

# UNIVERSITE MONTPELLIER 1 - PHARMACIE

T H E S E

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1**

Discipline : Chimie - Biologie

Ecole doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement par

**LECIGNE David**

le 04 janvier 2011

## **CONCEPTION ET EVALUATION DE NOUVEAUX PEPTIDES INTERNALISANTS**

Membres du Jury :

<b>Pr. JAMART-GREGOIRE Brigitte</b> , Professeur de l'ENSIC-INPL, Nancy	Rapporteur
<b>Dr. PELEGRIN André</b> , Directeur de Recherche à l'INSERM, Montpellier	Examineur
<b>Dr. SAGAN Sandrine</b> , Directrice de Recherche CNRS, Paris	Rapporteur
<b>Dr. SUBRA Gilles</b> , Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie, Montpellier	Examineur
<b>Dr. VIVES Eric</b> , Maître de conférences à la Faculté des Sciences, Montpellier	Directeur de thèse

# UNIVERSITE MONTPELLIER 1 - PHARMACIE

T H E S E

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1**

Discipline : Chimie - Biologie

Ecole doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement par

**LECIGNE David**

le 04 janvier 2011

## **CONCEPTION ET EVALUATION DE NOUVEAUX PEPTIDES INTERNALISANTS**

Membres du Jury :

<b>Pr. JAMART-GREGOIRE Brigitte</b> , Professeur de l'ENSIC-INPL, Nancy	Rapporteur
<b>Dr. PELEGRIN André</b> , Directeur de Recherche à l'INSERM, Montpellier	Examineur
<b>Dr. SAGAN Sandrine</b> , Directrice de Recherche CNRS, Paris	Rapporteur
<b>Dr. SUBRA Gilles</b> , Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie, Montpellier	Examineur
<b>Dr. VIVES Eric</b> , Maître de conférences à la Faculté des Sciences, Montpellier	Directeur de thèse

## Remerciements

*Je tiens à remercier les membres de mon jury, Pr. Jamart Brigitte et Dr. Sagan Sandrine, pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Au Dr. Subra Gilles pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse.*

*Je remercie André PELEGRIN pour m'avoir accueilli dans son laboratoire IRO de l'IRCM de Montpellier, ce qui m'a permis d'effectuer un travail de recherche très enrichissant à l'interface de la chimie et de la biologie.*

*Je remercie également Eric VIVES qui m'a offert l'opportunité d'effectuer cette thèse et pour m'avoir dirigé pendant ces trois années. Merci pour tous vos conseils et pour m'avoir transmis la rigueur scientifique ainsi que vos connaissances.*

*Un grand merci également à tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et suivi le long de ma thèse. Manue, la catalane, pour toutes ces conversions, cafés et plaisanteries. Je te souhaite bon courage pour l'avenir et on se reverra peut être dans la plus belle région de France... A Wilhem, Wiwi le carinio, pour tous les bons moments passés ensemble lors de ton master 1. Dommage que je sois parti juste au moment où tu es revenu au labo, sors nous pleins de publis pendant ces trois ans, tu en as les capacités. Merci également « au chef Bruno » pour les bons moments partagés autour du café matinal et à bientôt pour une virée en deux roues, on attendra l'été si tu veux !*

*Merci également à Stéphanie pour ton sens de l'écoute, ta bonne humeur et aussi par ta présence, je me suis senti moins seul dans le laboratoire. Un très grand remerciement à Geneviève, la grande spécialiste des cellules, toujours souriante et serviable. J'ai appris beaucoup sur la culture cellulaire grâce à toi, ainsi que pleins de renseignements sur le Canada... Merci à Sabine, la professionnelle de la purification d'anticorps à ce que j'ai*

*entendu dire, pour ton sens de l'écoute et ta sympathie. Mickaël, le serial facseur, pour toutes ces conversions et je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta nouvelle petite famille.*

*Maxime, l'homme le plus serein que j'ai jamais rencontré, bonne chance à Lyon et félicitations pour le nouvel arrivant. Samir, Monsieur Monte-Carlo, bon courage pour ta nouvelle vie en Suède avec ta famille. Etre homme au foyer, ça a ses avantages également...*

*Merci à Christel, Nadège, Isabelle, Véronique, Nathalie, Thierry et Vincent pour votre aide au quotidien et Jean-Pierre pour ton humour décalé dont tu es le seul à connaître le secret.*

*Merci également aux médecins du bureau, Enrique et Olivier, bon courage et bonne continuation pour la suite. Imade, Vincent, Elsa et Amina pour tous ces échanges et ces bons moments partagés. Emilie, la reine de l'ironie, qui sûrement doit penser que je l'avais oublié. Ne t'en fais pas, on n'oublie pas une grande rousse comme toi, bon courage et bonne fin de thèse. Gaëlle, ancienne chimiste reconvertie à la biologie, merci pour ces conversations sympathiques même si on n'a pas trop eu le temps de bien se connaître. Yassamine, bon courage pour ta thèse.*

*Une petite pensée à tous les anciens doctorants : Sébastien, Julien le chimiste, Maha et Bérengère. Merci à tous pour ces bons moments passés dans le bureau.*

*Merci à Nicole et Christian, pour leur sympathie et pour m'avoir laissé à disposition et à de nombreuses reprises le MALDI, mon analyseur préféré. Un immense merci à vous deux et je vous souhaite une très bonne continuation pour l'avenir. Enfin, merci à Nadia pour m'avoir formé à la cytométrie en flux.*

*Je tiens également à remercier les membres de l'IBMM, anciennement dénommé LAPP, pour leur soutien matériel.*

*Enfin, je remercie deux personnes pour qui j'ai un profond respect : Christine Enjalbal et Gilles Subra. Christine, pour m'avoir transmis votre passion pour la spectrométrie de masse et Gilles, toujours souriant, pour la synthèse et la chimie des peptides. Vous avez été mes « mentors » lors de mon master professionnel, j'ai énormément appris à vos côtés et c'est*

*grâce à vous que j'ai eu envie de continuer mes études en thèse. Je vous en suis très reconnaissant.*

*Je remercie également toute ma famille pour leur soutien durant ces nombreuses années d'études.*

*Stéphanie, tu me supporte tous les jours depuis bientôt six ans et petit à petit nous franchissons ensemble les étapes de la vie. Aucun mot n'est assez fort pour exprimer toute la gratitude que j'ai envers toi, pour m'avoir soutenu et aidé moralement pendant ces trois années. Avec toi, la vie apparaît bien plus belle et facile. Merci pour le bonheur quotidien que tu m'apportes et qui s'est décuplé le 21 octobre 2009. Que ferais-je sans vous, ma petite famille...*

