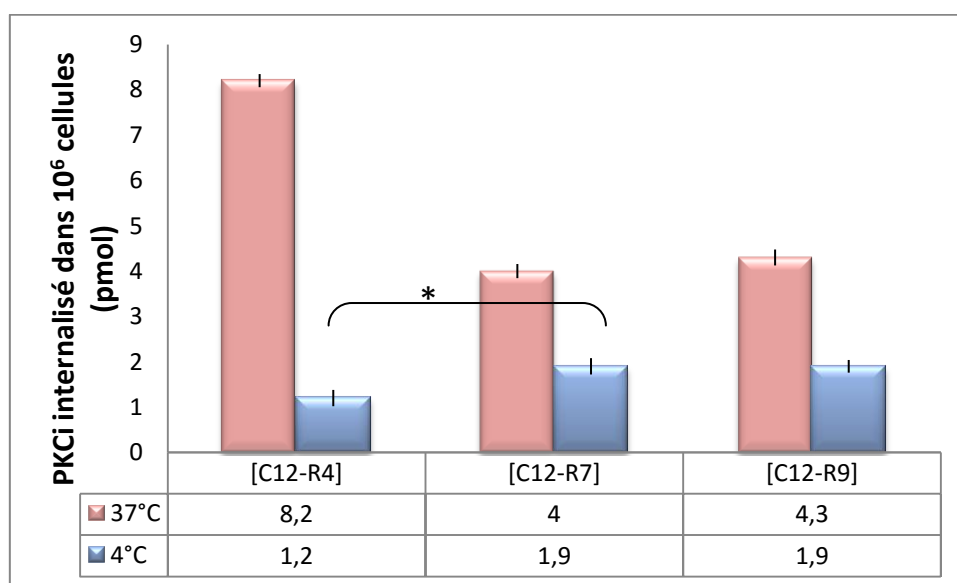


Figure 77 – Influence de la variation du nombre d'arginine sur l'efficacité d'internalisation. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur des cellules CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur des CHO-K1. (Les cellules ont été incubées pendant 1h15 avec 7,5 μM de conjugué). Test de Mann-Whitney, * $P < 0,05$.

4.3 Etude des transporteurs lipopeptidiques : influence de la position de la chaîne lipidique

Les expériences précédentes nous avaient permis de définir la taille optimale du domaine peptidique et le meilleur mode d'insertion de la chaîne lipidique. Nous nous sommes interrogés à ce stade sur l'effet que pouvait avoir le changement de position de la chaîne lauryl au sein du cycle peptidique. Pour ce faire, la position a été modifiée, donnant lieu aux vecteurs représentés ci-dessous.

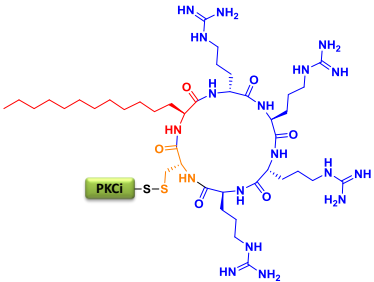
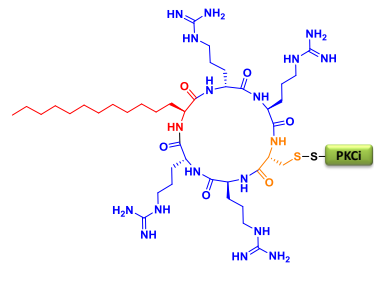
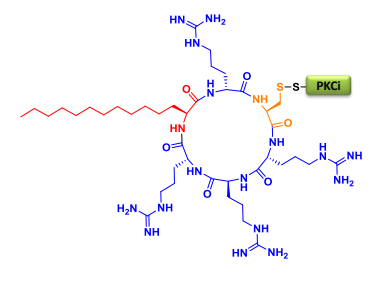
Conjugués lipopeptidiques		Abréviations
$[C_{12}-R_4]-S-S-PKCi-H$		$[C_{12}-R_4]$
$[R_2-C_{12}-R_2]-S-S-PKCi-H$		$[R_2-C_{12}-R_2]$
$[R_3-C_{12}-R]-S-S-PKCi-H$		$[R_3-C_{12}-R]$

Tableau 10 – Structures et abréviations des conjugués lipopeptidiques

La variation de la position du groupement lauryl au sein du domaine cationique cyclique peut modifier significativement l'efficacité de vectorisation (**Figure 78**). Les CPP ayant soit 4

arginines contigües (cas du peptide $[C_{12}\text{-}R_4]$) soit des Arg groupées par paires (peptide $[R_2\text{-}C_{12}\text{-}R_2]$), donnent le même résultat. La concentration intracellulaire en PKCi atteinte en 75 minutes est de l'ordre de 8 μM pour une concentration extracellulaire en conjugué de 7,5 μM . Il est important de signaler que les vecteurs $[R_2\text{-}C_{12}\text{-}R_2]$ et $[C_{12}\text{-}R_4]$ sont les plus efficaces dans notre série de lipopeptides poly-Arg. Une répartition des résidus Arg de type « 3 + 1 » (cas du peptide $[R_3\text{-}C_{12}\text{-}R]$), ne permet quant à elle, que l'internalisation de 3 pmoles de PKCi dans les cellules. En revanche, cette baisse d'efficacité ne semble affecter que le passage par endocytose. A 4°C, le vecteur $[R_3\text{-}C_{12}\text{-}R]$ est aussi efficace que les deux autres analogues.

L'étude réalisée précédemment au laboratoire sur les CPP linéaires de type $C_n\text{-}R_4$ avait montré que leur auto-association, dépendante dans ce cas de la longueur de la chaîne carbonée, jouait un rôle critique dans leur mécanisme d'entrée. Il serait intéressant de réaliser des études de DLS sur nos dérivés cycliques pour déterminer s'ils possèdent ou non un caractère auto-associatif. Ces études seront réalisées prochainement et pourront peut-être nous aider à comprendre l'effet important observé ici lors du changement de position de la chaîne lipidique.

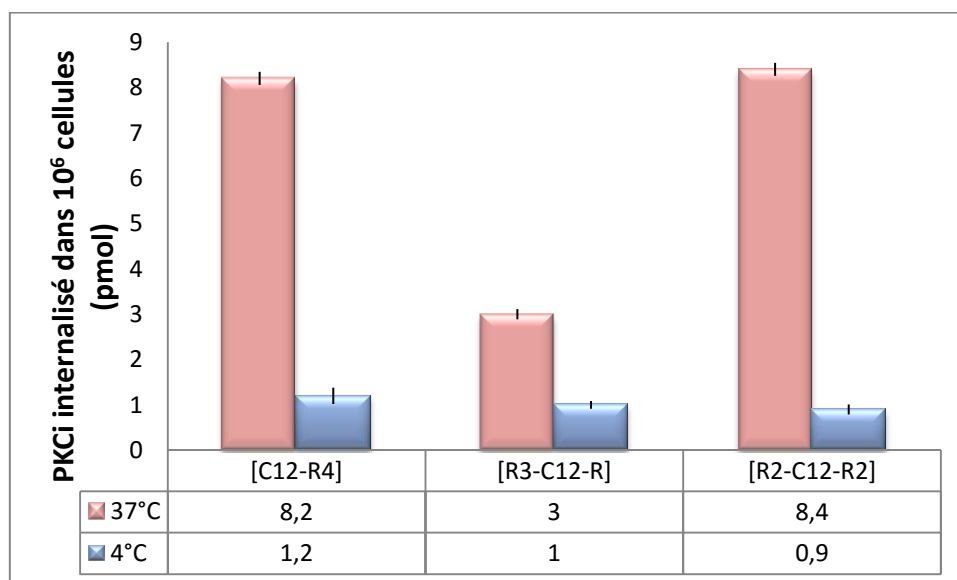


Figure 78 – Variation de la position de la chaîne lauryl sur l'efficacité d'internalisation. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur des cellules CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur des CHO-K1.

4.4 Etude des transporteurs lipopeptidiques : effet de la substitution de la chaîne lauryl par des aminoacides aromatiques

Nous avons par la suite synthétisé les CPP [W-R₄] et [F-R₄] comportant un tryptophane ou une phénylalanine à la place du dérivé lauryl (acide 2-amino-tétradécanoïque) (**Tableau 11**). Nous voulions ainsi voir si la chaîne lauryl pouvait être remplacée par un acide aminé naturel hydrophobe aromatique tout en conservant une bonne efficacité d'entrée. Le CPP [R₄] pourrait apparaître comme un peptide de référence intéressant dans cette étude. Nous n'avons cependant pas souhaité le synthétiser étant donné les difficultés rencontrées lors de la purification de l'analogue cyclique purement cationique [R₉]. Les résultats obtenus pour les CPP [W-R₄] et [F-R₄] sont présentés sur la Figure 79, et en référence les valeurs obtenues pour le peptide [C₁₂-R₄] ont été rappelées.

Conjugués lipopeptidiques	Abréviations
[W-R ₄]-S-S-PKCi-H	[W-R ₄]
[F-R ₄]-S-S-PKCi-H	[F-R ₄]
[C ₁₂ -R ₂ -F-R ₂]-S-S-PKCi-H	[C ₁₂ -R ₂ -F-R ₂]

Tableau 11 – Structures et abréviations des conjugués lipopeptidiques

Les deux nouveaux CPP sont nettement moins performants que $[C_{12}\text{-R}_4]$: on observe une chute drastique de l'internalisation, d'un facteur 7 pour $[\text{W-R}_4]$ et 13 pour $[\text{F-R}_4]$. La chaîne lauryl semble donc contribuer énormément au processus de pénétration cellulaire. Le conjugué $[\text{W-R}_4]$ pénètre mieux dans les cellules que $[\text{F-R}_4]$. Il est intéressant de voir que le Trp, même au sein de cette séquence minimisée, donne à nouveau de meilleurs résultats que le résidu Phe (comme dans le cas de la Pénéttrative). Il est à noter que $[\text{W-R}_4]$ est aussi efficace à 37°C que les CPP cycliques $[\text{Tat}]$ et $[\text{R}_9]$ à 37°C, mais pas à 4°C.

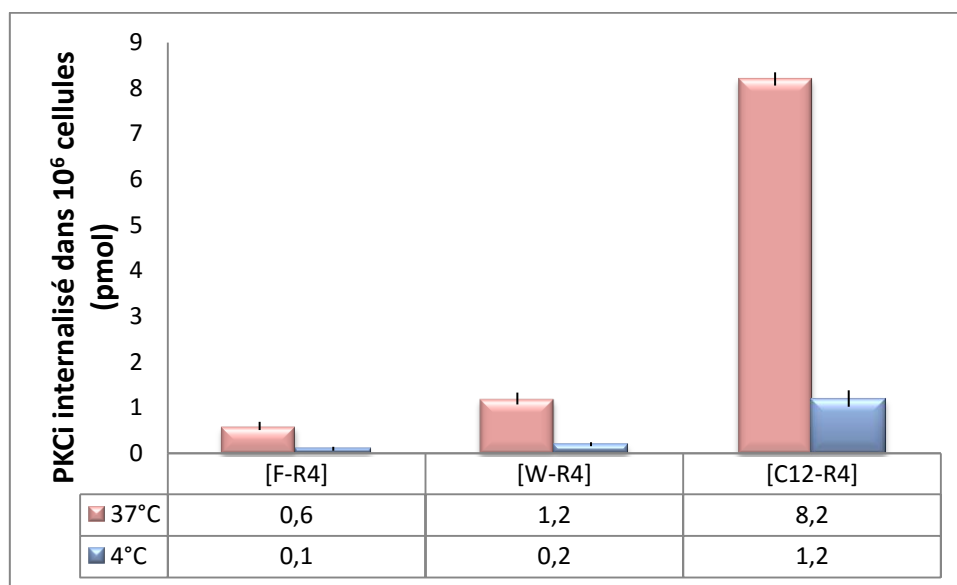


Figure 79 – Impact de la substitution de la chaîne lauryl par des acides aminés aromatiques sur l'efficacité d'internalisation. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur des cellules CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur des CHO-K1.

En parallèle de cette étude, nous avons voulu évaluer l'effet d'une augmentation de la taille du cycle peptidique en incorporant cette fois-ci un résidu non cationique (Phe). Le vecteur $[\text{C}_{12}\text{-R}_2\text{-F-R}_2]$ présenté dans le Tableau 11, a ainsi été comparé aux CPP $[\text{R}_2\text{-C}_{12}\text{-R}_2]$ et $[\text{C}_{12}\text{-R}_7]$ présentés précédemment. Notons, que le résidu Phe a été introduit de façon à garder une distribution par paires des résidus Arg qui était apparue comme optimale. Les données montrent que l'augmentation de la taille du cycle peptidique par incorporation d'un résidu Phe diminue la quantité de PKCi transporté dans les cellules par endocytose

(comparaison de $[R_2-C_{12}-R_2]$ et $[C_{12}-R_2-F-R_2]$). On observe donc le même effet que lors de l'incorporation de résidus basiques supplémentaires (comparaison de $[R_2-C_{12}-R_2]$ et $[C_{12}-R_7]$) (**Figure 80**). A 4°C, la situation est différente. Nous avons vu précédemment que l'augmentation de la taille du cycle par incorporation de résidus Arg améliorait significativement l'entrée par translocation directe. A nombre de résidus cationiques constant, une augmentation de la taille du cycle peptidique n'a par contre pas d'effet significatif sur la translocation directe (comparaison de $[C_{12}-R_2-F-R_2]$ et $[R_2-C_{12}-R_2]$ à 4°C).

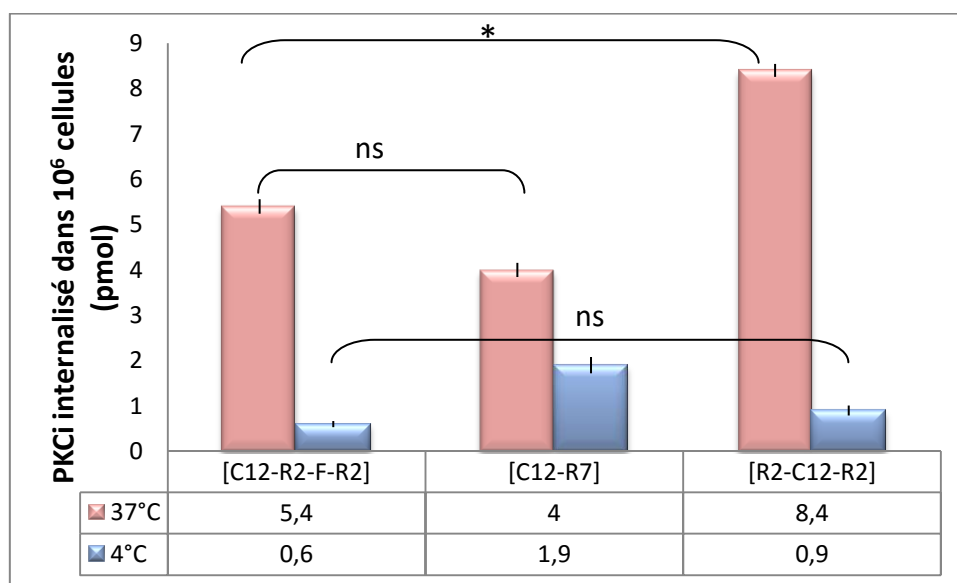


Figure 80 – Impact de la taille du cycle sur l'efficacité d'internalisation. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur des cellules CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur des CHO-K1. Test de Mann-Whitney, * $P < 0,05$. ns : valeurs non significatives.

4.5 Etude des transporteurs lipopeptidiques : évaluation de la participation des GAG de surface dans le mécanisme d'entrée

L'évaluation de la participation des GAG de surface dans le mécanisme d'internalisation des conjugués a été réalisée, comme précédemment, en comparant à 37°C l'internalisation dans les cellules sauvages et déficientes en GAG (rappelons que ces cellules comportent

encore environ 10 % de GAG par rapport aux CHO-K1). Pour cette étude, seuls certains vecteurs qui nous semblaient intéressants ont été évalués incluant: les CPP cycliques [R₃-C₁₂-R], [R₂-C₁₂-R₂], [C₁₂-R₂-F-R₂], [C₁₂-R₇], [C₁₂-R₄] et le vecteur linéaire C₁₂-R₄. Les données montrent une forte baisse de l'efficacité d'entrée de tous les conjugués dans les cellules mutantes, montrant l'implication des GAG dans le mécanisme d'internalisation (**Figure 81**). On constate cependant des différences dans leur capacité d'utiliser une voie d'internalisation GAG-dépendante. [C₁₂-R₄] et [R₂-C₁₂-R₂] semblent conduire à l'interaction la plus efficace avec les GAG et la comparaison avec leur analogue linéaire montre que la cyclisation favorise cette interaction. Les résultats indiquent par ailleurs que l'endocytose moins efficace des composés [R₃-C₁₂-R], [C₁₂-R₇] et [C₁₂-R₂-F-R₂] par rapport à [R₂-C₁₂-R₂] et [C₁₂-R₄] mentionnée précédemment est due à une interaction moins bonne avec les GAG. La taille du cycle peptidique riche en résidus Arg et la position de la chaîne lipidique sont donc des paramètres importants pour une internalisation cellulaire dépendante des GAG.

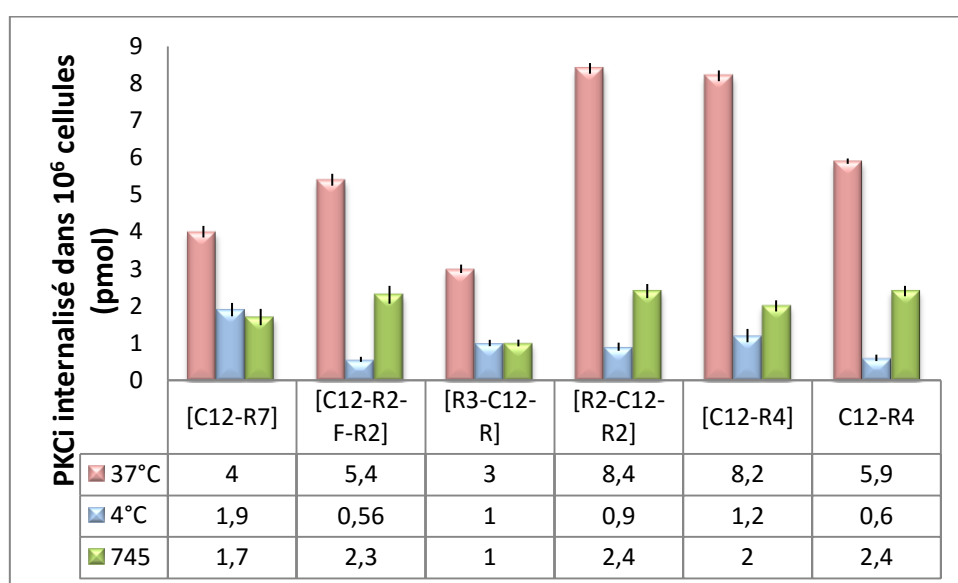


Figure 81 – Etude du mécanisme d'entrée. En rouge, est représentée la quantité de peptide PKCi internalisé à 37°C sur des cellules CHO-K1, en bleu, la quantité de peptide internalisé à 4°C sur des CHO-K1. En vert, est représentée la quantité de peptide internalisé à 37°C sur des cellules CHO-745 déficientes en GAG.