*A Baptiste, ma plus grande réussite*

## Avant propos

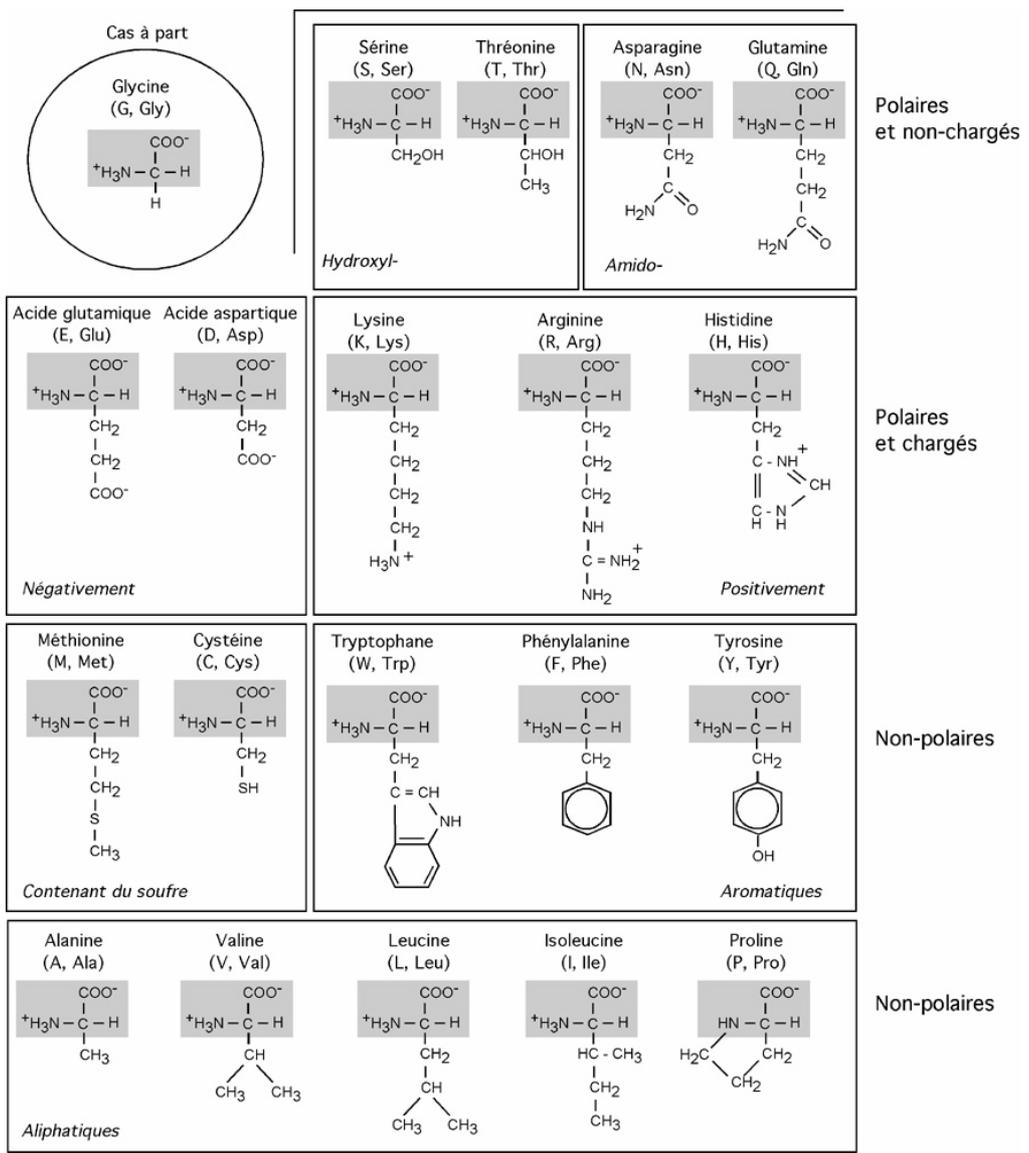
Ce travail, réalisé sous la direction du Dr. Eric VIVES, au sein du laboratoire « Immunociblage et Radiobiologie en Oncologie », Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, a donné lieu à la communication par poster au congrès suivant :

3<sup>th</sup> Intracellular Delivery of Therapeutics Molecules : From Bench to Bedside. Montpellier, 2009. A modified Tat cell-penetrating peptide with increased internalization properties.

## Abréviations

aa : aminoacide  
AcOEt : acétate d'éthyle  
AcOH : acide acétique  
ADN : acide désoxyribonucléique  
Ahx : acide 6-aminohéxanoïque  
APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique  
ARN : acide ribonucléique  
 $\beta$ -Gal :  $\beta$ -galactosidase  
BHE : barrière hémato-encéphalique  
Boc : *tertio*-butyloxycarbonyl  
Bzl : benzyl  
CCM : chromatographie sur couche mince  
CME : endocytose dépendante de la clathrine  
CPP : cell penetrating peptide (peptide internalisant)  
Dc-Chol : 3 $\beta$ -[N-(N', N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle]cholestérol  
DCM : dichlorométhane  
DIEA : diisopropyléthylamine  
DIPC : diisopropylcarbodiimide  
DMAP : 4-diméthylaminopyridine  
DMF : diméthylformamide  
DMPC : dimyristoylphosphatidylcholine  
DMPE : dimyristoylphosphatidyléthanolamine  
DMPG : dimyristoylphosphatidylglycérol  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DOPC : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine  
DOPE : dioléoylphosphatidyléthanolamine  
DOPG : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-[phospho-*rac*-(1-glycérol)]  
DOPS : 1,2-dioléoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-L-sérine  
DOTAP : 1,2-dioléoxy-3-(triméthylammonio)propane  
DOTMA : chlorure de N-[1-(2,3-dioléoxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium  
Dox : doxorubicine  
EDMPC : chlorure de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-éthylphosphocholine  
eq. : équivalent molaire  
Et<sub>2</sub>O : éther diéthylique  
EtOH : éthanol  
FAM : carboxyfluorescéine  
FDA : fluorescéine diacétate  
FITC : fluorescéine isothiocyanate  
FM : fluorescéine-maléimide  
Fmoc : 9-fluorénylméthylloxycarbonyl  
GAG : glycosaminoglycane

GFP : protéine fluorescente verte  
HCl : acide chlorhydrique  
HOBt : hydroxybenzotriazole  
HPLC : chromatographie liquide haute pression  
HS : sulfate d'héparane  
IL : interleukine  
ip : intrapéritonéal  
IP : iodure de propidium  
IRM : imagerie de résonance magnétique  
iv : intraveineuse  
LC/MS : couplage chromatographie liquide – spectrométrie de masse  
MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation  
MBq : mégabecquerel  
MeOH : méthanol  
MTS : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium  
NEM : N-éthylmaléimide  
NLS : séquence de localisation nucléaire  
Pbf : 2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl  
PBS : solution saline phosphatée  
PEG : polyéthylène glycol  
PEI : polyéthylène imine  
PG : protéoglycane  
PLL : poly-L-lysine  
PMO : phosphorodiamidatemorpholino-oligomère  
PNA : acide nucléique peptidique  
PTD : domaine de transduction protéique  
Rf : rapport frontal  
SAR : relation structure-activité  
SPPS : synthèse peptidique sur phase solide  
SVF : sérum de veau fœtal  
TBTU : O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium tétrafluoroborate  
tBu : *tertio*-butyl  
TCEP : tris(2-carboxyéthyl)phosphine  
TCL : thiocholestérol  
TFA : acide trifluoroacétique  
TFE : trifluoroéthanol  
TIPS : triisopropylsilane  
Tof : temps de vol (time of flight)  
tr : temps de rétention  
Trt : triphénylméthyl ou trityl



Abréviations des vingt acides aminés

# Table des matières

<b>Abréviations</b>	<b>1</b>
<b>Préambule</b>	<b>7</b>
<b>Introduction</b>	<b>8</b>
I Les vecteurs non viraux	8
1. Délivrance par des lipides cationiques	8
2. Délivrance par des polymères cationiques	10
II Les peptides internalisants	12
1. Exemples de CPP	13
1.1 Antennapedia	14
1.2. Transportan	15
1.3. Poly-l-Arginine	16
1.4. La famille Pep	17
1.4.1. Pep-1	17
1.4.2. Pep-2 et Pep-3	17
1.5. La famille MPG	19
1.6. CADY	19
1.7. Classification des CPP	20
2. Le couplage CPP-cargo	21
2.1. Stratégie covalente	21
2.2. Stratégie non covalente	21
3. Mécanismes d'internalisation des CPP	22
3.1. L'endocytose	22
3.1.1. L'endocytose dépendante de la clathrine	23
3.1.2. L'endocytose caveolaire	23
3.1.3. La macropinocytose	24
3.1.4. Voies endocytiques impliquées dans l'internalisation de CPP	24
3.1.5. Augmentation de la sortie endosomale	27
3.2. Facteurs affectant l'efficacité d'internalisation	29
3.2.1. Influence du cargo	29
3.2.2. Le type cellulaire	34
3.2.3. Ratio peptide sur cellule	35
3.2.4. Pont disulfure	36
3.2.5. Stabilité à la dégradation enzymatique	36
3.3. Etudes sur des membranes artificielles	39
3.4. Prédiction de l'internalisation ?	40
4. Applications des CPP dans la délivrance de molécules thérapeutiques	41
4.1. Délivrance d'acides nucléiques	41
4.2. Augmentation de l'absorption	42
4.3. Délivrance ciblée	43
5. Essais cliniques	44
5.1. AviBiopharma, AVI-5038	44
5.2. Kai Pharmaceutical, KAI-9803	45
5.3. Revance Therapeutics Inc, RT001	45
5.4. Traversa Inc	46
5.5. CDG Therapeutics Inc.	47
6. Technologies basées sur les CPP	47
6.1. Panomics Inc	47

6.2. CEPEP-III	47
III Tat	49
1. La protéine Tat	49
1.1 Rôle de la protéine Tat dans la transcription virale	50
1.2 Mécanisme d'internalisation de la protéine Tat	51
2. Le peptide Tat	51
2.1. De la protéine Tat au domaine de transduction protéique	51
2.2. Mécanismes d'internalisation	55
2.2.1. Liaison à la surface cellulaire : importance des arginines et des protéoglycanes	55
2.2.2. Artéfacts associés aux techniques expérimentales	56
2.2.3. La macropinocytose	59
2.2.4. L'endocytose	59
2.2.5. Facteurs influençant l'internalisation	60
2.3. Etudes de Tat sur des membranes artificielles	62
2.4. Biodistribution	63
IV Applications thérapeutiques de Tat	66
1. Thérapies anticancéreuses	66
1.1. Composés chimiothérapeutiques	66
1.2. Protéines et peptides antitumoraux	67
1.3. Anticorps	68
1.4. Liposomes	69
1.5. Stratégie de ciblage de cellules tumorales	70
1.6. Imagerie	73
2. Autres pathologies	73
2.1. Délivrance d'enzyme	73
2.2. Ischémie	74
2.3. Asthme	74
2.4. Infection virale	74
2.5. Vaccins	75
3. Autres applications	75
3.1. Protéines et Peptides	75
3.2. Acides nucléiques	78
V Augmentation de l'internalisation	80
1. Pré-incubation des cellules avec une molécule hydrophobe	80
1.1. Pyrènebutyrate	80
1.2. Diméthylsulfoxyde	81
1.3. Anthocyanines	82
2. Modification du CPP	82
2.1. Séquence Pas	82
2.2. LK15	83
2.3. Prénylation	83
2.4. Modification de la chaîne principale du peptide	84
3. Fonctionnalisation avec des acides gras	86
3.1. Myristoylation	87
3.2. Palmitoylation	90
3.3. Stéarylation	91
3.4. Comparaison entre acide gras	92
4. Le cholestérol	94
4.1. Délivrance d'ODN et de PNA	94

4.2. Délivrance d'ADN	96
4.3. Applications aux peptides	97
<b>Définition du projet de recherche</b>	<b>99</b>
1. Synthèse de nouveaux peptides internalisants	99
2. Evaluations <i>in vitro</i> des peptides internalisants	101
<b>Résultats et Discussion</b>	<b>102</b>
I. Synthèse des peptides cholestérylés	102
1. Synthèse de l'aspartate de cholestéryle	102
2. Synthèse peptidique sur phase solide	105
2.1. Rappel	105
2.2. Synthèses des peptides	106
2.3. Marquage des peptides à la fluorescéine	110
2.4. Difficultés de synthèses	110
II Evaluations biologiques <i>in vitro</i> des peptides	112
1. Choix des lignées cellulaires	112
1.1. Les cellules Jurkat	112
1.2. Les cellules SKOV3-E2	112
2. Evaluation de la cytotoxicité par MTS	112
3. Evaluation de l'internalisation par cytométrie de flux	117
4. Quantification de l'internalisation des peptides radiomarqués	117
III Mise en évidence de la formation d'aspartimide	120
1. Détermination de l'origine de la sous réaction	120
2. Mise en évidence de la sous réaction	121
3. Changements de stratégie de synthèse	124
IV Synthèse de peptides cholestérylés de seconde génération	129
1. Synthèse du synthon cholestérylé	129
2. Synthèses des peptides cholestérylés	130
3. Marquage des peptides à la fluorescéine diacétate	130
4. Difficultés de synthèse	132
V Evaluation biologiques <i>in vitro</i> des nouveaux peptides	134
1. Détermination de la cytotoxicité des peptides	134
2. Evaluation de l'internalisation par cytométrie de flux	134
<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>138</b>
<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>141</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>156</b>

## Préambule

L'internalisation de molécules pharmacologiquement actives dans les cellules vivantes est altérée par la nature lipophile de la membrane plasmique. Les CPP (Cell Penetrating Peptide) sont des peptides qui traversent efficacement les membranes biologiques. Un des CPP les plus étudiés ces dernières années est le peptide Tat. Sa séquence riche en acides aminés basiques est responsable de l'internalisation. Ce peptide sert de vecteur pour internaliser diverses molécules thérapeutiques. Toutefois, en marquant le peptide Tat à l'iode 125, notre laboratoire a montré que moins de 1% de la quantité initiale du peptide est internalisé par les cellules.

Le couplage de Tat à une molécule thérapeutique permet d'augmenter l'activité biologique de cette dernière. Mais au vu du faible pourcentage d'internalisation, l'efficacité de la translocation à travers la membrane cellulaire peut encore être améliorée et cela permettrait également de diminuer la quantité de molécules thérapeutiques administrées, diminuant de potentiels effets secondaires sur les tissus sains.

Une des voies étudiées pour accroître la quantité de peptide internalisé est d'augmenter son hydrophobicité afin de favoriser l'adsorption du peptide à la membrane puis à la déstabilisation de celle-ci au niveau endosomal.

Cette thèse consiste à améliorer le taux d'internalisation du peptide Tat. L'hypothèse de travail est basée sur le fait qu'un groupement hydrophobe favoriserait l'insertion de Tat dans la membrane plasmique de la cellule et ainsi potentialiserait l'internalisation de molécules bioactives qui lui sont couplées. Pour ce faire, une molécule de cholestérol a été liée de façon covalente sur un acide aminé qui peut être ensuite intégré à différents endroits dans la séquence peptidique. Le nombre de groupement hydrophobe ainsi que leur position dans la séquence pouvant varier, il nous est possible de réaliser une étude de relation structure-activité de ces nouveaux peptides Tat cholestérylés.

# Introduction

## I Les vecteurs non viraux

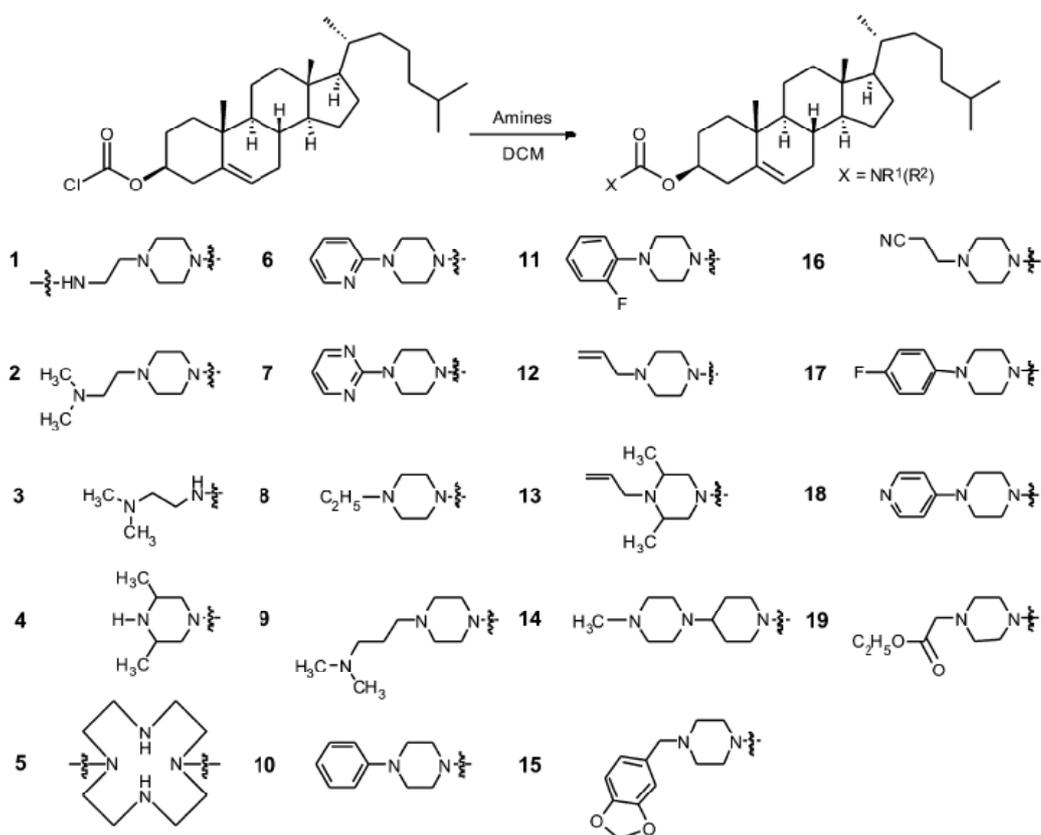
Pour la délivrance d'acides nucléiques aux cellules, une des stratégies employées est l'utilisation de vecteurs. Un vecteur doit tout d'abord être capable de compacter les acides nucléiques et de protéger les séquences thérapeutiques de la destruction provoquée par les agents biologiques (enzymes) actifs dans le milieu. Il doit aussi assurer le franchissement de la membrane de la cellule et le cheminement efficace de sa «cargaison» jusqu'au noyau. On distingue deux types de vecteurs : les vecteurs viraux, qui ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, et les vecteurs non viraux. Le développement de ces derniers reste modeste et limité aux lipides et aux polymères cationiques.