Toutes les valeurs obtenues lors de l'évaluation des propriétés de vectorisation de nos différents peptides sont rassemblées sur la Figure 82. Il est à noter qu'aucune

dégradation du PKCi n'a été détectée par MALDI-TOF lors de sa vectorisation par ces différents vecteurs (**Figure 83**). Dans la série des lipo-Arg₄, les vecteurs les plus efficaces sont [C₁₂-R₄] et [R₂-C₁₂-R₂] qui permettent d'augmenter la concentration intracellulaire en peptide PKCi d'un facteur 44 par rapport au PKCi libre. De manière générale, la cyclisation combinée à la laurylation des transporteurs peptidiques a permis d'améliorer de manière significative leur capacité d'internalisation. La méthode de quantification par MALDI-TOF, nous a permis de différencier les vecteurs selon leur capacité à transporter une cargaison par quantification globale du peptide intact internalisé. En revanche, ces résultats ne nous renseignent pas sur la localisation subcellulaire du composé transporté. Des analyses par microscopie confocale vont être réalisées très prochainement pour compléter cette étude. Nous utiliserons le protocole décrit par Dupont *et al.* qui permet de révéler le peptide PKCi intracellulaire biotinylé par de la streptavidine fluorescente après fixation au paraformaldéhyde et perméabilisation des cellules (le peptide lié à la membrane étant préalablement piégé par de l'avidine non marquée).¹⁵⁵

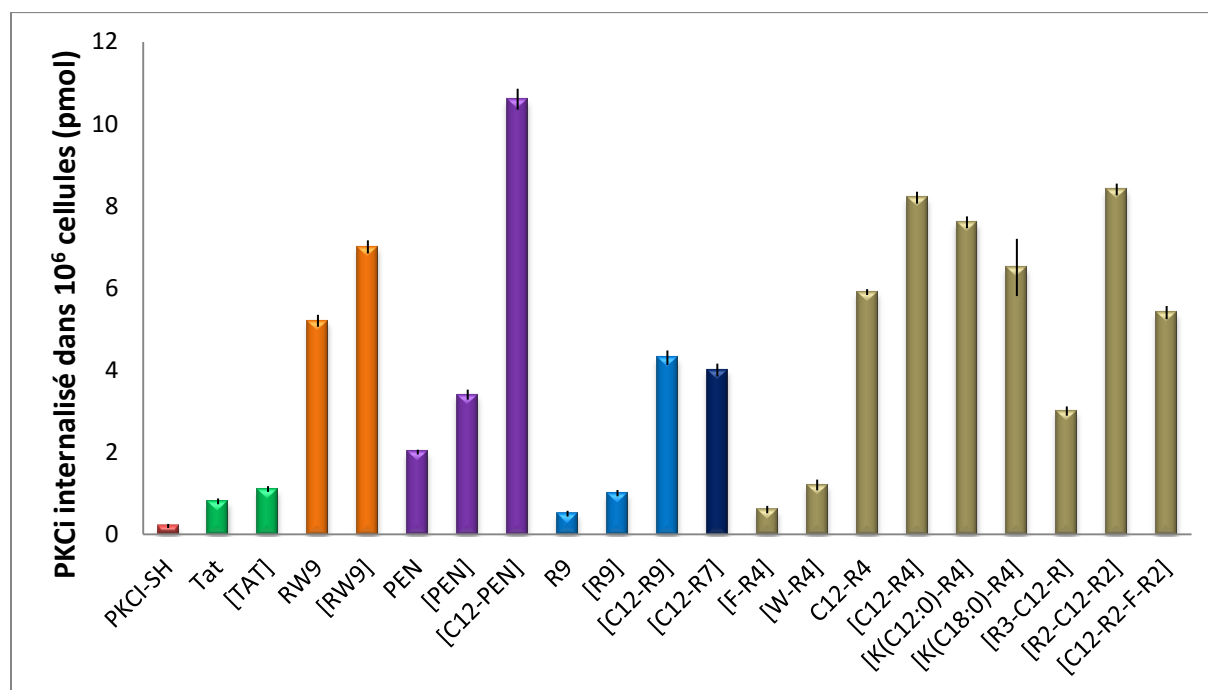


Figure 82 – Quantité de PKCi quantifiée suite à l'internalisation des conjugués, dans 10⁶ cellules CHO-K1 à 37°C.

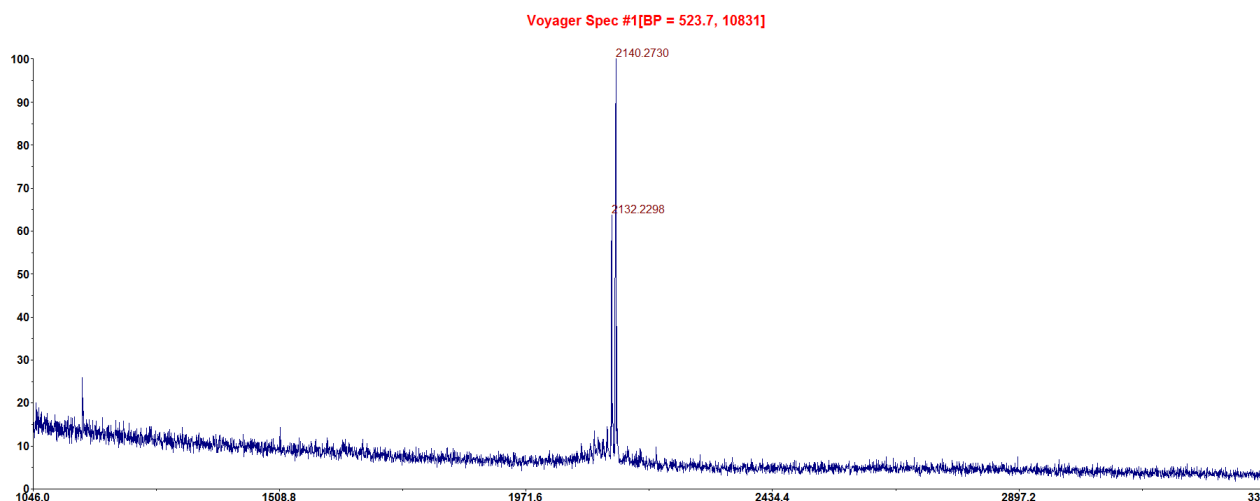


Figure 83 – Spectre de masse obtenu pour l'internalisation du conjugué $[C_{12}\text{-}R_2\text{-}F\text{-}R_2]\text{-PKCi}$, dans 10^6 cellules CHO-K1 à 37°C.

5. Etude de la survie cellulaire

La survie cellulaire en présence de nos différents conjugués a été étudiée pour deux raisons. La première est de valider les résultats de quantification en prouvant que le nombre de cellules étudiées lors de l'internalisation (10^6) ne varie pas au cours du temps à cause d'un effet cytotoxique induit par le conjugué. La deuxième est de prouver que nos transporteurs liés au PKCi sont transposables à une utilisation courante sur culture cellulaire.

5.1 Principe du test de viabilité cellulaire

Nous avons étudié la cytotoxicité de nos conjugués en utilisant le test CCK8. Le cell counting kit-8 est un test colorimétrique sensible, qui permet la mesure de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité. Le principe est basé sur la réduction du sel de tétrazolium (WST-8) (ajouté au milieu extracellulaire) en formazan au contact des cellules vivantes. Le formazan est un produit de couleur orange, soluble dans le milieu de culture. La concentration en formazan peut être mesurée par colorimétrie et son abondance directement reliée au nombre de cellules vivantes.

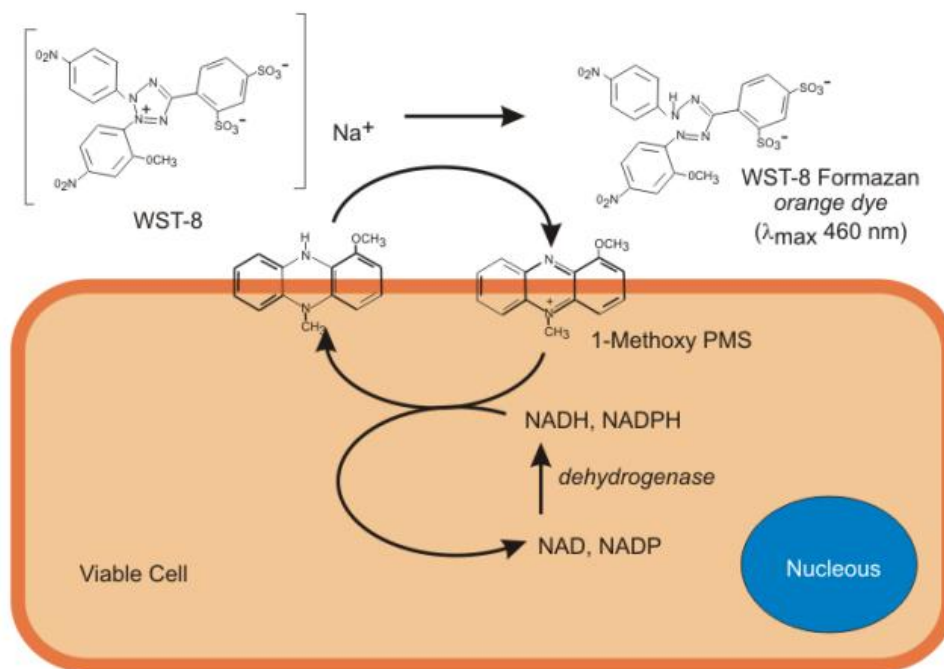


Figure 84 – Principe du test de cytotoxicité CCK-8. Source :

<http://www.biotek.com/resources/articles/cytotoxicity-assay.html>

5.2 Etude de la cytotoxicité

Les cellules CHO-K1 (20 000 ou 40 000 cellules/puits) ont été incubées pendant 75 min à 37°C avec les conjugués à la concentration de 7,5 μ M. Après élimination du milieu extracellulaire, les cellules sont incubées pendant 2h avec le réactif WST-8 avant lecture des plaques à 460 nm. Chaque expérience a été réalisée deux fois, en triplicat. Les résultats sont présentés ci-dessous. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les deux densités en cellules.

Pour la majorité des conjugués, le pourcentage de survie cellulaire est supérieur à 96 % à l'exception des composés [R₉], [C₁₂-R₉] et [C₁₂-Pen]. Les conjugués cycliques [R₉] et [C₁₂-R₉] conduisent à environ 15 % de mortalité cellulaire, tandis que la version linéaire de R₉ conjuguée au PKCi n'induit aucune cytotoxicité. Cette toxicité est sans doute due à la cyclisation du CPP, puisque la laurylation de [R₉] n'aggrave pas la situation. Mais cet effet est spécifique à R₉. En effet les vecteurs cycliques [Pen] et [R₆W₃] ne provoquent aucune mort cellulaire une fois conjugués au PKCi. En revanche, dans le cas de la Pénétratine cyclique,

l'incorporation de la chaîne lipidique diminue la survie cellulaire à 69 %. Cette toxicité est associée à une augmentation significative de l'efficacité d'internalisation. Nous n'avons pas déterminé si la toxicité provient de la formation de pores dans la membrane par le CPP.

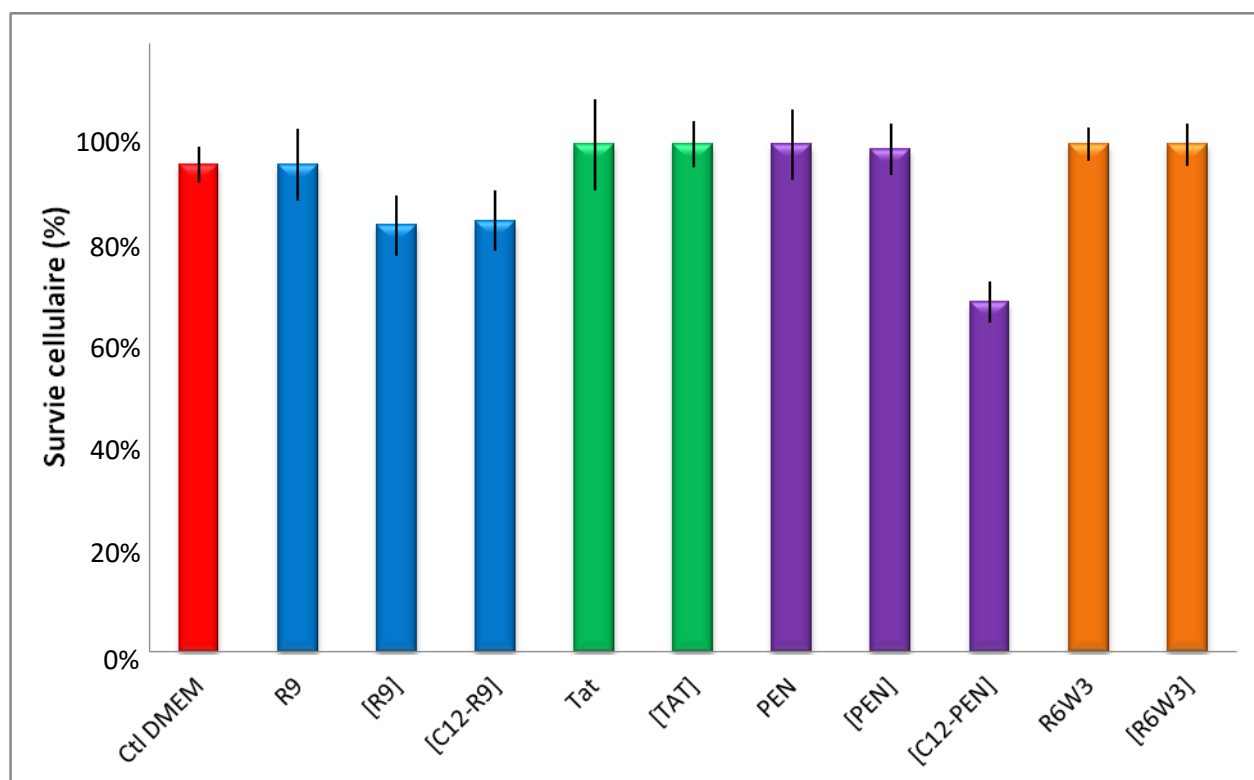


Figure 85 – Pourcentage de survie cellulaire après incubation avec les différents conjugués des CPP classiques linéaires ou cycliques.

Les expériences de viabilité cellulaire indiquent une survie cellulaire supérieure à 95 % pour tous les conjugués lipopeptidiques (CPP cycliques comportant de 4 à 7 résidus Arg) (**Figure 86**). Ces résultats valident ainsi les valeurs de quantification du peptide PKCi obtenues avec ces vecteurs.

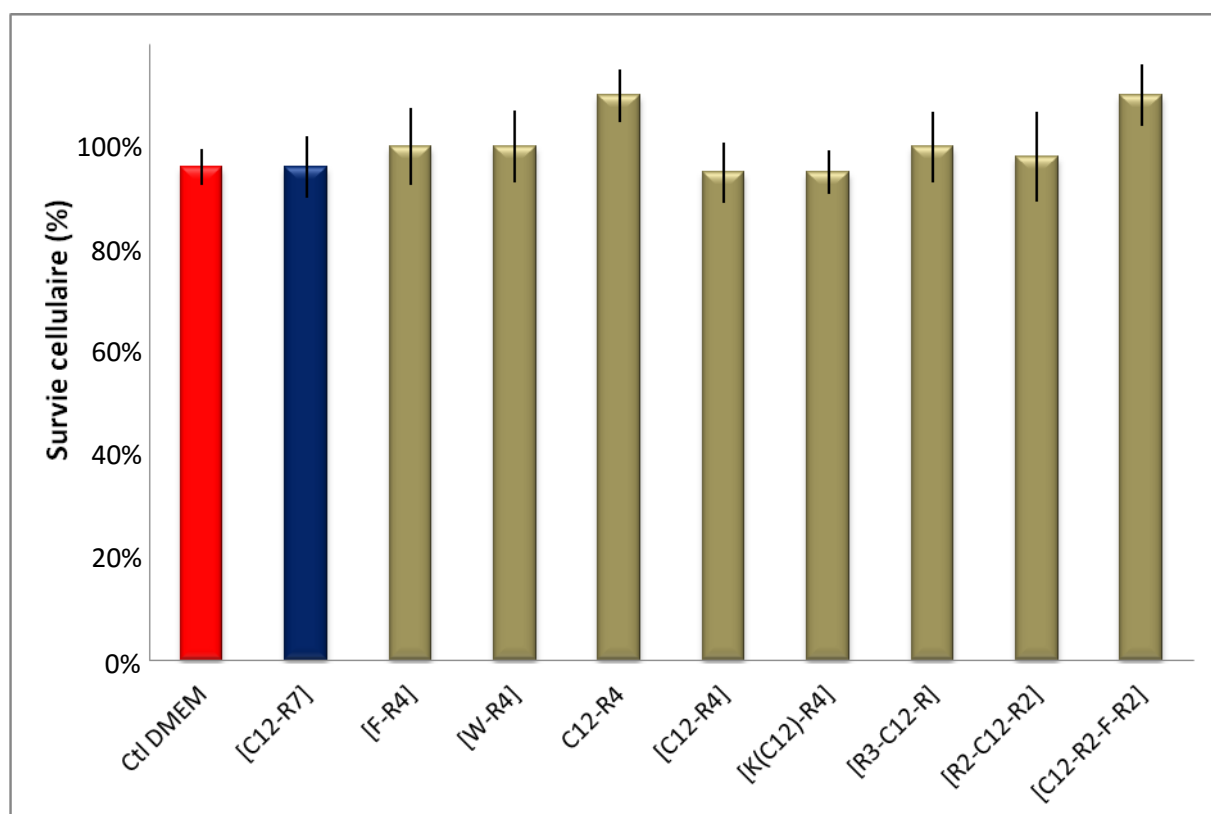


Figure 86 – Pourcentage de survie cellulaire après incubation avec les différents conjugués lipopeptidiques.

V – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

V. Conclusions et perspectives

Au début de ce projet de thèse, la cyclisation des CPP était encore très peu explorée. Uniquement deux articles avaient été publiés en 2011 traitant de CPP cycliques purement peptidiques.^{113,114} Cette nouvelle classe de vecteurs, ayant une stabilité métabolique accrue, suscite cependant de plus en plus d'intérêt, à en juger par la littérature récente. L'objectif de mon travail a donc été d'apporter des premiers éléments de réponse quant à l'internalisation des peptides vecteurs cycliques et l'impact de leur fonctionnalisation par une chaîne d'acide gras. Nous souhaitions évaluer l'effet de ces modifications structurales sur les mécanismes d'entrée dans les cellules et l'interaction avec les GAG qui constituent des partenaires clés des CPP dans le processus d'internalisation, l'objectif final étant de concevoir des CPP plus efficaces. Ce travail a permis la préparation et l'évaluation d'une quinzaine de nouveaux composés qui se sont, pour la plupart, révélés plus efficaces que les CPP classiques pour la vectorisation d'une cargaison peptidique.

Dans un premier temps, mon travail a porté sur la synthèse en stratégie Boc de peptides thioester, fonctionnalisés en leur extrémité *N*-terminale par une cystéine, nécessaire pour la réaction de cyclisation par ligation chimique native. L'optimisation des conditions expérimentales de cyclisation des thioester préformés a permis l'obtention de vecteurs cycliques de nature purement peptidique ou lipopeptidique. La ligation chimique native s'est révélée tout à fait adaptée à la préparation de notre série de composés. En parallèle, une autre méthode a été mise au point pour la synthèse de peptides cycliques, reposant sur l'utilisation de précurseurs de thioester (peptides α -MeCys) obtenus cette fois-ci en stratégie Fmoc. L'évaluation de l'effet de la cyclisation sur les propriétés de transport de ces nouveaux vecteurs a été réalisée par le suivi d'une cargaison peptidique (le PKCi), qui seule ne s'internalise pas, et qui leur a été liée de manière covalente *via* un lien disulfure. La quantification du peptide PKCi intact se trouvant dans le milieu intracellulaire a été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Les résultats indiquent une meilleure internalisation, essentiellement par voie d'endocytose, suite à la cyclisation des CPP R₉, Tat, R₆W₃ et Pen. C. Cardoso avait montré précédemment que Tat cyclique (non conjugué à une cargaison) pénètre mieux par

translocation directe que la version linéaire.¹¹⁴ Nous n'avons pas observé cet effet sur [Tat] conjugué au PKCi. Notre étude a également montré que dans cette série, l'entrée des peptides cycliques est plus dépendante des GAG de surface que celle des peptides linéaires correspondants, suggérant une interaction ou recrutement plus efficace des GAG. Par la suite, la cyclisation combinée à l'acylation par une chaîne lauryl a permis d'augmenter le potentiel de vectorisation de Pen et R₉ d'un facteur cinq et huit, respectivement. Ce résultat, fait de [C₁₂-Pen] le peptide le plus efficace que nous ayons testé durant ce projet pour l'internalisation du PKCi. Ceci s'accompagne malheureusement d'un effet cytotoxique pour [C₁₂-Pen] et dans une moindre mesure pour [C₁₂-R₉], ce qui limite leur utilisation.

Ces résultats prometteurs nous ont conduit à concevoir une petite librairie de dix CPP amphiphiles constitués d'un domaine oligo-arginine cyclique de taille variable fonctionnalisé par une chaîne lipidique. L'étude de ces différents transporteurs a permis d'identifier certains paramètres structuraux influençant leurs propriétés d'internalisation. [C₁₂-R₄] est internalisé plus efficacement que son analogue linéaire du fait d'une meilleure interaction avec les GAG de surface. L'augmentation du nombre de résidus arginine au sein du cycle (de 4 à 7) conduit à une baisse significative de la quantité de PKCi transportée *via* endocytose mais accroît les propriétés de translocation du vecteur (comparaison des CPP [C₁₂-R₄] et [C₁₂-R₇]). La position de la chaîne lauryl au sein de la séquence peptidique joue aussi un rôle crucial dans le mécanisme d'entrée. Les vecteurs [C₁₂-R₄] et [R₂-C₁₂-R₂], pour lesquels les 4 résidus Arg sont soit adjacents soit groupés par paires, permettent une accumulation de la cargaison dans les cellules à une concentration de l'ordre de 8 µM, 3 fois supérieure à la concentration obtenue avec le CPP [R₃-C₁₂-R] adoptant une distribution des résidus Arg « 3+1 ». Ceci résulte essentiellement d'une endocytose (et interaction avec les GAG) plus efficace.

De toute la série de peptides testés dans ce projet (20 CPP au total), deux séquences nous semblent fortement intéressantes par leur capacité assez remarquable à franchir les membranes cellulaires, leur caractère non toxique et leur facilité de synthèse. Il s'agit, d'une part, du CPP [C₁₂-R₄] qui conduit à une concentration intracellulaire de cargaison peptidique intacte de 8 µM environ. L'internalisation de ce conjugué est cependant majoritairement dépendante de l'endocytose (environ 85 %). Le CPP [C₁₂-R₇] permet quant à lui une

translocation directe plus efficace (2 μ M de PKCi intracellulaire mesuré lors d'une incubation à 4°C), conduisant à un accès direct dans le cytosol des cellules.

L'augmentation du potentiel d'internalisation d'une séquence donnée par cyclisation et acylation par une chaîne lauryl a été montrée au cours de ce travail. Il serait intéressant maintenant d'optimiser les deux CPP prometteurs que nous avons identifiés par introduction de nouvelles modifications. La première modification qui peut être envisagée et qui est simple à réaliser consiste à incorporer des aminoacides de configuration D. Le groupe de Pei utilise une alternance d'aminoacides de configuration L et D dans ses séquences cycliques, ce qui semble améliorer l'efficacité d'entrée.¹¹⁷ L'équipe de Cardoso a par contre utilisé le peptique [Tat] entièrement composé d'acides aminés D.¹¹⁴ Par ailleurs, il a récemment été montré dans le laboratoire que l'acylation du peptide Arg₄ linéaire par une chaîne lipidique comportant des insaturations de configuration *cis* permet de favoriser l'entrée par translocation directe.¹⁵⁶ Ainsi, la combinaison d'une chaîne d'acide gras insaturée et d'une structure peptidique cyclique pourrait s'avérer très intéressante.

VI – MATERIELS ET METHODES

I. Matériels, réactifs et solvants

Les acides aminés (dérivés Fmoc et Boc), les agents de couplage (HBTU, DCC) ont été obtenus chez Iris Biotech GmbH ou Novabiochem. L'acide laurique et l'acide stéarique ont été achetés chez le fournisseur Sigma Aldrich et la (R,S)-Boc-2--aminododécanoïque a été obtenue chez Polypeptides. Les solvants (NMP pour synthèse peptidique, DCM, acétonitrile pour HPLC...) ont été achetés chez Fluka. Les synthèses de peptides selon la stratégie Boc ont été réalisées sur résine MBHA LL (100-200 mesh).HCl (4-Méthyl-benzylhydramine hydrochloride polystyrène ; 0,51-0,54 mmole/g) de chez Bachem. La résine α -méthyle cystéine (α MeCys) (0,2 mmole/g de résine), utilisée selon la stratégie Fmoc, a été préparée par le groupe du Dr. John Offer au MRC National Institute for Medical Research. Cette résine est issue de la fonctionnalisation d'une résine de type Wang (Merck Chemicals) par de la Fmoc- α Me-L-Cys(Trt)-OH.

Pour la synthèse peptidique manuelle, des seringues en polypropylène (MultiSyntech Company) équipées de frittes poreux ont été utilisées. Les peptides purifiés et produits bruts ont été lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur Christ Alpha 2-4 LD (Bioblock Scientific). Tous les composés peptidiques et lipopeptidiques ainsi que les dérivés cycliques et les conjugués ont été purifiés par HPLC (Pompes : Waters 1525, Binary HPLC pump ; Détecteur UV : Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector) en utilisant des colonnes semi-préparatives (ACE-5 C4 / C8-300A, 250 x 10mm, Kromasil® C18 5 μ m, 250 x 10mm) ou encore des colonnes analytiques (ACE- 5 C4 / C8-300A 5 μ m, 250 x 4,6mm, Kromasil® C18 5 μ m, 250 x 4,6mm, Vydac® C4 / C18 5 μ m, 150 x 4,6mm).

Toutes les séquences peptidiques ont été caractérisées par MALDI-TOF MS (Applied Biosystems Voyager DE Pro). Les échantillons ont été analysés en mode réflecteur d'ionisation positif ou suivant le mode linéaire positif, en utilisant la matrice α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA). Les valeurs de m/z mesurées expérimentalement (exp) des peptides protonés sont indiquées au regard des m/z correspondants théoriques (calc).

II. Protocoles généraux

L'échelle standard de synthèse sur support solide a été fixée à 0,1 mmole. Le nombre d'équivalent (éq.) est indiqué en fonction de la quantité de fonctions réactives présentes sur la résine.

II.1 Synthèse peptidique sur support solide en STRATEGIE BOC

II.1.1 Cycle de synthèse peptidique selon le protocole de neutralisation *in situ*

La résine MBHA, placée dans un réacteur, est gonflée pendant 30 minutes dans une solution de NMP puis rincée par une solution de 10 % de *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA) dans la NMP. S'ensuit la répétition X fois du cycle des deux étapes suivantes a) et b) pour permettre l'incorporation de X acides aminés.

a) Préactivation du Boc acide aminé et couplage : L'acide aminé protégé par un groupement Boc (0,6 mmole, 6 eq.) est activé pendant 3 minutes par une solution contenant du HBTU (0,58 mmole, 5,8 eq., 0,5 M) en présence de DIPEA (1,4 mmoles, 14 eq.) dans la NMP. La solution d'ester activé est mise en contact de la résine pendant 30 minutes à température ambiante. L'avancement de la réaction est contrôlé en effectuant un test de Kaiser (voir ci-dessous). Un second couplage est réalisé si nécessaire. La résine est ensuite lavée avec de la NMP.

b) Déprotection de l'amine *N*-terminale : Le groupement Boc est éliminé par traitement au TFA pur (2 x 1 min). La résine est ensuite lavée abondamment avec de la NMP. La neutralisation du groupe NH_3^+ , se fera *in situ* pendant la réaction de couplage de l'acide aminé suivant.

(L'acide laurique, l'acide stéarique et la (R,S)-Boc-2-aminododécanoïque sont couplés selon ce protocole)

II.1.2 Couplages utilisant des conditions spécifiques

Couplage de la Boc-L-Cys(Npys)-OH

L'activation et le couplage de la Boc-L-Cys(Npys)-OH implique un protocole spécifique car l'utilisation d'HOBt ou de HBTU pour son activation, comme de tout autre traitement avec un nucléophile ou un agent réducteur entraîne la perte du Npys (exemple : la déformylation des résidus Trp doit être réalisée avant l'incorporation de la Cys(Npys)). Ainsi, l'acide aminé Boc-L-Cys(Npys)-OH (0,6 mmoles, 6eq.) est activé par une solution de 1 M de DCC dans la NMP pendant 10 minutes. La solution d'ester activé est ensuite filtrée, puis transférée dans le réacteur contenant le peptide-résine déprotégé en son extrémité *N*-terminale préalablement traité par une solution de 10 % de DIPEA dans la NMP. Le couplage est conduit pendant 2 heures à température ambiante.

Formation du lien thioester : MPAL (mercaptopropionic acid leucine)

Après incorporation du résidu leucine sur la résine en suivant le protocole « *Cycle de synthèse peptidique, en stratégie Boc* », l'acide S-trityl-mercaptopropionique (0,2 mmole, 2 eq.) est traité par du HBTU (0,18 mmole, 1,8 eq, ~ 0,5 M) en présence de DIPEA (0,4 mmole, 4 eq.) pendant 3 minutes. La solution d'ester activé est ensuite transférée dans le réacteur contenant la résine, puis laissée à réagir pendant 1h30 à température ambiante. L'avancement de la réaction est contrôlé en effectuant un test de Kaiser. Le peptide-résine est ensuite lavé avec de la NMP avant de procéder à l'étape d'élimination du groupement trityl. La détritylation est réalisée par traitement en flux continu d'une solution fraîche incolore de TFA/H₂O/triéthylsilane (95:2,5:2,5; v/v/v) pendant 15 minutes. Cette solution prend une coloration jaune pendant l'élimination du trityl et une déprotection totale du thiol est atteinte lorsque cette solution en flux continu reste incolore. Le peptide-résine est alors lavé de façon répétée à la NMP afin d'éliminer toute trace d'acide et l'élongation du peptide est directement reprise au niveau du thiol libéré. Elle est réalisée par synthèse peptidique en stratégie Boc. Le temps de couplage entre le thiol libre et l'ester activé est de 45 minutes conduisant au thioester supporté.

Acétylation *N*-terminale du peptide

Après élimination du groupement Boc, l'amine *N*-terminale est déprotonée par traitement avec une solution contenant 5 équivalents DIPEA dans le DCM pendant 1 minute. Le peptide-résine est alors traité par une solution contenant 10 % d'anhydride acétique dans le DCM pendant 30 min à température ambiante.

II.1.3 Protocoles de déprotection et clivage des peptides

Elimination du groupement mtt (4-méthyltrityl) de la chaîne latérale de la lysine

Le peptide-résine est traité en flux continu avec un mélange d'acide acétique/trifluoroéthanol/dichlorométhane (1:2:7 ; v/v/v), pendant 20 minutes. L'élimination du groupement mtt est contrôlée en effectuant un test de Kaiser. Le peptide-résine est ensuite lavé avec du DCM puis avec de la NMP.

Elimination du groupement formyl

Lorsque le dérivé BocTrp(CHO)-OH est utilisé au cours de l'assemblage d'un peptide, le groupement formyl est éliminé avant clivage HF par traitements du peptide résine avec une solution de 20 % de pipéridine dans la NMP (des traitements successifs de 1, 3, 7, 15, et 60 min sont réalisés). Pour la synthèse de peptides contenant à la fois des résidus Trp et Cys(NpyS), il est nécessaire d'utiliser le dérivé Boc-Trp-OH (non protégé sur la chaîne latérale) ou de procéder à la déformylation avant couplage du résidu Boc-Cys(NpyS)-OH.

Clivage HF

En fin d'élongation du peptide, la résine est séchée sous vide dans un dessiccateur, pesée et introduite dans un réacteur à HF. Le peptide est déprotégé et clivé du support solide par traitement au HF anhydre à 0°C (~2h) en présence de piègeurs de carbocations. Pour les peptides ne contenant ni résidu Cys, ni fonction thioester, le cocktail de piègeurs de carbocations contient de l'anisole (1,5 mL/g de résine) et diméthylsulfure (DMS) (0,25 mL/g de résine). Lorsque la séquence peptidique incorpore une cystéine protégée par un groupement Npys, seul de l'anisole (1,5 mL/g de résine) est utilisé alors que la présence d'un dérivé de cystéine protégé différemment nécessite l'ajout du *p*-toluèthiol (300 mg/g de résine) en plus de l'anisole et du DMS. Dans le cas des peptides-MPAL, le piègeur de

carbocations utilisé est le *p*-crésol (20 mg / 300 mg de résine). Le clivage fini, le HF est évaporé et de l'éther froid est ajouté dans le réacteur pour précipiter le peptide. L'éther est éliminé et le peptide resuspendu dans une solution dégazée de 20 % acide acétique dans l'eau. Après élimination de la résine par filtration, le peptide est lyophilisé.

II.2 Synthèse peptidique sur support solide en stratégie Fmoc

II.2.1 Cycle de synthèse peptidique

La résine WANG portant l' α -méthyle cystéine est tout d'abord gonflée pendant 30 minutes dans une solution de NMP. S'ensuit la répétition X fois du cycle des deux étapes suivantes a) et b) pour permettre l'incorporation de X acides aminés.

a) La déprotection du groupement Fmoc est réalisée par une solution fraîche de 20 % de pipéridine dans la NMP (3 x 3 minutes). La résine est ensuite lavée abondamment à la NMP pour éliminer toute trace de base.

b) Préactivation du Fmoc acide aminé et couplage : L'acide aminé protégé par un groupement Fmoc (0,6 mmole, 6 eq.) est activé pendant 3 minutes par une solution contenant du HBTU (0,58 mmole, 5,8 eq, ~ 0, 5M) en présence de DIPEA (1,2 mmoles, 12 eq.) dans la NMP. La solution d'ester activé est mise en contact de la résine pendant 30 minutes à température ambiante. L'avancement de la réaction est contrôlé en effectuant un test de Kaiser. La résine est ensuite lavée avec de la NMP.

II.2.2 Procédure de clivage et déprotection des peptides

La résine est séchée, puis pesée. Le peptide est clivé de son support solide par traitement à température ambiante (3h) avec une solution « fraîchement » préparée de TFA/H₂O/triisopropylsilane (95:2.5:2.5 ; v/v/v, ~20 mL/g de résine). Pour le clivage du support de séquences contenant une méthionine ou une cystéine protégée par un groupe trityl, un cocktail de TFA/H₂O/triisopropylsilane/éthanedithiol (94:2.5:1:2.5 ; v/v/v/v, ~20 mL/g de résine) est choisi. La résine est ensuite éliminée par filtration et rincée une fois par du TFA. Le volume de la solution de TFA contenant le peptide (filtrat) est réduit par

évaporation à l'aide d'un flux d'argon ou d'azote. Puis le peptide est précipité dans l'éther froid avant centrifugation (5 min, à 8000 rpm). Après élimination du surnageant, le culot peptidique est solubilisé dans une solution aqueuse dégazée de 20 % d'acide acétique. L'échantillon ainsi obtenu est alors lyophilisé.