### 1. Délivrance par des lipides cationiques

Les lipides cationiques forment une grande famille pour la délivrance de gènes synthétiques. Ils n'induisent pas de réponse immune et sont faciles à synthétiser. Les deux principaux inconvénients sont leur efficacité de transfection modérée ainsi que la toxicité.

Les lipides cationiques sont constitués de trois domaines : un domaine hydrophile, un domaine hydrophobe et un motif de liaison. Le domaine hydrophobe est la plupart du temps constitué de chaînes aliphatiques ou de groupements stéroïdiques. Concernant les chaînes aliphatiques, leur longueur est comprise entre 5 et 25 carbones et elles peuvent comporter des insaturations, c'est-à-dire des doubles liaisons carbone-carbone. Le groupement oléyle (C18 :1) apparaît être la chaîne aliphatique idéale.<sup>1</sup> Elle constitue la base du domaine hydrophobe du DOTMA et du DOTAP. En ce qui concerne les chaînes aliphatiques saturées, le groupement myristoyle (C14 :0) est très utilisé également (EDMPC, DMPE). Le cholestérol est le groupement le plus étudié pour les domaines hydrophobes stéroïdiques.<sup>1</sup> Les lipides cationiques, en association avec des lipides fusogéniques (DOPE par exemple) forment des liposomes qui servent également pour la transfection d'acides nucléiques. Le couple liposome/ADN porte le nom de lipoplexe. Enfin, le mécanisme d'internalisation est l'endocytose.<sup>2</sup>

Plusieurs groupes de recherche ont optimisé la structure du lipide cationique afin de diminuer la toxicité et d'augmenter l'activité de transfert du gène. Une des voies étudiées est la synthèse de lipides cationiques dont le groupement hydrophobe est constitué de cholestérol. Il serait très difficile de réaliser une étude détaillée sur l'optimisation des lipides cationiques. Les modifications apportées aux différents domaines sont nombreuses et très variées. Certains groupes de recherche conçoivent même des bibliothèques de lipides cationiques qui sont ensuite testées biologiquement. Par exemple, la figure 1 montre la diversité structurale étudiée au niveau du domaine hydrophile. Nous pouvons observer que la base de ce domaine est la pipérazine, où divers groupements chimiques ont été couplés sur la fonction amine secondaire. Dans cette étude, 19 composés différents ont été évalués pour leur capacité à transférer dans des cellules un ADNp.



**Figure 1** : Librairie de lipides cationiques évaluée par Islam et al.<sup>3</sup>

Le tableau 1 montre une sélection d'études concernant l'amélioration de lipides cationiques à base de cholestérol ou thiocholestérol (TCL). Pour chaque étude, les résultats concernant le lipide cationique le plus efficace sont détaillés.

Auteur	Groupe ment hydrophile	Espaceur	Groupe ment hydrophobe	ADNp	Efficacité
Medvedeva <sup>4</sup>	Pyridine ou méthylimidazole	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	Cholestérol	GFP	10 fois supérieure à Dc-Chol
Kim <sup>5</sup>	Amine primaire	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	Cholestérol	GFP	Non comparée
Radchatawedchakoon <sup>2</sup>	Amine primaire + guanidinum	Aucun	Cholestérol	β-Gal	7 fois supérieure à Dc-Chol
Islam <sup>3</sup>	Pipérazine diméthylée	Aucun	Cholestérol	GFP	Equivalente à Dc-Chol
Huang <sup>6</sup>	Aminoéthyltriméthyl ammonium	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	TCL	GFP	7 fois supérieure à DOTAP

**Tableau 1 :** Récapitulatif d'une sélection d'étude sur les lipides cationiques à base de cholestérol.

Le Dc-Chol et le DOTAP sont deux lipides cationiques couramment utilisés pour la délivrance de gène. Dans ce comparatif, le groupement hydrophobe est de même nature chimique, seuls l'espaceur et le domaine hydrophile varient. Ainsi, il apparaît que ces modifications permettent une efficacité de transfection environ 10 fois supérieures à celles des molécules de références. Concernant le domaine hydrophile, les structures testées sont assez variées mais il semblerait que l'utilisation d'amine primaire, tertiaire ou quaternaire amène à une meilleure efficacité.

## 2. Délivrance par des polymères cationiques

La différence avec les lipides cationiques est l'absence de la partie hydrophobe, ce qui rend les polymères cationiques facilement solubles dans l'eau. Ils interagissent avec les phosphates de l'ADN à travers des interactions électrostatiques générant des particules de taille nanométrique. La particule formée possède une charge nette positive puisque le polymère cationique est en excès vis-à-vis de l'ADN. Cette nanoparticule, nommée polyplexe, s'internalise dans la cellule pour permettre l'expression de gènes.

Le premier polymère cationique découvert est le poly-l-lysine (PLL) une répétition synthétique de l'acide aminé lysine. Il est couramment utilisé pour la délivrance *in vitro* et *in vivo* d'ADN.<sup>7</sup> La longueur du PLL influence la taille de la particule ainsi que la stabilité lors de la condensation avec l'ADN. Un PLL de haut poids moléculaire a une charge positive nette plus forte, lie l'ADN plus efficacement et forme des complexes plus stables que le PLL de bas poids moléculaire.<sup>8</sup>

Une des premières utilisations du PLL pour la délivrance non virale d'ADN a été réalisée par Wu et al.<sup>9</sup> Ils ont associé une glycoprotéine (asialoorosomucoïde) avec un PLL. L'ajout de l'ADN a permis l'obtention d'un complexe stable. Les hépatocytes exprimant seulement le récepteur aux asialoglycoprotéines ont été transfectés *in vitro* et *in vivo*. Avec ce système, Wu et al. venaient d'obtenir un vecteur de délivrance ciblée à base de PLL. Puis Lemaitre et Leonetti ont délivré efficacement des oligonucléotides-PLL pour inhiber la réplication virale suite à l'infection des cellules par stomatitis.<sup>10</sup> Toutefois, le PLL seul permet un niveau de transfection modeste et l'utilisation d'un agent endosomolytique (chloroquine ou peptide fusogène) est souvent nécessaire pour augmenter l'efficacité de transfection.<sup>11</sup>

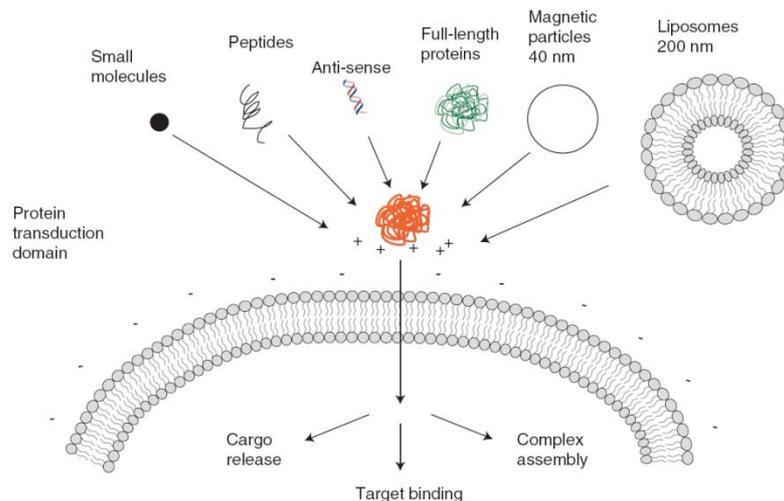
Une autre méthode pour transfecter les cellules est l'utilisation de polyéthylèneimine (PEI).<sup>12</sup> Le PEI est très efficace pour véhiculer des plasmides et oligonucléotides aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.<sup>13</sup> L'efficacité de transfection du PEI est liée à sa structure chimique. Ses amines primaires se protonnent dans les endosomes ce qui augmente la pression osmotique et favorise ainsi la rupture de l'endosome, permettant le relargage du cargo (le cargo étant la molécule couplée au vecteur) dans le cytosol.<sup>14</sup>

Comme nous venons de le voir, la plupart des études utilisent ces vecteurs pour l'internalisation d'acides nucléiques. Mais les peptides internalisants sont des vecteurs plus attractifs car des cargos très différents au niveau de leur structure peuvent leur être couplés.