II.3 Test de Kaiser

Le test de Kaiser a été utilisé pour suivre les réactions sur support de couplage et de déprotection. Il s'agit d'un test colorimétrique qui permet de détecter la présence ou l'absence de fonctions amines libres sur la résine. Après traitement de quelques billes de résine avec un mélange des réactifs de Kaiser (voir ci-dessous), un test positif (présence d'amines libres) est caractérisé par une coloration bleue foncée de la résine alors que la résine reste incolore dans un test négatif (absence d'amines libres). Si à la suite d'une étape de couplage, le test de Kaiser est positif, une seconde réaction de couplage est envisagée. De même, si à la suite d'une étape de déprotection, le test de Kaiser est négatif alors une seconde réaction de déprotection est réalisée. Les trois solutions A, B et C utilisées pour réaliser le test de Kaiser sont de composition respective:

- solution A : 5 g de ninhydrine dans 100 mL d'éthanol,
- solution B : 80 g de phénol dans 20 mL d'éthanol,
- solution C : 2 mL d'une solution de cyanate de potassium à 1 mM dans 98 mL de pyridine.

Deux gouttes de chacune des solutions A, B et C sont additionnées à quelques billes de résine préalablement lavées avec du DCM et de la NMP et placées dans un tube à hémolyse. L'échantillon est ensuite chauffé à 100°C pendant 3 minutes.

II.4 Procédure standard de cyclisation par ligation chimique native

Les réactions de cyclisation à partir de peptides thioester (MPAL) se font en solution aqueuse dans un tampon composé de 200 mM d'hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4), de 2 mM d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), et selon la solubilité du peptide à cycliser, de 3 à 6 molaire de chlorhydrate de guanidine. La solution tampon est soigneusement dégazée pendant environ 15 minutes et purgée sous argon. Le TCEP (3,5

mM) et MPAA (3 mM) sont ajoutés. Le pH de la solution est ajusté à la valeur désirée (généralement pH 7) par addition d'hydroxyde de sodium (4 M). Une fois la valeur du pH désiré atteinte, un volume nécessaire pour avoir une concentration peptidique finale de 1 mM est prélevé et transféré dans le microtube contenant le peptide thioester à cycliser. La réaction de cyclisation est suivie par HPLC analytique en phase inverse. Le produit de ligation est par la suite purifié après dilution du milieu réactionnel dans une solution aqueuse de TFA (0,1 %) soigneusement dégazée.

La même procédure a été utilisée pour la cyclisation du peptide Pénétratine avec une α -méthyl cystéine en position C-terminale. Dans ce cas, la composition du tampon de ligation était : 200 mM Na_2HPO_4 , 2 mM EDTA, 3 M guanidine.HCl, 300 mM TCEP, 300 mM MPAA, pH 6.

II.5 Procédure de conjugaison des CPP avec la cargaison par formation de pont disulfure (CPP cyclique-Cys + Cys(Npys)-cargaison et CPP linéaire-Cys(Npys) + Cys-cargaison)

Le CPP et la cargaison sont dissous dans une solution dégazée d'acétate de sodium à pH 4,5 à température ambiante. L'entité porteuse de la Cys(Npys) est utilisée en léger excès (1,1 eq., 2 mM). La réaction est suivie par HPLC analytique en phase inverse. En fin de réaction (réaction généralement terminée en 1h30), le conjugué est purifié après dilution du milieu réactionnel dans une solution aqueuse de TFA (0,1 %, v/v) soigneusement dégazée.

III. Synthèse et caractérisation des peptides linéaires

(Les différentes étapes de synthèse pour chaque catégorie de peptide sont présentées ici, les protocoles détaillés de chacune de ces étapes sont présentés plus haut)

Les peptides vecteurs classiques Pen, Tat, R_6W_3 , et R_9 ont été synthétisés manuellement sur support solide (0,1 mmole) en stratégie Boc (résine MBHA-PS, taux de substitution 0,51 mmole de NH_2/g , activation des acides aminés au HBTU). La Boc-L-

Cys(Npys)-OH (0,6 mmole) a été introduite après activation au DCC. Après 2h de réaction, le peptide-résine a été déprotégé et acétylé en son extrémité *N*-terminale. Les peptides ont été clivés de leur support solide par traitement avec du HF. Ils ont été purifiés par HPLC en phase inverse en utilisant un gradient linéaire sur 30 min de solvant B / A (A = 0,1 % TFA dans H₂O ; B = 0,09 % TFA dans CH₃CN). Le gradient a été optimisé pour chaque peptide. La détection est réalisée classiquement à 215 nm (et 340 nm pour la détection du Npys). Les fractions pures ont été rassemblées et lyophilisées. La pureté des peptides a été contrôlée par HPLC analytique (tous les peptides ont été obtenus avec une pureté > 95 %). Les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflecteur ou linéaire positif en utilisant la matrice HCCA (10 mg/mL dans H₂O/CH₃CN/TFA (50:50:0,1; v/v/v)).

Caractérisation des peptides. Les temps de rétention HPLC (colonne ACE-5 C8-300A 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient indiqué entre parenthèses) sont donnés ci-dessous.

Pen : Ac-C(Npys)RQIKIWFQNRRMKWKK-NH₂

Temps de rétention HPLC : 18 min (10-60 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 2390,96, (exp) 2390,79.

Tat : Ac-C(Npys)GRKKRRQRRR-NH₂

Temps de rétention HPLC : 9,8 min (10-60 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1540,87, (exp) 1540,68.

R₆W₃ : Ac-C(Npys)RRWWRRWRR-NH₂

Temps de rétention HPLC : 11 min (20-40 % B, 30min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1657,98, (exp) 1657,27.

R₉ : Ac-C(Npys)RRRRRRRRR-NH₂

Temps de rétention HPLC : 6min (15-50 % B, 30min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1567,91, (exp) 1567,13.

Le peptide cargaison (PKCi) a été synthétisé manuellement sur support solide (0,2 mmole) en stratégie Boc (résine MBHA-PS, taux de substitution 0,54 mmole/g de résine, activation des acides aminés au HBTU). Après incorporation de la Boc-L-Cys(Trt)-OH, le peptide-résine a été séché sous vide au dessiccateur, puis partagé en deux lots de 0,18 mmole et 0,02 mmole chacun. La synthèse des peptides ¹H-PKCi (0,18 mmol) et ²H-PKCi (0,02 mmol) est poursuivie en parallèle par assemblage de l'étiquette de marquage

isotopique (Biotine(O₂)-Gly₄). Pour le peptide ¹H-PKCi de la glycine non deutériée est couplée. Pour le peptide ²H-PKCi la glycine bi-deutériée est couplée (Fournisseur Euriso-top, Boc-Gly-OH-2,2-d₂). La biotine sulfone (1,08 mmol, 6eq.) est activée par du HBTU (1,04 mmol, 5,8 eq, 0, 5M) en présence de DIPEA (2,52 mmol, 14 eq.) pendant 3 minutes avant d'être transférée à la résine, pour réagir pendant 2h à température ambiante. Les peptides sont ensuite clivés de leur support par traitement au HF, puis purifiés en HPLC et caractérisés comme indiqué précédemment.

Caractérisation des peptides Les temps de rétention HPLC (colonne ACE-5 C8-300A 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient indiqué entre parenthèses) sont donnés ci-dessous.

PKCi: Biot-GGGGCRFARKGALRQKNV-NH₂

Temps de rétention HPLC : 11,7 min (5-70 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ ¹H-PKCi (calc) 2132,50, (exp) 2132,45 ; ²H-PKCi (calc) 2140,55, (exp) 2140,61.

Les peptides vecteurs thioester (MPAL) ont tous été synthétisés manuellement en stratégie BOC sur une résine MBHA-PS (0,1 mmol, taux de substitution 0,57 mmol/g de résine). Pour tous les composés la synthèse débute par l'incorporation sur la résine de Boc-L-Leu-OH, puis de l'acide S-trityl-mercaptopropionique (0,2 mmol, 2eq.). Après élimination du groupe trityl, l'élongation du peptide est réalisée suivant le mode opératoire de la stratégie BOC-SPPS. Les peptides thioester sont ensuite clivés de leur support par traitement au HF, puis purifiés en HPLC et caractérisés comme indiqué précédemment.

Caractérisation des peptides Les temps de rétention HPLC (colonne ACE-5 C8-300A 5 µm, 250 x 4,6 mm, gradient indiqué entre parenthèses) sont donnés ci-dessous.

Pen-MPAL : CRQIKIWFQNRRMKWKK-MPAL

Temps de rétention HPLC : 6,8 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 2549,40, (exp) 2549,14.

Tat-MPAL : CGRKKRRQRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 5,6 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1700,12, (exp) 1701,42.

R₆W₃-MPAL : CRRWWRRWRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 7,1 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1817,23, (exp) 1817,42.

R₉-MPAL : CRRRRRRRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 14,7 min (0-25 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1727,16, (exp) 1727,13.

C₁₂-R₄-MPAL : CC₁₂RRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 8,5 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1171,59, (exp) 1171,02.

K(C_{12:0})-R₄-MPAL : CK(C_{12:0})RRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 25,7 min (5-90 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1256,69, (exp) 1257,08.

K(C_{18:0})-R₄-MPAL : CK(C_{18:0})RRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 33,1 min (5-35 % B, 40 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1340,85, (exp) 1340,71.

R₂-C₁₂-R₂-MPAL : CRRCC₁₂RR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 8,5 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1171,59, (exp) 1171,08.

R₃-C₁₂-R-MPAL : CRRRC₁₂R-MPAL

Temps de rétention HPLC : 8,5 min (0-70 % B, 10min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1171,59, (exp) 1171,15.

W-R₄-MPAL : CWRRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 6 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1132,12, (exp) 1132,83.

F-R₄-MPAL : CFRRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 10 min (5-70 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1093,39, (exp) 1093,70.

C₁₂-R₂-F-R₂-MPAL : CC₁₂RRFRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 22 min (5-70 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1318,76, (exp) 1318,86.

C₁₂-W-R₄-MPAL : CC₁₂WRRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 9,8 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1357,50, (exp) 1357,67.

C₁₂-R₂-C₁₂-R₂-MPAL : CC₁₂RRC₁₂RR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 38 min (5-70 % B, 40 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1396,96, (exp) 1396,27.

C₁₂-R₃-C₁₂-R₃-MPAL : CC₁₂RRRC₁₂RRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 35 min (5-70 % B, 40 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1708,14, (exp) 1707,36.

C₁₂-Pen-MPAL : CC₁₂RQIKIWFQNRRMKWKK-MPAL

Temps de rétention HPLC : 9,1 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 2772,60, (exp) 2772,61.

C₁₂-R₉-MPAL : CC₁₂RRRRRRRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 8,5 min (0-70 % B, 10 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1952,53, (exp) 1952,33.

C₁₂-R₇-MPAL : CC₁₂RRRRRRR-MPAL

Temps de rétention HPLC : 23,3 min (5-35 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 1639,04, (exp) 1638,19.

Pen-αMeCys : CRQIKIWFQNRRMKWKK-αMeCys

Temps de rétention HPLC : 21,8 min (5-55 % B, 30 min). MALDI-TOF MS (m/z) [MH]⁺ (calc) 2465,32, (exp) 2465,69.

IV. Synthèse et caractérisation des peptides cycliques et conjugués.

Les réactions de cyclisation ont été réalisées selon le protocole général décrit dans le paragraphe II.4. Après purification sur HPLC, les peptides cycliques ont tous été conjugués au peptide PKCi par formation d'un pont disulfure (protocole II.5). Tous les peptides cycliques (**Tableau 12**) et les conjugués (**Tableau 13**) ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflecteur positif et/ou linéaire positif en utilisant la matrice HCCA (10 mg/mL dans H₂O/CH₃CN/TFA (50:50:0,1; v/v/v). Les valeurs m/z des conjugués et les temps de rétention HPLC (colonne : Vydac® C4 5µm, 150 x 4,6mm, gradient indiqué entre parenthèses) sont donnés ci-dessous.

Peptide	[MH] ⁺ (calc)	[MH] ⁺ (exp)
[Pen]	2331,08	2330,82
[Tat]	1481,82	1482,14
[R ₆ W ₃]	1598,91	1599,11
[R ₉]	1508,84	1508,81
[C ₁₂ -R ₄]	953,25	952,7
[K(C _{12:0})	1038,37	1038,76
[K(C _{18:0})-R ₄]	1122,53	1122,39
[R ₂ -C ₁₂ -R ₂]	953,25	952,76
[R ₃ -C ₁₂ -R]	953,25	952,83
[W-R ₄]	913,81	913,66
[F-R ₄]	875,07	875,38
[C ₁₂ -R ₂ -F-R ₂]	1100,44	1100,87
[C ₁₂ -Pen]	2554,28	2554,45
[C ₁₂ -R ₉]	1734,21	1734,88
[C ₁₂ -R ₇]	1420,72	1420,03

Tableau 12 – *Caractérisation des peptides cycliques*

Peptide	[MH] ⁺ (calc)	[MH] ⁺ (exp)	t _R [min]
Pen-PKCi	4521,46	4521,24	14,7 min (5-70 % B, 30 min)
Tat-PKCi	3671,37	3671,13	12,1 min (5-40 % B, 30 min)
R ₆ W ₃ -PKCi	3788,48	3787,72	17,8 min (5-60 % B, 30 min)
R ₉ -PKCi	3698,41	3697,58	13,6 min (5-40 % B, 30 min)
[Pen]-PKCi	4461,58	4461,27	12,7 min (5-60 % B, 30 min)
[Tat]-PKCi	3612,3	3613,55	17,1 min (10-25 % B, 30 min)
[R ₆ W ₃]-PKCi	3729,41	3729,55	17 min (5-40 % B, 30 min)
[R ₉]-PKCi	3639,34	3639,26	18,5 min (5-30 % B, 30 min)
[C ₁₂ -R ₄]-PKCi	3083,77	3083,15	11,5 min (5-70 % B, 30 min)
[K(C _{12:0})-R ₄]-PKCi	3168,87	3169,21	22,6 min (20-90 % B, 30 min)
[K(C _{18:0})-R ₄]-PKCi	3253,03	3252,84	33,3 min (10-80 % B, 40 min)
[R ₂ -C ₁₂ -R ₂]-PKCi	3083,77	3083,21	11,4 min (5-70 % B, 30 min)
[R ₃ -C ₁₂ -R]-PKCi	3083,77	3083,28	11,4 min (5-70 % B, 30 min)
[W-R ₄]-PKCi	3044,3	3044,96	10,7 min (5-70 % B, 30 min)
[F-R ₄]-PKCi	3005,57	3005,83	11,6 min (5-70 % B, 30 min)
[C ₁₂ -R ₂ -F-R ₂]-PKCi	3230,94	3230,99	13,8 min (5-70 % B, 30 min)
[C ₁₂ -Pen]-PKCi	4684,78	4684,74	21,6 min (10-40 % B, 30 min)
[C ₁₂ -R ₉]-PKCi	3864,71	3864,46	15,8 min (10-40 % B, 30 min)
[C ₁₂ -R ₇]-PKCi	3551,22	3550,32	13,3 min (5-40 % B, 30 min)

Tableau 13 – *Caractérisation des conjugués.*

V. Evaluation biologique

V.1 Protocole de quantification de l'internalisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La veille de l'expérience de quantification, les cellules CHO-K1 (ou CHO-745) sont ensemencées dans du DMEM/F12 contenant 10 % de sérum de veau fœtal à la densité de

$5 \cdot 10^5$ cellules / puits dans des boîtes de culture 12 puits et incubées à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % CO₂. Après 24h, les surnageants sont aspirés et les cellules (10^6 cellules adhérentes à confluence / puits) sont lavées deux fois avec 1 mL de HBSS, puis une fois avec 1 mL de DMEM. Les cellules sont ensuite incubées avec les conjugués (¹H-PKCi-CPP, 7,5 μM dans 500 μL de DMEM/F12) pendant 75 min à 37°C (ou à 4°C). A la fin de l'incubation, le milieu de culture est aspiré, les cellules sont lavées deux fois avec 1 mL de HBSS, puis sont traitées pendant 1 min à température ambiante avec 200 μL d'une solution de TCEP (2 mM dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,4). Les cellules sont lavées deux fois avec 1 mL de HBSS, puis incubées avec 500 μL de solution de protéase :

- Si l'incubation avec le conjugué a été réalisée à 37°C, les cellules sont traitées pendant 5 min à 37°C avec une solution contenant 0,05 % trypsine et 0,02 % EDTA (trypsine pour culture cellulaire). La boîte 12 puits est posée aussitôt sur la glace et la trypsine est inhibée par ajout de 100 μL d'inhibiteur de trypsine de soja (5 mg/mL dans H₂O), et de 100 μL de BSA (1mg/mL dans H₂O).

- Si l'incubation avec le conjugué a été réalisée à 4°C, les cellules sont traitées pendant 5 à 10 min (jusqu'à décollement des cellules) à 4°C avec de la pronase (1 mg/mL dans du tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,4). La pronase est inhibée par ajout de 100 μL de cocktail d'inhibiteur de protéase (Roche Complete Mini, 1 pastille dissoute dans 1,2 mL H₂O) et de BSA (1 mg/mL dans l'eau).

Les cellules sont transférées dans des microtubes et chaque puits est lavé avec 500 μL de tampon 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) pour récupérer toutes les cellules. Des microtubes pré-lubrifiés sont utilisés pour limiter l'adhésion ultérieure des peptides (Fournisseur Costar ou Eppendorf). Les suspensions sont centrifugées pendant 2 min à 640g. Les surnageants sont aspirés, et les culots de cellules intactes sont lavés avec 1 mL de tampon A (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mg/mL BSA). Les échantillons sont centrifugés à nouveau (2 min, 640g). Une fois les surnageants éliminés, 150 μL d'une solution de lyse (0,3 % Triton X-100, 1 M NaCl, 2 mM DTT) et la quantité voulue de peptide étalon (²H-PKCi) sont ajoutés aux culots. Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 15 min. Les lysats cellulaires sont refroidis avant d'être centrifugés pendant 5 min à 7000g. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux microtubes et les culots de débris cellulaire lavés avec 850 μL de tampon A. Les deux solutions sont rassemblées. 10 μL de suspension de billes magnétiques fonctionnalisées par de la streptavidine (Dynabeads M-280), et 10 μL d'une solution de DTT (100 mM dans H₂O)

sont ajoutés dans les tubes et laissés pendant 1h sous agitation douce à température ambiante. Après incubation, les billes sont immobilisées sur un portoir magnétique, puis sont lavées par : 2 x 200 μ L de tampon A, 2 x 200 μ L de tampon B (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 mg/mL BSA, 0,1 % SDS). 50 μ L d'une solution de Laemmli diluée (composition finale : 0,2 % SDS, 1 % glycérol, 0,2 % β -mercaptoéthanol, 0.005 % bleu de bromophénol, 5 mM Tris-HCl pH 6.8) sont ajoutés et les échantillons sont chauffés à 45°C pendant 15 min puis lavés par 2 x 200 μ L de tampon C (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1mg/mL BSA, 1 M NaCl), et enfin 200 μ L d'eau. Les billes sont ensuite saturées par 50 μ L d'une solution de biotine (10 μ M dans H₂O, incubation 30 s), puis lavées avec 50 μ L d'une solution de TCEP (1 mM dans 50 mM Tris-HCl pH 7,4), avant d'être suspendues dans 50 μ L d'un mélange eau/acétonitrile (1:1 ; v/v). Après brève centrifugation des échantillons et élimination des surnageants, les peptides sont élués par incubation des billes magnétiques avec 3 μ L d'une solution de matrice HCCA (10 mg/mL dans H₂O/CH₃CN/TFA, 50:50:0,1; v/v/v) pendant 10 min. Les billes sont immobilisées sur le portoir magnétique, 1 μ L de surnageant est prélevé et déposé sur la plaque MALDI. Les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (De-Pro, Applied Biosystems) en mode réflecteur positif. Pour chaque échantillon, le spectre de masse est moyenné à partir de plusieurs centaines de tirs laser. La quantité de peptide PKCi intracellulaire intact (pour 10⁶ cellules) est calculée à partir de l'aire des signaux [M+H⁺] des peptides ¹H-PKCi et ²H-PKCi.

Remarque : lors de la première évaluation d'un conjugué, la quantité de peptide internalisée est estimée en ajoutant à différents échantillons d'internalisation des quantités différentes d'étalon interne (par exemple si l'expérience est faite en triplicat : 0,5, 2 et 5 pmoles). La quantité d'étalon est ajustée lors des expériences suivantes de façon à avoir des signaux d'intensités voisines pour les deux peptides ¹H-PKCi et ²H-PKCi.

V.2 Protocole d'étude de la survie cellulaire

Les cellules CHO-K1 sontensemencées dans du DMEM/F12 contenant 10 % de sérum de veau fœtal dans une boîte de 96 puits (10 000 ou 20 000 cellules / puits) et incubées à 37°C sous atmosphère humidifiée contenant 5 % CO₂. 24 h plus tard, le surnageant est aspiré délicatement et les cellules sont incubées pendant 75 min à 37°C avec les conjugués à la

concentration voulue dans 100 μ L de DMEM/F12 (ou avec uniquement du DMEM/F12 pour les échantillons de référence). A la fin de l'incubation, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont traitées pendant 2h à 37°C avec 100 μ L d'une solution à 10 % CCK-8 (Dojindo Laboratories) dans le DMEM/F12. L'absorbance est mesurée à 450 nm avec un lecteur de plaque Fluostar OPTIMA (BMG LABTECH), avec une longueur d'onde de référence à 620 nm. Les expériences sont réalisées en triplicat et répétées au moins deux fois indépendamment.

VII - REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Vasconcelos, L., Pärn, K. & Langel, U. Therapeutic potential of cell-penetrating peptides. *Ther. Deliv.* **4**, 573–91 (2013).
2. Frankel, A. D. & Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **23**, 1189–93 (1988).
3. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. & Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1864–1868 (1991).
4. Vives, E., Brodin, P., Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017 (1997).
5. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444–10450 (1994).
6. Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyerlann, M., Klausschenz, E., Melzig, M., Bienert, M. Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1414**, 127–139 (1998).
7. Wender, P., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L., Rothbard, J. B. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13003–13008 (2000).
8. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. & Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J.* **12**, 67–77 (1998).
9. Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1173–1176 (2001).
10. Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. & Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2730–2736 (1997).
11. Fraenkel, E. & Pabo, C. O. Comparison of X-ray and NMR structures for the Antennapedia homeodomain-DNA complex. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 692–697 (1998).
12. Bloch-Gallego, E., Le Roux, I., Joliot, A. H., Volovitch, M., Henderson, C. E & Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide enhances growth and branching of embryonic chicken motoneurons in vitro. *J. Cell Biol.* **120**, 485–492 (1993).
13. Le Roux, I., Joliot, A. H., Bloch-Gallego, E., Prochiantz, A & Volovitch, M. Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9120–9124 (1993).
14. Sagan, S., Burlina, F., D. Alves, I., Bechara, C., Dupont, E., Joliot, A. Homeoproteins and homeoprotein-derived peptides: going in and out. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 2851–2862 (2013).

15. Christiaens, B., Grooten, J., Reusens, M., Joliot, A., Goethals, M., Vandekerckhove, J., Prochiantz, A & Rosseneu, M. Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1187–1197 (2004).
16. Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., Prochiantz, A. Cell internalization of the third helix of the antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* **271**, 18188–18193 (1996).
17. Zhang, W. & Smith, S. O. Mechanism of penetration of Antp (43-58) into membrane bilayers. *Peptides* 10110–10118 (2005).
18. Drin, G., D  m  , H., Tamsamani, J. & Brasseur, R. Translocation of the pAntp peptide and its amphipathic analogue AP-2AL. *Biochemistry* **40**, 1824–1834 (2001).
19. Jeang, K.T. HIV-1 Tat : structure and function. *Hum. retroviruses AIDS 1996 Compend.* 3–18 (1996).
20. Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179–1188 (1988).
21. Vives, E., Granier, C., Prevot, P. & Lebleu, B. Structure-activity relationship study of the plasma membrane translocating potential of a short peptide from HIV-1 Tat protein. *Lett. Pept. Sci.* **4**, 429–436 (1997).
22. Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hallbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., Langel,   . Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1467**, 165–176 (2000).
23. M  e, M. & Langel,   . Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 509–514 (2006).
24. Scheller, A., Oehlke, J., Wiesner, B., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M. Structural requirements for cellular uptake of alpha-helical amphipathic peptides. *J. Pept. Sci.* **5**, 185–194 (1999).
25. Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T., Langel, U. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res.* **269**, 237–244 (2001).
26. Phelan, A., Elliott, G & O'Hare, P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nature Biotechnology.* **16**, 291–294 (1998).
27. Delaroche, D., Auss  dat, B., Aubry, S., Chassaing, G., Burlina, F., Clodic, G., Bolbach, G., Lavielle, S., Sagan, S. Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Anal. Chem.* **79**, 1932–1938 (2007).
28. Crombez, L., Aldrian-Herrada, G., Konate, K., Nguyen, Q. N., McMaster, G. K., Brasseur, R., Heitz, F & Divita G. A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Mol. Ther.* **17**, 95–103 (2009).
29. Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A. R. & Tamsamani, J. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem.* **278**, 31192–31201 (2003).

30. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836–5840 (2001).
31. Derossi, D., Chassaing, G. & Prochiantz, A. Trojan peptides: the penetrating system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* **8**, 84–88 (1998).
32. Lamazière, A., Burlina, F., Wolf, C., Chassaing, G., Trugnan, G., Ayala-Sanmartin, J. Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides. *PLoS One* **2**, (2007).
33. Reitsma, S., Slaaf, D. W., Vink, H., Van Zandvoort, M. a M. J. & Oude Egbrink, M. G. a. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **454**, 345–359 (2007).
34. Boesze-Battaglia, K. & Schimmel, R. J. Cell membrane lipid composition and distribution: implications for cell function and lessons learned from photoreceptors and platelets. *J. Exp. Biol.* **200**, 2927–2936 (1997).
35. Munro, S. Lipid Rafts: Elusive or illusive? *Cell* **115**, 377–388 (2003).
36. Zachowski, A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* **294**, 1–14 (1993).
37. Boesze-Battaglia, K., Clayton, S. T. & Schimmel, R. J. Cholesterol redistribution within human platelet plasma membrane: Evidence for a stimulus-dependent event. *Biochemistry* **35**, 6664–6673 (1996).
38. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
39. Lindner, R. & Naim, H. Y. Domains in biological membranes. *Exp. Cell Res.* **315**, 2871–2878 (2009).
40. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J. *Molecular cell biology*. **5th**, (2004).
41. Sarrazin, S., Lamanna, W. C. & Esko, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 4952–4952 (2011).
42. Bishop, J. R., Schuksz, M. & Esko, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037 (2007).
43. Kolter, T. & Sandhoff, K. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Lett.* **584**, 1700–1712 (2010).
44. Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü. & Futaki, S., Gräslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, (2011) : 414729.
45. Jiao, C. Y., Delaroche, D., Burlina, F., D. Alves, I., Chassaing, G & Sagan, S. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J. Biol. Chem.* **284**, 33957–33965 (2009).

46. Fischer, R., Fotin-Mleczek, M., Hufnagel, H. & Brock, R. Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *ChemBiochem* **6**, 2126–2142 (2005).
47. Nakase, I., Tadokoro, A., Kaabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y & Futaki, S. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* **46**, 492–501 (2007).
48. Walrant, A., Correia, I., Jiao, C. Y., Lequin, O., Bent, E. H., Goasdoue, N., Lacombe, C., Chassaing, G., Sagan, S., D; Alves, I. Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 382–393 (2011).
49. Walrant, A., Vogel, A., Correia, I., Lequin, O., Olausson, B. E. S., Desbat, B., Sagan, S., D. Alves, I. Membrane interactions of two arginine-rich peptides with different cell internalization capacities. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 1755–1763 (2012).
50. Balayssac, S., Burlina, F., Convert, O., Bolbach, G., Chassaing, G & Lequin, O. Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: Interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency. *Biochemistry* **45**, 1408–1420 (2006).
51. Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y., Burlina, F., D. Alves, I., Lequin, O & Sagan, S. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan- dependent endocytosis. *FASEB J.* **27**, 738–749 (2013).
52. Ziegler, A. & Seelig, J. Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds. *Biophys. J.* **94**, 2142–2149 (2008).
53. Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R. S., Murray, B. A. & Wender, P. A. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9506–9507 (2004).
54. Nakase, I., Tanaka, G. & Futaki, S. Cell-penetrating peptides (CPPs) as a vector for the delivery of siRNAs into cells. *Mol. Biosyst.* **9**, 855–61 (2013).
55. Rothbard, J. B., Jessop, T. C. & Wender, P. A. Adaptive translocation: The role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 495–504 (2005).
56. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G. & Rothbard, J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res.* **56**, 318–325 (2000).
57. Verdurmen, W. P. R., Wallbrecher, R., Schmidt, S., Eilander, J., Bovee-Geurts, P., Fanghanel, S., Burck, J., Wadhwani, P., Ulrich, A. S., Brock, R. Cell surface clustering of heparan sulfate proteoglycans by amphipathic cell-penetrating peptides does not contribute to uptake. *J. Control. Release* **170**, 83–91 (2013).
58. Kirchhausen, T. *Cell.* **109**, 413–416 (2002).

59. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the Cell, Fifth Edition*. (2007).
60. Kaplan, I. M., Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J. Control. Release* **102**, 247–253 (2005).
61. Wadia, J. S., Stan, R. V & Dowdy, S. F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* **10**, 310–315 (2004).
62. Vercauteren, D., Vandenbroucke, R. E., Jones, A. T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S. C., Sanders, N. N & Braeckmans, K. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol. Ther.* **18**, 561–569 (2010).
63. Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F & Giacca, M. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 34141–34149 (2003).
64. Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B & Chernomordik, L. V. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 15300–15306 (2005).
65. Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., Jones, A.T., Sugiura, Y., Futaki, S. Cellular uptake of arginine-rich peptides: Roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* **10**, 1011–1022 (2004).
66. Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. & Brock, R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **8**, 848–866 (2007).
67. Rothe, R., Liguori, L., Villegas-Mendez, A., Marques, B., Grunwald, D., Drouet, E & Lenormand, J. L. Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. *J. Biol. Chem.* **285**, 20224–20233 (2010).
68. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **587**, 1693–1702 (2013).
69. Berlose, J. P., Convert, O., Derossi, D., Brunissen, A & Chassaing, G. Conformational and associative behaviours of the third helix of antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem.* **242**, 372–386 (1996).
70. Kawamoto, S., Takasu, M., Miyakawa, T., Morikawa, R., Oda, T., Futaki, S., Nagao, H. Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation: Importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *J. Chem. Phys.* **134**, (2011).
71. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, a., Nicolas, P. & Shai, Y. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **31**, 12416–12423 (1992).
72. Lundberg, P & Langel, U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *Journal of Molecular Recognition*. **16**, 227–233 (2003).

73. Shai, Y. Active Antimicrobial Peptides. *Biopolymers* 236–248 (2002).
74. Nekhotiaeva, N., Elmquist, A., Rajarao, G. K., Good, L. & Stockholm, N. Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell- penetrating peptides. *FASEB J.* 1–15 (2003).
75. Deshayes, S., Plenat, T., Charnet, P., Divita, G., Molle, G., Heitz, F. Formation of transmembrane ionic channels of primary amphipathic cell-penetrating peptides. Consequences on the mechanism of cell penetration. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 1846–1851 (2006).
76. Wender, P. A., Galliher, W. C., Goun, E. a., Jones, L. R. & Pillow, T. H. The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 452–472 (2008).
77. Swiecicki, J. M., Bartsch, A., Tailhades, J., Di Pisa, M., Heller, B., Chassaing, G., Mansuy, C., Burlina, F., Lavielle, S. The efficacies of cell-penetrating peptides in accumulating in large unilamellar vesicles depend on their ability to form inverted micelles. *ChemBioChem* **15**, 884–891 (2014).
78. Jones, S. W., Christison, R., Bundell, K., Voyce, C. J., Brockbank, S. M., Newham, P., Lindsay, M. A. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 1093–1102 (2005).
79. Lundberg, M. & Johansson, M. Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat. Biotechnol.* **19**, 713–714 (2001).
80. Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., Lebleu, B. Cell-penetrating peptides: A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **278**, 585–590 (2003).
81. Adams, S. R. & Tsien, R. Y. Imaging the influx of cell-penetrating peptides into the cytosol of individual live cells. *Handbook of cell-penetrating peptides* 505–513.
82. Drin, G., Mazel, M., Clair, P., Mathieu, D., Kaczorek, M & Temsamani, J. Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide: Role of lipid-binding affinity. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1304–1314 (2001).
83. Hällbrink, M., Floren, A., Elmquist, A., Pooga, M., Bartfai, T., Langel, U. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1515**, 101–109 (2001).
84. Palm, C., Jayamanne, M., Kjellander, M. & Hällbrink, M. Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1768**, 1769–1776 (2007).
85. Burlina, F., Sagan, S., Bolbach, G. & Chassaing, G. Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**, 4244–4247 (2005).
86. Padari, K., Saalik, P., Hansen, M., Koppel, K., Raid, R., Langel, U & Pooga, M. Cell transduction pathways of transportans. *Bioconjug. Chem.* **16**, 1399–1410 (2005).

87. Kang, S. H., Cho, M. J. & Kole, R. Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development. *Biochemistry* **37**, 6235–6239 (1998).
88. Erbacher, P., Roche, a C., Monsigny, M. & Midoux, P. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp. Cell Res.* **225**, 186–194 (1996).
89. Anko, M., Majhenc, J., Kogej, K., Sillard, R., Langel, U., Anderluh, G., Zorko, Matjaz. Influence of stearyl and trifluoromethylquinoline modifications of the cell penetrating peptide TP10 on its interaction with a lipid membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 915–924 (2012).
90. Lo, S. L. & Wang, S. An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials* **29**, 2408–2414 (2008).
91. Berg, K., Selbo, P. K., Tjelle, T. E., Rodal, S. K., Hogset, A. Photochemical internalization: A novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res.* **59**, 1180–1183 (1999).
92. Shiraishi, T. & Nielsen, P. E. Photochemically enhanced cellular delivery of cell penetrating peptide-PNA conjugates. *FEBS Lett.* **580**, 1451–1456 (2006).
93. Räägel, H., Hein, M., Kriiska, A., Saalik, P., Floren, A., Langel, U., Pooga, M. Cell-penetrating peptide secures an efficient endosomal escape of an intact cargo upon a brief photo-induction. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4825–4839 (2013).
94. Futaki, S., Ohashi, W., Ueda, K., Harashima, H & Sugiura, Y. Stearylized arginine-rich peptides: A new class of transfection systems. *Bioconjug. Chem.* **12**, 1005–1011 (2001).
95. Seebach, D. & Matthews, J. L. β -Peptides: a surprise at every turn. *Chem. Commun.* **1**, 2015–2022 (1997).
96. Umezawa, N., Gelman, M. A, Haigis, M. C., Raines, R. T. & Gellman, S. H. Translocation of a beta-peptide across cell membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 368–369 (2002).
97. Rueping, M., Mahajan, Y., Sauer, M. & Seebach, D. Cellular uptake studies with beta-peptides. *Chembiochem* **3**, 257–259 (2002).
98. Abes, R., Moulton, H. M., Clair, P., Chernomordik, L. V & Lebleu, B. Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)₄ peptides: Structure-activity studies. *Nucleic Acids Res.* **36**, 6343–6354 (2008).
99. Abes, S., Moulton, H. M., Clair, P., Prevot, P., Lebleu, B. Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)₄ peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents. *J. Control. Release* **116**, 304–313 (2006).
100. Crespo, L., Sanclimens, G., Pons, M., Albericio, F & Giral, E. Peptide dendrimers based on polyproline helices. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 8876–8883 (2002).