## II Les peptides internalisants

Depuis une dizaine d'années, des molécules thérapeutiques ne respectant pas les règles de Lipinski<sup>15</sup> sont de plus en plus développées. Lipinski a défini « la règle des cinq ». Pour cela, il a comparé à partir d'une base de données (United States Adopted Name) 8 000 composés thérapeutiques entrant en phase II et a déterminé plusieurs paramètres à respecter pour qu'une molécule entrant en essai clinique ait de très grande chance de devenir un médicament. Ainsi, le poids moléculaire doit être inférieur à 500 Da, le nombre de groupements accepteurs de liaisons hydrogène inférieur à 10, le nombre de groupements donneurs de liaisons hydrogène inférieurs à 5 tout comme le log P (lipophilicité). Bien entendu, les molécules telles que les protéines ou les acides nucléiques sont une exception à ces règles. Mais elles sont faiblement internalisées et peu stables *in vivo*, ce qui limitent leur utilisation.

Pour augmenter l'internalisation de ces composés, des formulations à base de lipides<sup>16</sup> et de nanoparticules<sup>17</sup> ont été développées mais les progrès restent faibles. Les domaines de transduction protéiques (Protein Transduction Domain, PTD) ou encore dénommés peptides internalisants (Cell-Penetrating Peptides, CPP) permettent de surmonter les difficultés de délivrance cellulaire de nombreuses molécules comme les oligonucléotides, les liposomes, les protéines et bien d'autres (Figure 2).



**Figure 2 :** Exemples de domaines d'applications des CPP. D'après Murriel et al.<sup>18</sup>

Il y a vingt ans, la notion de PTD a été proposée suite à l'observation de quelques protéines, surtout des facteurs de transcription, qui pouvaient circuler de cellule en cellule. Historiquement, les premières observations ont été réalisées par Frankel et Pabo<sup>19</sup> et par

Green et Loewenstein<sup>20</sup> en 1988. Ils ont démontré que la protéine Tat issu de virus de l'immunodéficience 1 (HIV-1) pouvait pénétrer les cellules et se localiser dans le noyau. En 1991, le groupe de Prochiantz démontre que l'homéodomaine Antennapedia peut être internalisé dans des neurones.<sup>21</sup> Ces travaux sont à l'origine de la découverte du premier CPP en 1994, une séquence de 16 acides aminés dérivée de la troisième hélice de cette protéine, nommée Penetratin ou Antp.<sup>22</sup> En 1997, le groupe de Lebleu identifie la séquence minimale de la protéine Tat pour l'internalisation cellulaire, correspondant aux aminoacides 47 à 57.<sup>23</sup> Le premier CPP dont l'association avec le cargo se réalise à travers des interactions non covalentes est MPG, pour la délivrance d'acides nucléiques, conçu par le groupe de Divita en 1997.<sup>24</sup> Suivant la même stratégie, Pep-1 est conçu en 2001 pour la délivrance de peptides et de protéines.<sup>25</sup> De leur côté, les groupes de Wender<sup>26</sup> et Futaki<sup>27</sup> démontrent qu'une séquence polymérique d'arginine (Arg<sub>8</sub>) est efficacement internalisée par les cellules.

La preuve de concept majeur concernant l'application des CPP *in vivo* a été apportée par le groupe de Dowdy en 1999, démontrant la capacité de Tat à délivrer chez la souris la  $\beta$ -galactosidase dans plusieurs organes, y compris au cerveau, montrant ainsi la capacité de Tat à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE).<sup>28</sup> A l'heure actuelle, les CPP sont de plus en plus utilisés pour améliorer l'internalisation de nombreux cargos.

## 1. Exemples de CPP

Les CPP sont de courtes séquences peptidiques, généralement inférieures à 30 résidus, dérivées de protéines naturelles ou non, ou de séquences chimériques. Le tableau 2 montre la séquence peptidique ainsi que l'origine de CPP couramment utilisés. Dans ce chapitre, je détaillerai plus en détail l'historique de découvertes de ces CPP, à l'exception de Tat dont l'étude fera l'objet des chapitres III et IV de cette introduction.

Nom	Origine	Séquence
Tat (48-60)	Protéine Tat HIV-1	GRKKRRQRRRPPQ
Antp (ou pentratin)	Protéine Antennapedia de <i>Drosophila</i>	RQIKIWFQNRRMKWK
Transportan	Galanin + Mastoparan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL
Pep-1	Domaine riche en W + NLS de SV40	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-Cya
MPG	Gp 41 de HIV-1 + NLS de SV40	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV
polyarginine	SAR de Tat montrant le rôle clé des Arg	R <sub>n</sub> avec $6 \leq n \leq 12$
MAP	Modèle de peptide amphiphatique	KLALKLALKALKAALKA

**Tableau 2** : Séquence peptidique et origine de plusieurs CPP couramment utilisés.

### 1.1 Antennapedia

En 1991, afin d'étudier le rôle de la protéine Antennapedia (une protéine de drosophile) dans la morphogenèse des neurones, la séquence correspondant aux 60 acides aminés de l'homéodomaine fut synthétisée. L'idée était d'utiliser ce domaine de fixation à l'ADN comme antagoniste compétitif des homéoprotéines endogènes. Cette expérience mit en évidence l'internalisation spontanée de l'homéodomaine dans les neurones.<sup>21</sup> L'entrée pouvait être observée à basse température dans des conditions excluant toute endocytose. Une étude de relation structure-activité concernant plusieurs peptides dérivés de la troisième hélice de l'homéodomaine a permis de déterminer la séquence responsable de l'internalisation. Cette séquence baptisée pentratin (ou Antp) se structure en hélice  $\alpha$  amphipathique.<sup>22</sup> Il a également été démontré que les deux résidus Trp de la séquence sont nécessaires pour l'internalisation. Leur remplacement par deux résidus Phe réduit fortement l'internalisation. La séquence rétro-inverso et le peptide composé d'aa en série D sont également internalisés efficacement, excluant ainsi la possibilité d'un transport par le biais d'un récepteur cellulaire. La pentratin améliore fortement l'internalisation de scFv, fragments d'anticorps faiblement internalisés et rapidement éliminés. Le temps de rétention du scFV dans la tumeur est plus grand, et la spécificité tumorale n'est pas affectée.<sup>29</sup> Un autre exemple est l'augmentation de

l'inhibition *in vitro* de l'expression d'un facteur de transcription oncogène (EWS-Fli1), grâce à un complexe non covalent entre la penetratin et un oligonucléotide anti-sens, dans le traitement de sarcome d'Ewing, une tumeur maligne des os.<sup>30</sup> La délivrance d'un peptide dérivé de p21(WAF1) pour inhiber *in vitro* la croissance de cellules de cancer ovarien, d'ADNp pour augmenter la transfection de cellules endothéliales *in vitro* ou encore la délivrance d'ovalbumine pour l'activation de lymphocytes T *in vivo* a été améliorée suite au couplage avec la penetratin.<sup>31</sup>

## 1.2. Transportan

Lors de la recherche de nouveaux ligands du récepteur à la galanine, plusieurs peptides chimériques ont été étudiés dont un, composé des résidus 1 à 13 de la galanine fusionné au mastoparan, le composant principal du venin d'abeille. Ce peptide chimérique,<sup>32</sup> nommé galparan, s'est montré particulièrement affiné envers le récepteur. Deux ans plus tard, Zorko et al.<sup>33</sup> ont montré que le galparan inhibait l'activité GTPase alors que le mastoparan l'activait, ceci étant dû au fait que ces deux peptides possèdent chacun un site d'action différent sur la protéine G. Afin de pouvoir étudier l'internalisation du galparan, le résidu proline en position 13 a alors été remplacé par une lysine, le peptide obtenu fût appelé transportan.<sup>34</sup> Le couplage d'une biotine au niveau de la lysine permis l'interaction avec la streptavidine-FITC et ainsi la détermination de la localisation intracellulaire du transportan. Une internalisation efficace et rapide *in vitro* est alors observée dans des cellules de mélanome de Bowes, avec une localisation intracellulaire cytoplasmique et nucléaire. L'internalisation a été également efficace sur huit autres lignées cellulaires. Les auteurs suggèrent alors que le mécanisme d'internalisation est indépendant d'un récepteur car l'ajout d'un large excès de transportan, de galparan, de galanin ou de mastoparan n'inhibe pas l'entrée cellulaire du transportan par un phénomène de compétition. Afin de déterminer la séquence responsable de l'internalisation du transportan, neuf analogues (TP7 à TP15) ont été synthétisés. Cinq d'entre eux sont efficacement internalisés, à 0°C et à 37°C. Toutefois, un seul, le transportan 10 (TP10) possède l'activité de translocation<sup>35</sup> tout en perdant l'activité GTPasique, diminuant ainsi le risque de sous effet lié à l'utilisation du transportan.

Une application spectaculaire du transportan est la délivrance intracellulaire d'un acide nucléique peptidique (PNA) dont la séquence est complémentaire à celle de l'ARNm du récepteur à la galanin. L'expression du récepteur dans des cellules de mélanome de Bowes est alors fortement réduite.<sup>36</sup> Son couplage à un polymère cationique, permettant les interactions

avec l'acide nucléique, a donné lieu à la délivrance d'ARNsi provoquant ainsi une extinction de gène avec une haute spécificité. La diminution de l'activité luciférase est alors proche de celle obtenue avec la Lipofectamine 2000.<sup>36</sup> Pooga et al. ont également montré que le transportan induit une délivrance intracellulaire *in vitro* efficace de GFP, d'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine NifS ainsi que d'or colloïdal sur des cellules de mélanome de Bowes ou de fibroblaste de reins.<sup>37</sup> Le TP10 a également permis l'internalisation de peptides dérivés de la protéine kinase C et du récepteur aux cannabinoïdes, obtenant ainsi la sécrétion de  $\beta$ -hexosaminidase dans des cellules mastocytaires.<sup>38</sup>

### 1.3. Poly-l-Arginine

Ces homopolymères ont été conçus par analogie avec la séquence peptidique de Tat qui possède déjà six arginines.<sup>27</sup> Ces polymères ont montré une efficacité de translocation supérieure en comparaison des homopolymères composés d'ornithine, de lysine ou d'histidine.<sup>39</sup>

Les agents chimiothérapeutiques pénètrent dans la cellule par diffusion passive. La résistance des cellules à ces agents est associée à la surexpression au niveau membranaire de pompes à efflux P-gp. Lorsqu'ils sont couplés à un CPP, ces agents internalisent par endocytose et ne sont donc plus soumis à l'action des P-gp, diminuant ainsi la résistance des cellules. Un octaarginine (R<sub>8</sub>) a été couplé au Taxol dans ce but.<sup>40</sup> Les résultats montrent que l'IC<sub>50</sub> du complexe R<sub>8</sub>-Taxol est de 3 à 20 fois plus faible que celle du Taxol sur 11 lignées de cellules tumorales dont certaines résistantes au Taxol ou au Taxotère. L'injection ip à des souris présentant une tumeur ovarienne a mis en évidence l'effet positif du CPP car la médiane de survie pour R<sub>8</sub>-Taxol (environ 40 jours) est deux fois plus élevée que dans le cas du Taxol seul pour la tumeur Taxol-résistante.

Un autre exemple d'utilisation des polyarginines (R<sub>8</sub>) est lors de l'inhibition de prolifération cellulaire induit par le peptide pro-apoptotique non internalisant (KLAKLAK)<sub>2</sub><sup>41</sup> ou encore pour internaliser des agents de contraste (Gd-DPTA) pour l'imagerie de résonance magnétique (IRM).<sup>42</sup> Un polyarginine couplé à la cyclosporine A (Psorban) est en essai thérapeutique dans le traitement de psoriasis, point qui sera développé dans la section « Essais thérapeutiques » de ce manuscrit.

## 1.4. La famille Pep

### 1.4.1. Pep-1

C'est un transporteur peptidique synthétique qui forme avec le cargo des interactions hydrophobes non covalentes. Le mécanisme d'internalisation est la translocation, ce qui correspond à un passage direct à travers la membrane cellulaire via la formation de pores. Pep-1 est composé de 21 aminoacides et comprend trois domaines différents :

- un domaine hydrophobe côté N-terminal riche en Trp (W) permettant des interactions hydrophobes efficaces avec les protéines ainsi qu'avec les lipides et le cholestérol présents au sein de la membrane plasmique.<sup>43</sup>
- un domaine hydrophile côté C-terminal, dérivé de la séquence NLS du virus à ADN SV40, qui augmente la solubilité et l'internalisation du peptide.
- un espaceur composé de trois résidus qui confère une certaine flexibilité au peptide. En effet, des études SAR ont montré l'importance de cette flexibilité dans la délivrance de cargos macromoléculaires.<sup>44</sup>

Ce peptide, commercialisé sous le nom de Chariot, augmente la délivrance de peptides dérivés de Cdc25C ou de HIV-1, ou encore les protéines GFP ou  $\beta$ -galactosidase.<sup>25</sup> Dans la même étude, les auteurs montrent la capacité de Pep-1 à délivrer deux anticorps (LAMP-1 qui reconnaît la protéine 1 associée à la membrane lysosomale, et un anticorps anti- $\beta$ -actine).<sup>25</sup> Ce transporteur a aussi été utilisé pour la délivrance d'une protéine suppresseur de tumeur, p27<sup>Kip</sup> permettant *in vitro* un arrêt du cycle cellulaire de fibroblaste humain.<sup>45</sup> Pep-1 délivre donc essentiellement des peptides, des protéines, des anticorps et des PNA dans de multiples lignées cellulaires d'origine humaine (fibroblaste ; carcinome du poumon, du placenta, des reins, ostéosarcome ; cellules primaires de pancréas) ou murine (fibroblaste, hépatocyte, cellules embryonniques).

### 1.4.2. Pep-2 et Pep-3

Les PNA, acides nucléiques peptidiques, sont des mimes d'ADN prometteurs pour les thérapies anti-sens car ces molécules sont très stables, se lient aux ADN et ARN ciblés de façon séquence-spécifique avec une haute affinité et sont résistants aux protéases ainsi qu'aux nucléases.<sup>46</sup> Toutefois, ces composés possèdent une faible capacité à atteindre leur cible intracellulaire à cause d'une internalisation modeste. Pour contrer cette limitation, Pep-2 a été

conçu.<sup>47</sup> Il possède la même séquence peptidique que Pep-1 sauf que les deux résidus Trp en position 5 et 9 ont été remplacés par deux résidus Phe (figure 2).