101. Fernández-Carneado, J., Kogan, M. J., Castel, S. & Giralt, E. Potential peptide carriers: Amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of γ -zein. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 1811–1814 (2004).
102. Pujals, S., Fernandez-Carneado, J., Kogan, M. J., Martinez, J., Cavelier, F & Giralt, E. Replacement of a proline with silaproline causes a 20-fold increase in the cellular uptake of a pro-rich peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 8479–8483 (2006).
103. Fillon, Y. A., Anderson, J. P. & Chmielewski, J. Cell penetrating agents based on a polyproline helix scaffold. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11798–11803 (2005).
104. Tam, J. P. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 5409–5413 (1988).
105. Futaki, S., Nakase, I., Suzuki, T., Youjun, Z. & Sugiura, Y. Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: Flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides. *Biochemistry* **41**, 7925–7930 (2002).
106. Wender, P. A., Kreider, E., Pelkey, E. T., Rothbard, J. & VanDeusen, C. L. Dendrimeric molecular transporters: Synthesis and evaluation of tunable polyguanidino dendrimers that facilitate cellular uptake. *Org. Lett.* **7**, 4815–4818 (2005).
107. Aussedat, B., Dupont, E., Sagan, S., Joliot, A., Lavielle, S., Chassaing, G & Burlina, F. Modifications in the chemical structure of Trojan carriers: impact on cargo delivery. *Chem. Commun.* 1398–1400 (2008).
108. Eichholtz, T., de Bont, D. B., de Widt, J., Liskamp, R. M. & Ploegh, H. L. A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J. Biol. Chem.* **268**, 1982–1986 (1993).
109. O'Brian, C. A., Ward, N. E., Liskamp, R. M., de Bont, D. B. & van Boom, J. H. N-myristyl-Lys-Arg-Thr-Leu-Arg: A novel protein kinase C inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 49–57 (1990).
110. Pham, W., Kircher, M. F., Weissleder, R. & Tung, C. H. Enhancing membrane permeability by fatty acylation of oligoarginine peptides. *ChemBioChem* **5**, 1148–1151 (2004).
111. Shirazi, A. N., Oh, D., Tiwari, R. K., Sullivan, B., Gupta, A., Bothun, G. D & Parang, K. Peptide-amphiphile containing arginine and fatty acyl chains as molecular transporters. *Mol. Pharm.* **10**, 1–26 (2013).
112. Bode, S. A., Thevenin, M., Bechara, C., Sagan, S., Bregant, S., Lavielle, S., Chassaing, G & Burlina, F. Self-assembling mini cell-penetrating peptides enter by both direct translocation and glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *Chem. Commun.* **48**, 7179–7181 (2012).
113. Mandal, D., Nasrolahi Shirazi, A. & Parang, K. Cell-penetrating homochiral cyclic peptides as nuclear-targeting molecular transporters. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 9633–9637 (2011).
114. Lättig-Tünnemann, G., Prinz, M., Hoffmann, D., Behlke, J., Palm-Apergi, C., Morano, I., Herce, D. H & Cardoso, M. C Backbone rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Nat. Commun.* **2**, 453 (2011).

115. Rothbard, J. B., Kreider, E., VanDeusen, C. L., Wright, L., Wylie, B. L & Wender, P. A. Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: Role of backbone spacing in cellular uptake. *J. Med. Chem.* **45**, 3612–3618 (2002).
116. Oh, D., Darwish, S. A., Shirazi, A. N., Tiwari, R. K. & Parang, K. Amphiphilic Bicyclic Peptides as Cellular Delivery Agents. *ChemMedChem.* **9**, 2449–2453 (2014).
117. Oh, D., Shirazi, A. N., Northup, K., Sullivan, B., Tiwari, R. K., Bisoffi, M & Parang, K. Enhanced cellular uptake of short polyarginine peptides through fatty acylation and cyclization. *Mol. Pharm.* **11**, 2845–2854 (2014).
118. Qian, Z., Liu, T., Briesewitz, R., Barrios, A. M., Jhiang, S. M & Pei, D. Efficient delivery of cyclic peptides into mammalian cells with short sequence motifs. *ACS ChemBiol.* **15**, 423–431 (2013).
119. Qian, Z., Larochelle, J., Jiang, B., Lian, W., Hard, R. L., Selner, N. G., Luechapanichkul, R., Barrios, A. M & Pei, D. Early endosomal escape of a cyclic cell-penetrating peptide allows effective cytosolic cargo delivery. *Biochemistry* **53**, 4034–4046 (2014).
120. Hruby, V. J. Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 847–858 (2002).
121. Katayama, S., Hirose, H., Takayama, K., Nakase, I. & Futaki, S. Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J. Control. Release* **149**, 29–35 (2011).
122. Lee, J. S. & Tung, C.-H. Lipo-oligoarginines as effective delivery vectors to promote cellular uptake. *Mol. Biosyst.* **6**, 2049–2055 (2010).
123. Deshayes, S., Gerbal-Chaloin, S., Morris, M. C., Aldrian-Herrada, G., Charnet, P., Divita, G., Heitz, F. On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1667**, 141–147 (2004).
124. Saito, G., Swanson, J. a & Lee, K.-D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 199–215 (2003).
125. Quibell, M., Packman, L. C. & Johnson, T. Synthesis of the 3-repeat region of human tau-2 by the solid phase assembly of backbone amide-protected segments. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11656–11668 (1995).
126. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science.* **266**, 776–977 (1994).
127. Kent, S. B. H. Total chemical synthesis of proteins. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 338–351 (2009).
128. Lu, W., Qasim, M. a. & Kent, S. B. H. Comparative total syntheses of turkey ovomucoid third domain by both stepwise solid phase peptide synthesis and native chemical ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8518–8523 (1996).

129. Hackeng, T. M., Griffin, J. H. & Dawson, P. E. Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10068–10073 (1999).
130. Johnson, E. C. B. & Kent, S. B. H. Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6640–6646 (2006).
131. Zhang, L. & Tam, J. P. Synthesis and application of unprotected cyclic peptides as building blocks for peptide dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2363–2370 (1997).
132. Mende, F. & Seitz, O. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Based Solid-Phase Synthesis of Peptide α -Thioesters. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50**, 1232–1240 (2011).
133. Kenner, G. W., McDermott, J. R. & Sheppard, R. C. The safety catch principle in solid phase peptide synthesis. *Chem. Commun.* **426**, 636–637 (1971).
134. Ingenito, R., Bianchi, E., Fattori, D. & Pessi, A. Solid phase synthesis of peptide C-Terminal thioesters by Fmoc/ t -Bu chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 11369–11374 (1999).
135. Burlina, F., Morris, C., Behrendt, R., White, P. & Offer, J. Simplifying native chemical ligation with an N-acylsulfonamide linker. *Chem. Commun.* **48**, 2579–2581 (2012).
136. Blanco-Canosa, J. B. & Dawson, P. E. An efficient Fmoc-SPPS approach for the generation of thioester peptide precursors for use in native chemical ligation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 6851–6855 (2008).
137. Botti, P., Villain, M., Manganiello, S. & Gaertner, H. Native chemical ligation through in situ O to S acyl shift. *Org. Lett.* **6**, 4861–4864 (2004).
138. Hojo, H., Onuma, Y., Akimoto, Y., Nakahara, Y. & Nakahara, Y. N -Alkyl cysteine-assisted thioesterification of peptides. **48**, 25–28 (2007).
139. Kang, J., Richardson, J. P. & Macmillan, D. 3-Mercaptopropionic acid-mediated synthesis of peptide and protein thioesters. *Chem. Commun. (Camb)*. **6**, 407–9 (2009).
140. Kang, J. & Macmillan, D. Peptide and protein thioester synthesis via N \rightarrow S acyl transfer. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 1993 (2010).
141. Ollivier, N., Dheur, J., Mhidia, R., Blanpain, A. & Melnyk, O. Bis (2-sulfanylethyl) amino native peptide ligation. *Org. Lett.* **12**, 5238–5241 (2010).
142. Tsuda, S., Shigenaga, A., Bando, K. & Otaka, A. N,S acyl-transfert-mediated synthesis of peptide thioesters using anilide derivatives. *Org. Lett.* **42**, 823–826 (2009).
143. Burlina, F., Papageorgiou, G., Morris, C., White, P. D. & Offer, J. Insitu thioester formation for protein ligation using α -methylcysteine. *Chem. Sci.* **5**, 766–770 (2014).
144. Kent, S. B. H. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *int. J. Pept. Protein Res* **40**, 180–193 (1992).

145. Wan, Q. & Danishefsky, S. J. Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: A powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 9248–9252 (2007).
146. Rohde, H., Schmalisch, J., Harpaz, Z., Diezmann, F. & Seitz, O. Ascorbate as an alternative to thiol additives in native chemical ligation. *ChemBioChem* **12**, 1396–1400 (2011).
147. Hackenberger, C. P. R. & Schwarzer, D. chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins. *Angewandte*. 10030–10074 (2008).
148. Topping, R. J., Nuiry, I., Mastriona, J. & Moss, J. A. Optimized ‘ inverse activation ’ methodology for esterification of hydroxyl-functionalized resins. **49**, 2907–2910 (2008).
149. Riedl, J., Crevenna, A. H., Werb, Z., Sixt, M & Wedlich-Soldner, R. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat.Methods*. **5**, 605-612 (2008).
150. Theodore, L., Derossi, D., Chassaing, G., Llirbat, B., Kubes, M., Jordan, P., Chneiweiss, H., Godement, P & Prochiantz, A. Intraneuronal delivery of protein to growth cone collapse leads. *J. Neurosci.* **15**, 7158–7167 (1995).
151. Marengo, B., De Ciucis, C., Marinari, U. M & Domenicotti, C. Protein Kinase C: an attractive target for cancer therapy. *Cancers*. **3**, 531–567 (2011).
152. House, C & Kemp, B. E. Protein Kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* **238**, 1726–8 (1987).
153. Burlina, F., Sagan, S., Bolbach, G. & Chassaing, G. A direct approach to quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **1**, 200–205 (2006).
154. Aubry, S., Burlina, F., Dupont, E., Delaroche, D., Joliot, A., Lavielle, S., Chassaing, G & Sagan, S. Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides. *FASEB J.* **23**, 2956–2967 (2009).
155. Dupont, E., Prochiantz, A. & Joliot, A. Identification of a signal peptide for unconventional secretion. **282**, 8994–9000 (2007).
156. Swiecicki, J. M., Di Pisa, M., Lippi, F., Chwetzoff, S., Mansuy, C., Trugnan, G., Chassaing, G., Lavielle, S., Burlina, F. Unsaturated acyl chains dramatically enhanced cellular uptake by direct translocation of a minimakist oligo-arginine-lipo peptide. *Chem. Commun.* **51**, 14656–14659 (2015).

VIII - PUBLICATION



Label-free measurement of histone lysine methyltransferases activity by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry



Karine Guitot^{a,b,c}, Silvia Scarabelli^{a,b,c}, Thierry Drujon^{a,b,c}, Gérard Bolbach^{a,b,c,d}, Mehdi Amoura^{a,b,c}, Fabienne Burlina^{a,b,c}, Albert Jeltsch^e, Sandrine Sagan^{a,b,c}, Dominique Guianvarc'h^{a,b,c,*}

^a Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, LBM, 4, place Jussieu, F-75005 Paris, France

^b Ecole Normale Supérieure-PSL Research University, Département de Chimie, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France

^c CNRS, UMR 7203 LBM, F-75005 Paris, France

^d Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine, IBPS / FR 3631, Plateforme de Spectrométrie de Masse et Protéomique, 7-9 Quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

^e Institute of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University Stuttgart, Pfaffenwaldring 55, 70569 Stuttgart, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2014

Received in revised form 2 April 2014

Accepted 7 April 2014

Available online 15 April 2014

Keywords:

Histone lysine methyltransferase

H3K4 methyltransferase

Peptide methylation assay

MALDI-TOF

ELISA

Inhibitor

ABSTRACT

Histone lysine methyltransferases (HKMTs) are enzymes that play an essential role in epigenetic regulation. Thus, identification of inhibitors specifically targeting these enzymes represents a challenge for the development of new antitumor therapeutics. Several methods for measuring HKMT activity are already available. Most of them use indirect measurement of the enzymatic reaction through radioactive labeling or antibody-recognized products or coupled enzymatic assays. Mass spectrometry (MS) represents an interesting alternative approach because it allows direct detection and quantification of enzymatic reactions and can be used to determine kinetics and to screen small molecules as potential inhibitors. Application of mass spectrometry to the study of HKMTs has not been fully explored yet. We describe here the development of a simple reliable label-free MALDI-TOF MS-based assay for the detection and quantification of peptide methylation, using SET7/9 as a model enzyme. Importantly, the use of expensive internal standard often required in mass spectrometry quantitative analysis is not necessary in this assay. This MS assay allowed us to determine enzyme kinetic parameters as well as IC_{50} for a known inhibitor of this enzyme. Furthermore, a comparative study with an antibody-based immunosorbent assay showed that the MS assay is more reliable and suitable for the screening of inhibitors.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

The methylation of lysyl residues in the *N*-terminal tails of histones H3 and H4 is an important epigenetic modification that plays a key role in many important biological processes, including transcription silencing and activation, DNA repair, cell cycle control, and DNA methylation [1]. This histone modification is catalyzed by a family of enzymes called histone lysine methyltransferases (HKMTs).¹ HKMTs catalyze the transfer of one to three methyl groups from *S*-adenosyl-*L*-methionine (AdoMet) to the side-chain

amino group of the targeted lysyl residue, leading to the formation of methylated lysines and adenosylhomocysteine (AdoHcy) (Fig. 1). The histone code is complex and lysine methylation is associated with transcription activation or repression, depending on the position and the degree of methylation [2,3]. Indeed, methylation of histone H3 at lysyl residue 9 or 27 (H3K9 or H3K27) or histone H4 at lysine 20 (H4K20) is associated with gene silencing. In contrast, H3K4, H3K36, and H3K79 methylation is associated with active gene transcription [4]. Regulation of histone lysine methylation plays an important role not only in the basic functioning of normal cells but also in various pathologies including cancer [5]. HKMTs are therefore attractive targets for new antitumor agents [6,7]. Among HKMTs, SET7/9 plays a central role in the transcriptional activation of genes by adding a single methyl group to lysine 4 on histone H3 and is considered as a histone H3K4 monomethyltransferase (Fig. 1) [8,9]. In addition, SET7/9 can also methylate nonhistone protein substrates

* Corresponding author at: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, LBM, 4, place Jussieu, F-75005 Paris, France. Fax: +33 1 44 27 71 50.

E-mail address: dominique.guianvarc'h@upmc.fr (D. Guianvarc'h).

¹ Abbreviations used: AdoHcy, *S*-adenosyl-*L*-homocysteine; AdoMet, *S*-adenosyl-*L*-methionine; CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; DCC, dicyclohexylcarbodiimide; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assays; HKMT, histone lysine methyltransferases; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; TMB, tetramethyl benzidine.

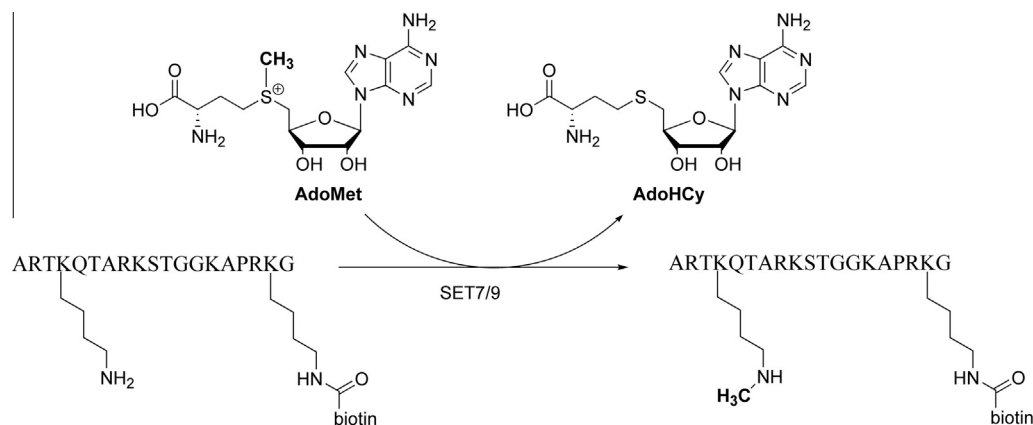


Fig. 1. Sequence of the substrate and reaction catalyzed by SET7/9.

[9] including tumor suppressor p53 [10], Tat protein of HIV [11], and estrogen receptor α [12] and it regulates transcriptional activity through alternate mechanisms [13]. SET7/9 was also reported as a novel coactivator of a transcription factor, the nuclear factor kappa-B that plays a key role in the regulation of proinflammatory genes [14]. Therefore, SET7/9 is a potent drug target for several diseases such as type II diabetes, AIDS, and hormone-dependent breast cancer and SET7/9 inhibitors also represent interesting tools in the understanding of the functional importance of these enzymes in cellular processes [15].

Several *in vitro* assays for HKMT activity using synthetic substrates have been developed, such as (i) those involving the use of radiolabeled AdoMet and the quantitation of the radiolabeled methylated peptide products [16,17], (ii) antibody-based immunosorbent (ELISA) assays [18–21], (iii) coupled enzymatic assays monitoring either the formation of homocysteine produced from AdoHcy (the second product of the HKMTs catalyzed reaction) by a thiol-sensitive reagent [22] or the formation of adenine produced from AdoHcy that is next converted in ATP and quantified with luciferase [23]. Each of these assays suffers from several and different drawbacks. The use of radiolabeled AdoMet is a more direct sensitive and reliable assay for monitoring enzyme activity, but it presents the disadvantage inherent in the handling of radioactive compounds. Methods such as ELISA or coupled enzyme assays using fluorescence have less technical constraints but require strong controls to compensate for the indirect detection and measurement of the methylated species. Indeed, the assays using fluorescence can lead to false positives and negatives readouts because of the fluorescence interference from fluorescent tracers, labeled substrates, and colored and fluorescent screened compounds. Mass spectrometry offers an interesting alternative to measure enzyme activities and screen inhibitors because it allows the direct detection and characterization of the substrates and products of the catalyzed reaction, avoiding derivatization of the analyzed compounds and all potential artifacts and complications associated with this. During the past years, matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has become a powerful tool for enzyme inhibitor study, thanks to the high speed of analysis, its sensitivity, reliability, cost-effective, and label-free readout, and has proven to be an interesting alternative to radioactive labeling or enzyme-linked immunosorbent assays [24]. For example, sensitive assays have recently been described to monitor aminoglycoside kinase [25] and protein kinase [26] activity. These two studies described the development of a MALDI-TOF MS approach for quantifying the activity of these enzymes and showed the potentiality of the technique for screening inhibitors.

With regard to histone modifications, mass spectrometry has been widely used as a versatile tool in the context of proteomic studies for the determination of substrate specificity and to achieve insights in the chromatin biology and the mechanisms of the epigenetic process [27,28]. In contrast, the application of mass spectrometry in the context of enzymologic studies to characterize HKMT kinetics or screening of small molecules as inhibitors of HKMT has not been fully explored yet. Recently, a liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS)-based AdoHcy detection assay for HMTs and its application in drug discovery has been reported [29]. Using this assay, Li et al. were able to measure kinetics for several histone methyltransferases and to study the mechanism of action of inhibitors.

In the present paper, we show that a label-free MALDI-TOF-based assay can constitute a simple, rapid, reliable, sensitive, and inexpensive method for the quantitative analysis of peptide methylation. This assay was applied to the study of SET7/9 (determination of the enzyme kinetic parameters and of IC₅₀ for a known inhibitor). Furthermore, we present a comparative study of this assay with an antibody-based immunosorbent assay involving anti-monomethyl-histone H3 (Lys4) antibody.

Materials and methods

Materials

Standard Boc amino acids, *p*-methylbenzhydrylamine-polystyrene resin (0.51 mmol NH₂/g), *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) were purchased from Novabiochem and Iris Biotech GmbH. Solvents (peptide synthesis grade) and other reagents were obtained from Applied Biosystems. Chemicals were purchased from Sigma–Aldrich, Acros Organics, and Organo Technic. Sinefungin was a generous gift of the chemical library from the Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, Gif sur Yvette, France). The AdoMet and sinefungin concentrations were determined by measuring the absorbance of the solution at 260 nm ($\epsilon = 15,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [31]. Commercial preparations of AdoMet were corrected for diastereomeric purity [32]. Anti-monomethyl-histone H3 (Lys4) was purchased from Millipore. High binding 96-well plates were purchased from Corning (Corning, NY).

Synthesis of biotinylated peptide substrate

The peptide ARTKQTARKSTGGKAPRK(Biot)G was assembled by stepwise solid-phase synthesis with an ABI 433A synthesizer (Applied Biosystems) starting from MBHA resin (substitution:

0.51 mmol/g). N^{α} -Boc-amino acids were coupled by DCC/HOBt. The biotin was coupled at the end of the synthesis, after deprotection of the N^{ϵ} -Fmoc-K18 with piperidine. The peptide was cleaved off from the resin by treatment with anhydrous HF (1 h, 0 °C) in the presence of 1.5 mL anisole and 0.25 mL dimethyl sulfide/g of peptide-resin. The purification was done by HPLC (Waters) with a flow rate of 5 mL/min and a linear gradient in 30 min from 10 to 40% acetonitrile in water–0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Purity of the peptide was assessed by analytical RP-HPLC and was found >95%.

Purification of SET7/9

The six-histidine-tagged SET7/9 human histone-lysine *N*-methyltransferase was obtained in pure form from an overproducing strain (*E. coli* BL21(DE3)/pLysS/pET28a(+)-H6-setd7) as previously described [4].

In vitro SET7/9 assay

A standard reaction mixture (20–200 μ L) consisted of 83 μ M AdoMet, 0.5–5 μ M SET7/9, 50 μ M peptide in reaction buffer (50 mM glycine, pH 9.8, 2 mM dithiothreitol (DTT), 25 μ g/mL BSA, 10% glycerol). A premixture without the peptide substrate was incubated at 37 °C for 5 min and the reaction was initiated by the addition of the peptide substrate and incubated further for 3–60 min. The reaction was carried out at room temperature and samples were collected from the reaction vial at different time points to measure the conversion of peptide substrates to methylated products. The reaction was stopped by adding to the enzymatic mixture an equivalent volume of acidified water (H_2O , 0.2% TFA) leading to a final pH of 7 and each solution was cooled at 4 °C. These solutions were then used to perform MALDI-TOF analysis or in the ELISA assay. SET7/9 kinetic parameters were determined in the above conditions in smaller volumes (20 μ L) by measuring the enzymatic activity in 20 min at different AdoMet concentrations. Data were analyzed using a nonlinear regression analysis run on GraphPadPrism software to fit to Michaelis–Menten kinetics.

Immunochemifluorescence analysis

Coating microplates with streptavidin was performed by adding to each well 100 μ L of a solution of streptavidin at 10 μ g/mL in $NaHCO_3$ 100 mM, pH 9.6. The plate was incubated overnight at 4 °C. The wells were washed 5 times with 200 μ L of PBST buffer pH 7.4 (PBS 1X and 0.05% Tween 20) before use. Then 5 μ L of the cooled enzymatic mixture and 95 μ L of PBST were added to the streptavidin-coated microplate and incubated for 1 h. Each well was washed with PBST and then blocked with 100 μ L of 3% skim milk in PBST for 1 h at room temperature. Anti-monomethyl-histone H3 (Lys4) antibody (Millipore) (1:1000 in PBST) was added. The plate was left for 1 h at room temperature. The wells were washed 3 times with 200 μ L of PBS-T, then secondary antibody anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-linked antibody (1:2000 in PBS-T) (GE Healthcare) was added, and the plate was incubated for 1 h. The wells were washed 3 times with PBST. The amount of 100 μ L/well of tetramethyl benzidine (TMB) was added in the dark, at room temperature for 20 min. After this time another 100 μ L/well of H_2SO_4 2 M was added and incubated at room temperature for 10 min before reading at 450 nm on a FLUOstar OPTIMA system microplate reader from BMG Labtech. A control assay containing all components, but without the SET7/9, was always simultaneously carried out and the absorption of this control was subtracted from the absorption of the enzymatic sample.

Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry analysis

MALDI-TOF mass spectrometry analyses of the synthesized peptide was performed in the ion-positive reflector mode on an ABI Voyager DE-Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) using as matrix a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 10 mg mL⁻¹) in $CH_3CN:H_2O:CF_3COOH$ (50:50:0.2). The laser energy was adjusted near the threshold of peptide ion production. The analysis was operated in delayed extraction mode using a 3 ns pulse nitrogen laser (337 nm) for desorption and ionization and an accelerating voltage of 20 kV. Average mass spectra from at least several hundred laser shots were recorded on different spots of the deposit. Calibration was performed using external standards (Proteomix 4, LaserBio Labs Sofia-Antipolis, France). For analysis of peptide methylation, aliquots of the diluted enzymatic mixture (5 μ L) were mixed with the HCCA matrix solution (5 μ L), deposited onto the MALDI plate, and allowed to dry in air overnight. Positive-ion MALDI-TOF-TOF mass spectra were recorded on a Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer instrument by selecting the following ions 2295 Da (unmethylated peptide) and 2309 Da (monomethylated peptide). The area of the $[M+H]^+$ signals (including all isotopes) of the methylated (A_{met}) and unmethylated peptides (A_{unmet}) was measured and the methylation rate was calculated by the following equation.

$$R = A_{met} / (A_{unmet} + A_{met}) * 100$$

All experiments were repeated independently at least in duplicates.

Z-factor determination

The average values means and standard deviations for positive and negative controls were calculated from 10 independent samples. Positive controls were run with the standard enzymatic reaction containing 1 μ M SET7/9 in the presence of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) at 37 °C for 20 min. The reaction was stopped and further treated as indicated above in the microplate either for the ELISA assay or for the MALDI assay. The final DMSO concentration on the plate is 1.25%. Negative controls were run under the same conditions except that SET7/9 was substituted by buffer.

Inhibition studies and determination of IC_{50} values for the SET7/9 inhibitors

Inhibitor stock solutions were prepared at 1 mM in DMSO. Working solutions were obtained by dilution in DMSO at appropriate concentrations so that the final concentration of DMSO in the assay did not exceed 5% v:v.

An enzymatic mixture was prepared as described above and to 17 μ L of this mixture, 1 μ L of the inhibitor solution at various concentrations was added. This solution was preincubated at 37 °C for 5 min. The reaction was initiated by the addition of 2 μ L of a mix of AdoMet and peptide (1 mM and 500 μ M, respectively). The assays were performed and treated as described above. For the ELISA assay, UV absorption at 450 nm obtained for a control well containing a standard SET7/9 assay without inhibitor was set at 100% of SET7/9 activity. The absorption values obtained for the various inhibitor concentrations were then converted into a SET7/9 activity percentage and plotted against inhibitor concentration. All data points were determined in duplicate. IC_{50} values were obtained by fitting the data to the following equation, using a nonlinear regression analysis run on GraphPadPrism software: $V/V_0 = 1/(1 + 1/IC_{50})$.

Results and discussion

Quantitative method validation by MALDI-TOF-MS and calibration curve

Several studies using MALDI-TOF-MS for the monitoring of enzymatic conversions have been reported [25,26,33–39]. Indeed, MALDI-MS has several advantages over other analytical techniques including a very high sensitivity (detection of low femtomole levels of peptides) and ease and speed of analysis. In addition, MALDI is highly tolerant to the presence of salts, buffers, and non-ionic detergents. However, cautions should be taken for quantitative analysis of peptides to avoid intrinsic problems associated with MALDI-TOF MS that include low shot-to-shot reproducibility, inhomogeneous distribution of analyte molecules within the matrix crystal, signal suppression, and nonlinear detector response. To circumvent these deleterious effects on quantitative MS analyses, internal standards are required. They must generally be chemically identical to the peptide of interest to prevent unforeseeable discrimination effects in the sample–matrix cocrystallization and desorption–ionization processes. In general, stable-isotope-labeled peptides are used because isotopic pairs respond identically in MALDI-TOF MS analysis. In the study herein, in order to develop a simple and reliable assay to measure enzymatic peptide methylation, we investigated if the relative amounts of methylated and unmethylated peptides present in a sample could be directly quantified from the areas of both peptides signals on the mass spectrum and without requirement of an isotopical-labeled internal standard. For this purpose, we examined whether the methylated and unmethylated peptides have the same efficiency of desorption/ionization over a range of different peptide proportions. Avoiding the use of an isotopically labeled internal standard in the enzymatic assay would simplify the procedure and circumvent the time- and cost-consuming synthesis of isotopically labeled peptides. Our assay uses as substrate a synthetic peptide functionalized by a biotin on its C-terminal end because we were interested in comparing this approach with an existing ELISA assay that uses biotin/streptavidin recognition. A histone H3 N-tail peptide containing 1–21 amino acids was chosen as substrate. Fig. 2 shows the MALDI-TOF MS profiles obtained when the peptide substrate was incubated in the presence or absence of SET7/9 as described in the experimental section. Monomethylation of the peptide results in a mass increase of 14 Da. Furthermore, we verified by MS/MS fragmentation the position of the methylation (Supplementary Table 1) and as expected with SET7/9 activity, only lysine 4 of the peptide was methylated.

To avoid the use of internal standard and further purification steps we based our quantification method on the direct analysis of product to substrate ratios. To validate this strategy, we first investigated if the MS intensity signals were correlated with the experimental quantities in a linear mode. Thus, mixtures of unmethylated and methylated peptides (50 μ M total concentration) were spotted at known molar ratios (0.05, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, 1.66, 2.5, and 4) onto the MALDI target, in duplicates for each dilution (Fig. 3). The ratio of peak areas as a function of the molar ratio shows a linear variation. The slope of 1 demonstrates that methylated and the unmethylated substrates have similar ionization properties, allowing the use of product to substrate ratio for direct quantification of the enzymatic methylation rate. The limit of detection was arbitrarily set to 0.05 P/S ratio. This ratio corresponds to a 5% product conversion which is below the lowest amount of product detected in our experiments. Similar experiments were performed with a deuterated peptide as internal standard. In the same manner, mixtures of substrate and an equivalent deuterated peptide were spotted at known molar ratios (1, 1.6, 2, 3,

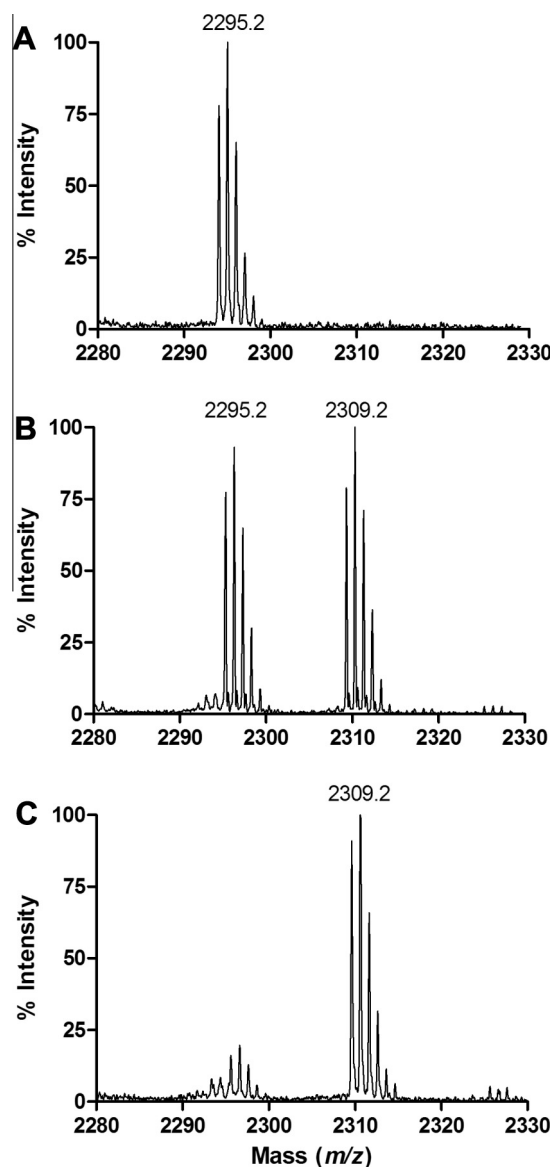


Fig. 2. MALDI-TOF MS spectra of the peptide substrate of SET7/9 (m/z 2295.27) in its enzymatic reaction mixture (A) before addition of enzyme; (B) incubated with SET7/9 for 10 min leading to the formation of the expected methylated product (m/z 2309.29); (C) incubated with SET7/9 for 30 min. The position of the methylation was confirmed by MS/MS fragmentation by TOF/TOF analysis (Supplementary Table 1).

5) onto the MALDI target. The analysis of these data led to comparable linear regression as for the P/S fractions (Supplementary Fig. S1). These results support our primary hypothesis and demonstrate that the MALDI analysis of product to substrate fraction is sufficient to have a precise quantification of SET7/9 enzymatic activity.

Assay development for SET7/9

First, we studied the effect of SET7/9 concentration in the MALDI-TOF quantification assay. Fig. 4A shows that the SET7/9 activity using 83 μ M AdoMet and 50 μ M peptide in all experiments varies linearly with enzyme concentration, from 0.5 up to 5 μ M. Hence, for standard MALDI-TOF assays a concentration of 0.5 μ M of SET7/9 was used, a concentration comparable to that used in the radiometric assay reported by Trievel et al. [40]. Using these

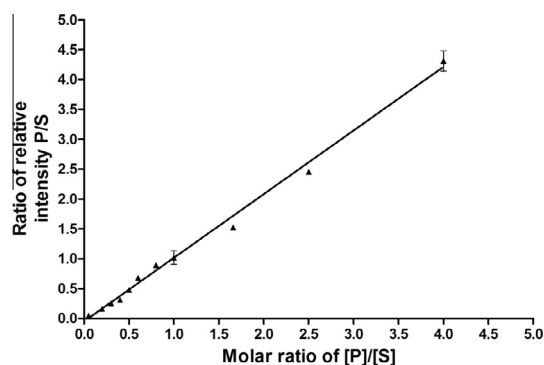


Fig. 3. Calibration curve by plotting the ratio of signal intensities of methylated product (P) to unmethylated substrate (S) as a function of the molar ratio of P to S. Mixture of substrate and product totaling 50 μM ($y = 1.065x + 0.04$ with $R^2 = 0.99$). The data represent the mean values and standard error of mean for at least three independent assays.

conditions, we obtained a specific activity of 2.33 mol/min/mol for SET7/9, comparable to that described. We investigated the linearity of the signal with respect to variation of the incubation time. Fig. 4B shows that the rate of product formation is constant for 20 min.

We next measured the kinetic parameters for SET7/9 using the MALDI-TOF MS assay. As shown in Fig. 4C, SET7/9 exhibited saturation kinetics toward AdoMet in the presence of a saturating concentration of peptide, with a $K_{M, \text{AdoMet}}$ value of $9 \pm 2 \mu\text{M}$ and a k_{cat} value of $3.86 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$. These parameters are also consistent with those previously reported for SET7/9 using radioactive or coupled enzymatic assay ($K_{M, \text{Litt}} = 10\text{--}17 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 0.31\text{--}0.41 \text{ min}^{-1}$) [23,41].

Evaluation of SET7/9 inhibitor

To further validate the applicability of this assay for enzymatic studies, the effect of a known inhibitor of histone lysine methyltransferase was analyzed. As a reference compound, we chose the natural product sinefungin. Sinefungin is a natural AdoMet analog produced by *Streptomyces griseolus*, in which the sulfonium group is replaced by an amino group. Due to its structural analogy with AdoMet, it is known to act as a competitor cofactor of enzymes using AdoMet as a methyl donor such as, for example, DNA methyltransferase or cyclopropane fatty acid synthase [42,43]. Sinefungin was already characterized as an inhibitor of HMTase and especially of SET7/9 [25,30].