Pep-1 : AC-K E T W W E T W W T E W S Q P K K K R K V-Cya  
Pep-2 : AC-K E T W F E T W F T E W S Q P K K K R K V-Cya  
Pep-3 : AC-K        W F E T W F T E W        P K K        R K-Cya

**Figure 2 :** Alignement des séquences peptidiques de Pep-1 à Pep-3.

Pep-2 a permis une délivrance efficace de HypNA-pPNA, un composé thérapeutique ciblant la cycline T1<sup>47</sup> ce qui a eu pour conséquence l'inhibition *in vitro* de la prolifération de cellules de cancer du sein à plus de 90 %. Issu d'une étude de relation structure activité menée sur Pep-2, Pep-3 a été conçu pour ne contenir que les résidus requis pour une internalisation maximale, principalement les résidus hydrophobes et cationiques.<sup>48</sup> L'injection intra-tumorale du complexe Pep-3/HypNA-pPNA diminue la croissance tumorale de carcinome de prostate humain de manière dose-dépendante (50 % et 92 % avec 1 µg et 5 µg de HypNA-pPNA, respectivement). Toutefois, ces excellents résultats *in vivo* nécessitent une administration topique du complexe. En effet, l'injection iv de celui-ci (10µg) ne diminue la croissance tumorale que de 20 %. Pour une quantité de complexe deux fois plus grande, l'effet biologique est presque cinq fois plus faible. Les auteurs concluent que l'efficacité *in vivo* est directement associée à la stabilité de la nanoparticule (complexe Pep-3/PNA). Ils ont donc conçu un complexe possédant sur sa surface des chaînes de polyéthylène glycol (PEG). L'injection iv de PEG-Pep-3/PNA inhibe la croissance tumorale à plus de 90 %, obtenant ainsi la même efficacité obtenue lors de la précédente étude (injection intratumorale du complexe sans PEG). La PEGylation a augmenté l'efficacité *in vivo* grâce à une meilleure stabilité de la nanoparticule.<sup>48</sup> On peut penser que cette nette amélioration est due au fait que les chaînes PEG forment une couche protectrice sur la surface des complexes, ce qui minimise leur reconnaissance par les opsonines (molécules, qui en interagissant avec les complexes, favorisent leur phagocytose) et par conséquence leur élimination.<sup>17</sup>

### 1.5. La famille MPG

Comme Pep, MPG est composé de trois domaines, un hydrophobe dérivé de la protéine HIV gp 41, un hydrophile issu de la séquence NLS de SV40 couplés entre eux grâce à une petite séquence de trois résidus.

MPG permet l'internalisation d'ADN plasmidique, d'oligonucléotides, ou d'ARNsi. Le nanocomplexe MPG/ADN est formé principalement par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques entre les phosphates des acides nucléiques et les résidus cationiques (Arg et Lys) de MPG.<sup>49</sup> Une variante du transporteur a été créée, MPG<sup>ΔNLS</sup><sup>50</sup> où la seconde lysine de la séquence NLS a été remplacée par une sérine. Cette seule mutation induit un relargage plus rapide du cargo dans le cytoplasme et limite également sa localisation nucléaire.<sup>38</sup>

L'injection intratumorale d'un complexe ARNsi ciblant la cycline T1/MPG-8 (une version plus courte de MPG)<sup>43</sup> inhibe complètement la croissance tumorale. Toutefois, la diminution n'atteint que 12 % lors d'une injection iv, montrant une nouvelle fois la faible stabilité *in vivo* d'un complexe CPP/acide nucléique. Dans cette même étude, les auteurs démontrent que l'ajout de 15 % de Cholestérol-MPG-8 à la particule n'affecte pas l'efficacité biologique de l'ARNsi (92 % d'inhibition) mais diminue l'élimination de la particule après injection iv. On peut alors supposer que le cholestérol forme également une couche protectrice sur la surface des complexes, diminuant leur reconnaissance par les opsonines ce qui augmente alors le temps de circulation du complexe.

### 1.6. CADY

CADY est un peptide amphiphatique secondaire dérivé de ppTG1, vecteur peptidique utilisé pour la délivrance de gènes.<sup>51</sup> CADY forme des complexes stables avec les ARNsi, augmentant ainsi la stabilité et l'internalisation dans plusieurs types de cellules. Le complexe CADY/ARNsi ciblant la protéine p53 a montré *in vitro* 97 % d'extinction de p53 jusqu'à 72h après la transfection. La réduction est de 60 % après 5 jours.<sup>52</sup>

Les travaux réalisés avec CADY, les familles Pep et MPG montrent que ces vecteurs possèdent une haute efficacité *in vitro* dans l'induction de la réponse biologique associée au cargo. Mais, *in vivo*, de très bons résultats sont obtenus après injection topique seulement. Après une injection systémique, les effets biologiques associés au cargo sont beaucoup plus faibles, ce qui a amené les différents auteurs à modifier les nanoparticules à l'aide de

groupements PEG ou cholestérol. L'effet biologique du cargo est alors très nettement amélioré car ces changements augmentent le temps de circulation du complexe. On peut également penser que, de la même manière qu'avec les liposomes, l'ajout de PEG ou de cholestérol pourraient aussi permettre une accumulation préférentielle des complexes au niveau tumoral grâce aux effets EPR (Enhanced Permeability and Retention). Cet effet consiste en une accumulation et une rétention préférentielles de macromolécules ou de particules lipidiques dans les tissus tumoraux, comparés aux tissus sains. L'accumulation est due à une défectuosité architecturale des vaisseaux sanguins tumoraux, ce qui cause une perméabilité supérieure.<sup>53</sup>

### 1.7. Classification des CPP

Les CPP sont généralement classés en trois sous groupes. Le premier contient les peptides naturels dérivés de fragment de protéine spécifique possédant une capacité de transduction. Tat et la penetratin font parties de ce sous groupe (tableau 3). Le second correspond à des modèles peptidiques consistant en une répétition de motifs comme MAP ou en un homopolymère comme les polyarginines. Enfin, le dernier sous groupe concerne les CPP conçus de façon rationnelle. Ce sont des domaines protéiques ayant un intérêt spécifique qui ont été mutés ou combinés entre eux. TP10, MPG ou encore CADY en font partie.

Origin	Name	Sequence	aa
Protein Transduction Domain (PTD)	Tat	GRKKRRQRRRPPQ-NH <sub>2</sub>	13
	Penetratin	RQIKIWFAQNRMRWKK-NH <sub>2</sub>	16
	EB1	LRLWSHLIHWFAQNRRIKWKKK-NH <sub>2</sub>	23
	pVEC	LLILRRRIRKQAHHSK-NH <sub>2</sub>	18
	Retm-pVEC	KSHAHQKRIRRLIILL-NH <sub>2</sub>	18
	M918	MVTVLFRRLRIRACGPPRVRV-NH <sub>2</sub>	22
	M1073	MVTVLFRRLRIRASGPPRVRV-NH <sub>2</sub>	22
	Model Peptides	MAP	KLALKALKALKALKLA-NH <sub>2</sub>
Designed Peptides	Arg <sub>5</sub>	RRRRRRRR-NH <sub>2</sub>	9
	TP10	AGYLLGKINIKALAALAKKIL-NH <sub>2</sub>	21
	MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-Cya	27
	MPG- $\alpha$	GALFLAFLAALSIMGLWSQPKKKRKV-Cya	27
	Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-Cya	21
	CADY	GLWRALWRLLRSLWRLLWKA-Cya	20

**Tableau 3:** Subdivision de CPP selon leur origine. D'après Eiriksdottir et al.<sup>54</sup>

## 2. Le couplage CPP-cargo

La liaison entre le CPP et le cargo est soit covalente, soit non covalente ce qui requiert une complexation stable avec le cargo.

### 2.1. Stratégie covalente

La formation d'une liaison covalente entre le cargo et le transporteur peut se réaliser à travers diverses réactions chimiques comme par exemple la formation d'un pont disulfure, d'une liaison amide, thioether ou thioester. L'expression d'une protéine de fusion-CPP est également possible. La plupart des travaux reportés concernent les peptides Tat, Penetratin, Transportan, des polymères d'arginine ainsi que des CPP de nouvelle génération combinant différents domaines de CPP, comme par exemple  $R_n$ Pen avec  $n = 3, 6$  ou  $9$ .<sup>55</sup>

Cette stratégie a permis une délivrance efficace de PNA,<sup>56,57</sup> de phosphorodiamidate morpholino-oligomère (PMO)<sup>58</sup> ainsi que des peptides et protéines.<sup>59</sup> L'avantage est de pouvoir contrôler de la stœchiométrie entre le CPP et le cargo mais cette méthode nécessite dans certains cas une modification chimique du cargo et/ou du CPP afin de réaliser le couplage.