Using these conditions, we assessed the quality of the MALDI assay by calculating the statistical Z' -factor that is defined as follows:

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_{\text{HC}} + \sigma_{\text{LC}})}{(\mu_{\text{HC}} - \mu_{\text{LC}})}$$

where σ_{HC} and σ_{LC} are the standard deviations of the positive and negative controls, respectively, and μ_{HC} and μ_{LC} are the mean values of the positive and negative controls, respectively. We obtained a Z' -factor of 0.86 (Fig. 5A) corresponding to an excellent quality of the assay since it is characterized by a large gap between positive and negative controls and a low degree of deviation between replicate samples [44]. The same samples were also evaluated by an ELISA assay by using anti-monomethyl-histone H3 (Lys4) antibody and we obtained a Z' -factor of 0.56 (Fig. 5B) showing the limits of this latter method for the screening of HMT inhibitors. Fig. 6A shows a semilog plot of SET7/9 remaining activity as a function of sinefungin concentration. The IC_{50} value was $20 \pm 3 \mu\text{M}$. For sinefungin, this value is consistent with previously reported values by others [45], thereby confirming that the assay is suitable for inhibitor screening

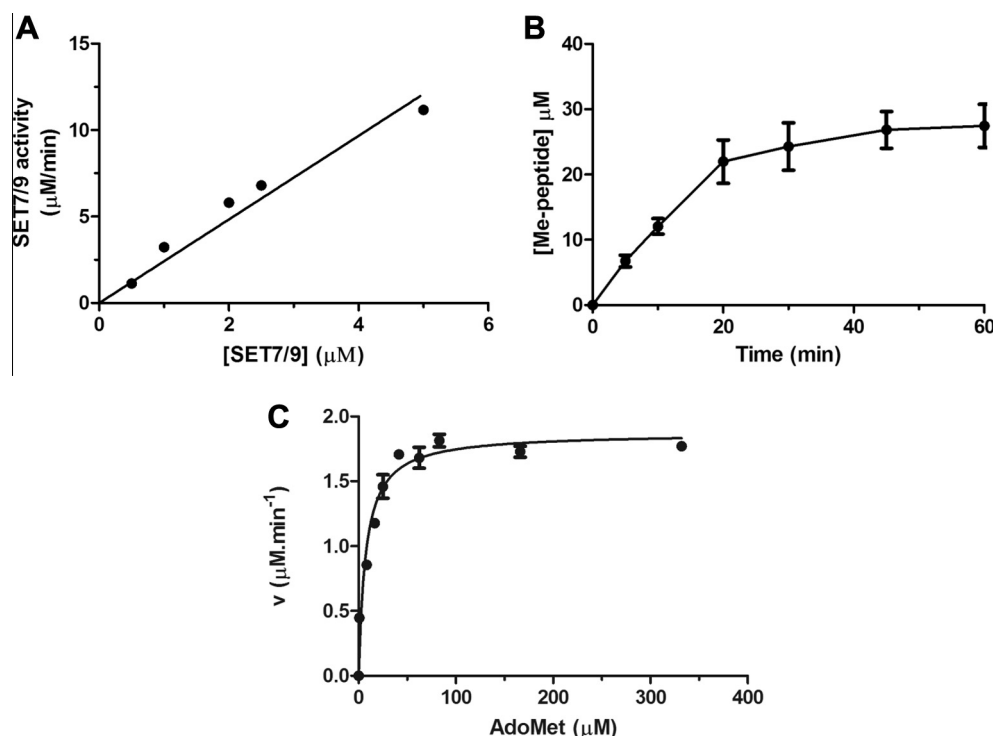


Fig. 4. Validation of the peptide methylation assay. (A) Dependence of SET7/9 activity on enzyme concentration. These experiments were performed with 83 μM AdoMet, 50 μM peptide substrate, and variable concentrations of SET7/9 from 0.5 to 5 μM . (B) Time course of methylated peptide formation during the assay at 0.5 μM enzyme, 83 μM AdoMet and 50 μM peptide. (C) Dependence of the rate of the SET7/9-catalyzed reaction on AdoMet concentration evaluated using the MALDI-TOF assay. These experiments were performed with 0.5 μM enzyme, 50 μM peptide substrate, and variable concentrations of AdoMet from 0.83 to 332 μM . The data were fitted to the standard equation $V = V_{\text{m}}[S]/(K_{\text{m}} + [S])$. The data represent the mean values and standard error of mean for at least three independent assays.

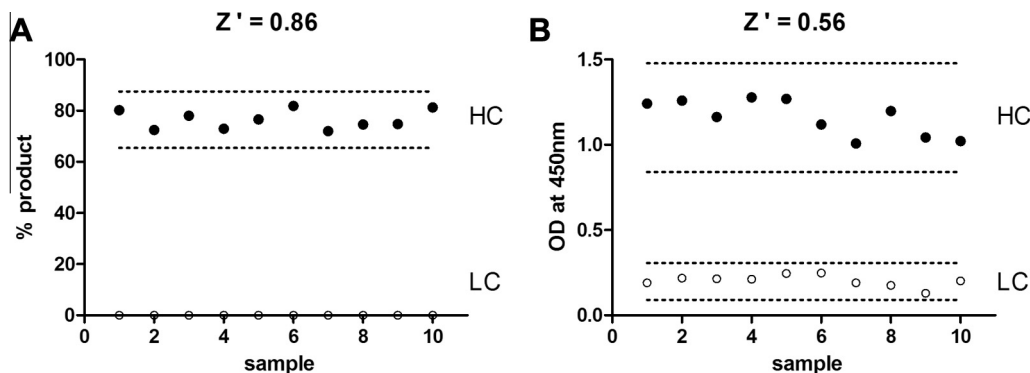


Fig.5. Z'-plot for the SET7/9 assay in the presence of (HC ●) and absence of (LC ○) enzyme using (A) MALDI-TOF assay or (B) ELISA assay.

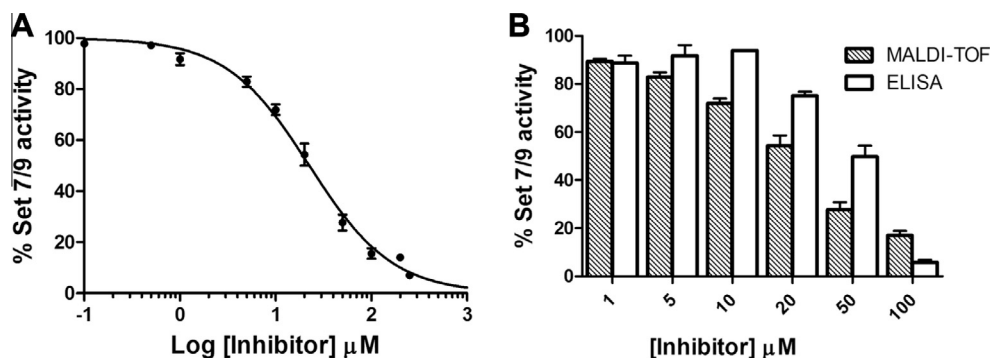


Fig.6. (A) Semilog plot of the SET7/9 activity versus inhibitor concentration using the MALDI-TOF MS-based assay. IC_{50} value was evaluated after fitting the concentration–inhibition plots by nonlinear regression through the GraphPad Prism software, with constant slope equations, on 3 independent experiments. Errors bars are represented at each concentration. (B) Comparison between the inhibitory activity of sinefungin on SET7/9 determined by MALDI-TOF MS-based assay (shaded column) and ELISA assay (open column) for a same sample. The data represent the mean values and standard error of mean for at least three independent assays.

studies. DMSO is a usual vehicle for inhibitors in solution. In the concentration–inhibition (IC_{50}) experiments its use was limited to 5% in each reaction assay. Further dilutions to stop the reaction and to prepare the sample for MALDI-TOF analysis led to a final concentration of 1.25% DMSO on the MALDI plate and this concentration does not affect matrix crystallization and ionization.

An aliquot of the same samples was analyzed by MALDI-TOF MS and by ELISA assay and the results are presented in Fig. 6B. Comparative analysis of these results shows differences regarding methylation rate quantification, leading to a shift in the IC_{50} value for sinefungin as well as differences in the Z'-factor value showing that the MS assay ensures a better reproducibility. Clearly, the ELISA assay is not sensitive enough to distinguish small differences in the inhibitor's effects according to its concentration. As the enzymatic reaction and quenching are common steps to both protocols, the comparison of both experiments in term of effectiveness is related to the sample treatment procedure before analysis and the measurement method. Indeed, in the protocol based on MALDI-TOF MS quantification, the samples are prepared in only two steps: aliquots of the enzymatic reaction mixture are simply mixed with the HCCA matrix solution followed by the sample transfer onto the MALDI target plate. Importantly, we showed that desalting (for example, with zip tip) or peptide purification steps are not required to obtain reliable results. Then MALDI-TOF MS analysis allows direct detection and quantification of the methylated peptide. On the other hand, ELISA assay is more time and cost consuming, since it requires many pipetting steps, multistage long incubation time, and several expensive reactants to indirectly detect the enzymatic modification. Both experiments were performed in parallel, so that we can underline the major advantages

of our MS method over the ELISA test, which are its ease and speed of implementation.

Conclusion

In the present study, we have developed a direct, simple, sensitive and reliable MALDI-TOF-based assay for studying the SET7/9 activity. The assay does not require any expensive functionalization of the peptide substrates, avoids the use of radioactivity, and does not require purification steps prior to MALDI analysis. Indeed, substrate biotinylation was only performed here to allow the study of its methylation by the ELISA assay. We showed that it is suitable for measuring enzyme activity and kinetics. This assay could be extended to other HKMTs. Furthermore, this assay allows the study of SET7/9 inhibitors as demonstrated by our study of sinefungin effect, a compound structurally related to AdoHcy. This assay is sensitive and convenient enough for screening and is much more reliable than the ELISA-based assay. Moreover, the direct nature of the MS measurement ensures the minimization of the false positive and false negative results that can affect other screening approaches. Lastly, each step of this method is quite simple, so that we could increase its efficiency by using liquid handling robotics and obtain the test automated from running the assay to transferring the sample to the MALDI target. Such application is under investigation.

Acknowledgment

We thank Dr. C. Guillou (ICSN, Gif sur Yvette, France) for the generous gift of sinefungin.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.006>.

References

- [1] C. Martin, Y. Zhang, The diverse functions of histone lysine methylation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 838–849.
- [2] B.D. Strahl, C.D. Allis, The language of covalent histone modifications, *Nature* 403 (2000) 41–45.
- [3] X. Zhang, H. Wen, X. Shi, Lysine methylation: beyond histones, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 44 (2012) 14–27.
- [4] X. Zhang, Z. Yang, S.I. Khan, J.R. Horton, H. Tamaru, E.U. Selker, et al., Structural basis for the product specificity of histone lysine methyltransferases, *Mol. Cell* 12 (2003) 177–185.
- [5] Y. He, I. Korboukh, J. Jin, J. Huang, Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 44 (2012) 70–79.
- [6] E.L. Greer, Y. Shi, Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance, *Nat. Rev. Genet.* 13 (2012) 343–357.
- [7] A. Spannhoff, A.-T. Hauser, R. Heinke, W. Sippl, M. Jung, The emerging therapeutic potential of histone methyltransferase and demethylase inhibitors, *ChemMedChem* 4 (2009) 1568–1582.
- [8] B. Xiao, C. Jing, J.R. Wilson, P.A. Walker, N. Vasishth, G. Kelly, et al., Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9, *Nature* 421 (2003) 652–656.
- [9] H.-B. Guo, H. Guo, Mechanism of histone methylation catalyzed by protein lysine methyltransferase SET7/9 and origin of product specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 8797–8802.
- [10] X. Zhang, T.C. Bruce, Mechanism of product specificity of AdoMet methylation catalyzed by lysine methyltransferases: transcriptional factor p53 methylation by histone lysine methyltransferase SET7/9, *Biochemistry* 47 (2008) 2743–2748.
- [11] S. Pagans, S.E. Kauder, K. Kaehlcke, N. Sakane, S. Schroeder, W. Dormeyer, et al., The cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription, *Cell Host Microbe* 7 (2010) 234–244.
- [12] K. Subramanian, D. Jia, P. Kapoor-Vazirani, D.R. Powell, R.E. Collins, D. Sharma, et al., Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase, *Mol. Cell* 30 (2008) 336–347.
- [13] A. Dhayalan, S. Kudithipudi, P. Rathert, A. Jeltsch, Specificity analysis-based identification of new methylation targets of the SET7/9 protein lysine methyltransferase, *Chem. Biol.* 18 (2011) 111–120.
- [14] Y. Li, M.A. Reddy, F. Miao, N. Shanmugam, J.-K. Yee, D. Hawkins, et al., Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF- κ B-dependent inflammatory genes relevance to diabetes and inflammation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 26771–26781.
- [15] T. Wagner, M. Jung, New lysine methyltransferase drug targets in cancer, *Nat. Biotechnol.* 30 (2012) 622–623.
- [16] H. Gowher, X. Zhang, X. Cheng, A. Jeltsch, Avidin plate assay system for enzymatic characterization of a histone lysine methyltransferase, *Anal. Biochem.* 342 (2005) 287–291.
- [17] P. Rathert, X. Cheng, A. Jeltsch, Continuous enzymatic assay for histone lysine methyltransferases, *BioTechniques* 43 (2007) (602, 604, 606 passim).
- [18] K. Sarma, K. Nishioka, D. Reinberg, Tips in analyzing antibodies directed against specific histone tail modifications, *Methods Enzymol.* 376 (2004) 255–269.
- [19] A.J. Bannister, T. Kouzarides, Histone methylation: recognizing the methyl mark, in: C.D. Allis, C. Wu (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2003, pp. 269–288.
- [20] A.M. Quinn, A. Allali-Hassani, M. Vedadi, A. Simeonov, A chemiluminescence-based method for identification of histone lysine methyltransferase inhibitors, *Mol. Biosyst.* 6 (2010) 782–788.
- [21] S. Kudithipudi, D. Kusevic, A. Jeltsch, Non-radioactive protein lysine methyltransferase microplate assay based on reading domains, *ChemMedChem* 9 (2014) 554–559.
- [22] E. Collazo, J.-F. Couture, S. Bulfer, R.C. Trievel, A coupled fluorescent assay for histone methyltransferases, *Anal. Biochem.* 342 (2005) 86–92.
- [23] G. Ibáñez, J.L. McBean, Y.M. Astudillo, M. Luo, An enzyme-coupled ultrasensitive luminescence assay for protein methyltransferases, *Anal. Biochem.* 401 (2010) 203–210.
- [24] K.D. Greis, Mass spectrometry for enzyme assays and inhibitor screening: an emerging application in pharmaceutical research, *Mass Spectrom. Rev.* 26 (2007) 324–339.
- [25] A.M.E. Smith, E. Awuah, A. Capretta, J.D. Brennan, A matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry method for direct screening of small molecule mixtures against an aminoglycoside kinase, *Anal. Chim. Acta* 786 (2013) 103–110.
- [26] L. Ji, J.-H. Wu, Q. Luo, X. Li, W. Zheng, G. Zhai, et al., Quantitative mass spectrometry combined with separation and enrichment of phosphopeptides by titania coated magnetic mesoporous silica microspheres for screening of protein kinase inhibitors, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2284–2291.
- [27] S. Sidoli, L. Cheng, O.N. Jensen, Proteomics in chromatin biology and epigenetics: elucidation of post-translational modifications of histone proteins by mass spectrometry, *J. Proteomics* 75 (2012) 3419–3433.
- [28] L. Afjehi-Sadat, B.A. Garcia, Comprehending dynamic protein methylation with mass spectrometry, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17 (2013) 12–19.
- [29] S. Li, X.J. Gu, Q. Hao, H. Fan, L. Li, S. Zhou, et al., An LC/MS-based, generic detection method for biochemical assay and hit discovery of histone methyltransferases, *Anal. Biochem.* 443 (2013) 214–221.
- [30] W. Zheng, G. Ibáñez, H. Wu, G. Blum, H. Zeng, A. Dong, et al., Sinefungin derivatives as inhibitors and structure probes of protein lysine methyltransferase SETD2, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 18004–18014.
- [31] S.K. Shapiro, D.J. Ehninger, Methods for the analysis and preparation of adenosylmethionine and adenosylhomocysteine, *Anal. Biochem.* 15 (1966) 323–333.
- [32] J.L. Hoffman, Chromatographic analysis of the chiral and covalent instability of S-adenosyl-L-methionine, *Biochemistry* 25 (1986) 4444–4449.
- [33] Y. Liu, Y. Li, J. Liu, C. Deng, X. Zhang, High throughput enzyme inhibitor screening by functionalized magnetic carbonaceous microspheres and graphene oxide-based MALDI-TOF-MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 2188–2198.
- [34] E. Sibille, E. Bana, W. Chaoui, M. Diederich, D. Bagrel, P. Chaimbault, Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases, *Anal. Biochem.* 430 (2012) 83–91.
- [35] R. Rathore, J.J. Corr, D.T. Lebre, W.L. Seibel, K.D. Greis, Extending matrix-assisted laser desorption/ionization triple quadrupole mass spectrometry enzyme screening assays to targets with small molecule substrates, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 3293–3300.
- [36] K.D. Greis, S. Zhou, T.M. Burt, A.N. Carr, E. Dolan, V. Easwaran, et al., MALDI-TOF MS as a label-free approach to rapid inhibitor screening, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2006) 815–822.
- [37] R. Rathore, J. Corr, G. Scott, P. Vollmerhaus, K.D. Greis, Development of an inhibitor screening platform via mass spectrometry, *J. Biomol. Screen.* 13 (2008) 1007–1013.
- [38] S. Lü, Q. Luo, X. Li, J. Wu, J. Liu, S. Xiong, et al., Inhibitor screening of protein kinases using MALDI-TOF MS combined with separation and enrichment of phosphopeptides by TiO₂ nanoparticle deposited capillary column, *Analyst* 135 (2010) 2858–2863.
- [39] H. Wang, R. Cao, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, C. Borchers, P. Tempst, et al., Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase, *Mol. Cell* 8 (2001) 1207–1217.
- [40] R.C. Trievel, B.M. Beach, L.M.A. Dirk, R.L. Houtz, J.H. Hurley, Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase, *Cell* 111 (2002) 91–103.
- [41] L.M.A. Dirk, E.M. Flynn, K. Dietzel, J.-F. Couture, R.C. Trievel, R.L. Houtz, Kinetic manifestation of processivity during multiple methylations catalyzed by SET domain protein methyltransferases, *Biochemistry* 46 (2007) 3905–3915.
- [42] A. Ceccaldi, A. Rajavelu, C. Champion, C. Rampon, R. Jurkowska, G. Jankevicius, et al., C5-DNA methyltransferase inhibitors: from screening to effects on zebrafish embryo development, *ChemBioChem* 12 (2011) 1337–1345.
- [43] D. Guianvarc’h, T. Drujon, T.E. Leang, F. Courtois, O. Ploux, Identification of new inhibitors of *E. coli* cyclopropane fatty acid synthase using a colorimetric assay, *Biochim. Biophys. Acta* 1764 (2006) 1381–1388.
- [44] J.-H. Zhang, T.D.Y. Chung, K.R. Oldenburg, A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *J. Biomol. Screen.* 4 (1999) 67–73.
- [45] N. Gauthier, M. Caron, L. Pedro, M. Arcand, J. Blouin, A. Labonté, et al., Development of homogeneous nonradioactive methyltransferase and demethylase assays targeting histone H3 lysine 4, *J. Biomol. Screen.* 17 (2012) 49–58.