### 2.2. Stratégie non covalente

Cette stratégie est basée sur l'utilisation de petits transporteurs peptidiques amphipathiques. Le caractère amphipathique peut provenir soit de la structure primaire du peptide grâce à un assemblage séquentiel de domaines composés d'acides aminés hydrophiles et d'autres domaines composés d'acides aminés hydrophobes ; soit de la structure secondaire du peptide dont l'état conformationnel amène à un positionnement d'acides aminés hydrophiles et hydrophobes sur des faces opposés.<sup>49</sup>

Cette stratégie a été originellement conçue pour la délivrance d'acides nucléiques, avec le CPP MPG, puis étendue pour d'autres types de cargo comme les peptides ou les protéines avec l'utilisation de Pep-1. Le transporteur et le cargo forme un complexe stable au travers d'interactions électrostatiques et hydrophobes.<sup>24,48,50</sup>

Cette stratégie a ensuite été appliquée à d'autres CPP comme à Tat,<sup>57</sup> aux polyarginines<sup>60</sup> et à des peptides dérivés du Transportan.<sup>37,61</sup> En ce qui concerne Tat et les polyarginines, cette méthode est adaptée seulement dans le cas où le cargo est chargé négativement (acides

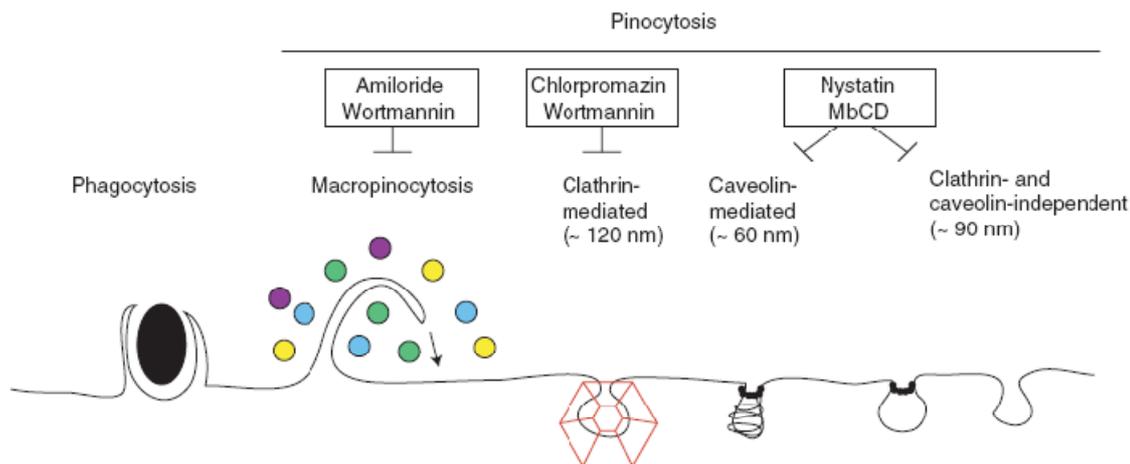
nucléiques). Par contre, pour un cargo neutre (peptide ou protéine neutre, agent chimiothérapeutique, etc...) ou cationique, il est impossible d'appliquer cette stratégie. Le couplage à travers une liaison covalente est alors requis.

### **3. Mécanismes d'internalisation des CPP**

C'est une pièce essentielle du puzzle pour le développement et l'optimisation de stratégies pour des applications thérapeutiques *in vivo*. Ce mécanisme est resté longtemps mystérieux, et était considéré comme indépendant de l'endocytose, de l'énergie et de récepteur spécifique. Ce n'est qu'en 2003 que le groupe de Lebleu<sup>62</sup> a mis en évidence plusieurs artéfacts techniques amenant à de mauvaises conclusions au vu des résultats obtenus, point qui sera développé dans le chapitre IV. Le mécanisme d'internalisation a été réévalué puis reporté comme étant dépendant de l'endocytose.<sup>63,64</sup> Toutefois, malgré cette avancée considérable, le mécanisme reste controversé notamment au niveau de la voie endocytaire utilisée pour l'internalisation.

#### *3.1. L'endocytose*

La bicouche lipidique prévient efficacement l'entrée cellulaire de molécules hydrophiles comme celles présentes dans le milieu aqueux environnant les cellules. Les cellules eucaryotes utilisent un grand nombre de mécanismes d'endocytose pour transporter des macromolécules à travers la membrane. L'endocytose est divisée en phagocytose et en pinocytose. La phagocytose est utilisée par les phagocytes comme les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. La pinocytose est composée de plusieurs voies, représentées à la figure 3.



**Figure 3 :** Voies d'entrées cellulaires pour les macromolécules. Les composés encadrés correspondent à des inhibiteurs de ces voies. MbCD : Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine.

D'après Murriel et al.<sup>18</sup>

### 3.1.1. L'endocytose dépendante de la clathrine (CME)

C'est la voie d'entrée majeure pour les cellules eukaryotes. Elle est impliquée dans l'internalisation de nutriments, dans la modulation de signaux à travers l'internalisation de complexes ligand-récepteur ou dans la régulation de l'hémostase à travers l'internalisation de protéines. La CME débute par la formation d'un puits membranaire recouvert de clathrine, qui se transforme ensuite en une cage polygonale, enrichi en récepteurs transmembranaires, puis s'invagine jusqu'à l'obtention d'une vésicule. Ces vésicules peuvent être recouvertes de clathrine, ce qui nécessite l'action de la dynamine GTPase.<sup>65</sup> Cette vésicule est ensuite débarrassée de son manteau protéique et fusionne avec un endosome précoce ou de tri.<sup>66</sup>

### 3.1.2. L'endocytose caveolaire

Les caveolae sont des invaginations de la membrane recouverte de cavéoline. Elles sont abondantes dans les cellules musculaires, les adipocytes ainsi que dans les cellules endothéliales. La cavéoline est une protéine qui s'insère dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Les glycosphingolipides, la protéine prion, ou des composants sanguins comme l'albumine et le cholestérol ont été décrits comme internalisant par ce mode d'endocytose.<sup>67, 68</sup> Les caveolae ont beaucoup de caractéristiques communes avec les radeaux lipidiques membranaires, comme une haute teneur en cholestérol et en glycosphingolipides, suggérant une voie d'endocytose commune, indépendante de la clathrine, dépendante de la dynamine et sensible à la déplétion de cholestérol.<sup>69</sup> Ceci unit

l'endocytose caveolaire avec la non caveolaire des radeaux lipidiques. Cette voie est référée comme l'endocytose caveolaire/radeaux lipidiques-dépendante.

### 3.1.3. La macropinocytose

La macropinocytose est associée avec une membrane ridée, où des protrusions membranaires dirigées par l'actine fusionnent avec la membrane plasmique. La vésicule formée, nommée macropinosome, est large et engouffre un volume de soluté extracellulaire considérable. La macropinocytose est une alternative à la phagocytose dans l'internalisation d'antigène ainsi que dans la surveillance immune.<sup>70</sup>

### 3.1.4. Voies endocytiques impliquées dans l'internalisation de CPP

Afin d'améliorer la compréhension de ce paragraphe, voici plusieurs définitions concernant les principaux composés de la membrane plasmique cités.

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des chaînes polymériques linéaires sulfatés composées de la répétition d'un diholoside de base contenant une hexosamine (glucosamine ou galactosamine) ainsi qu'un autre résidu osidique. Les GAG comprennent le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate, l'acide hyaluronique ainsi que l'héparine et le sulfate d'héparane. Les chaînes de GAG peuvent être liées par covalence à une protéine pour former des protéoglycanes.

Les protéoglycanes sont les composants essentiels de la matrice extracellulaire. Les chaînes de sucres sont très longues mais pas ramifiées. Ils sont O-glycosylés et se lient sur la chaîne latérale de résidu sérine.

Il est difficile d'établir un schéma général pour l'internalisation des CPP mais un consensus s'est établi. Il est admis que le premier contact entre le CPP et la cellule se fait au travers d'interactions électrostatiques entre les aminoacides basiques du CPP et les constituants anioniques extracellulaires de la cellule, principalement les glycosaminoglycanes. Ziegler et al.<sup>71</sup> ont étudié l'internalisation de plusieurs CPP cationiques (Tat, Penetratin, R<sub>9</sub> et K<sub>16</sub>). En dépit des différences dans leur structure primaire, tous ces CPP lient les GAG avec une forte affinité. La haute flexibilité structurale de l'interaction CPP-GAG peut expliquer en partie l'internalisation efficace des CPP dans beaucoup de lignées cellulaires différentes. Dans cette même étude, les auteurs démontrent que plusieurs molécules de CPP se lient à la même

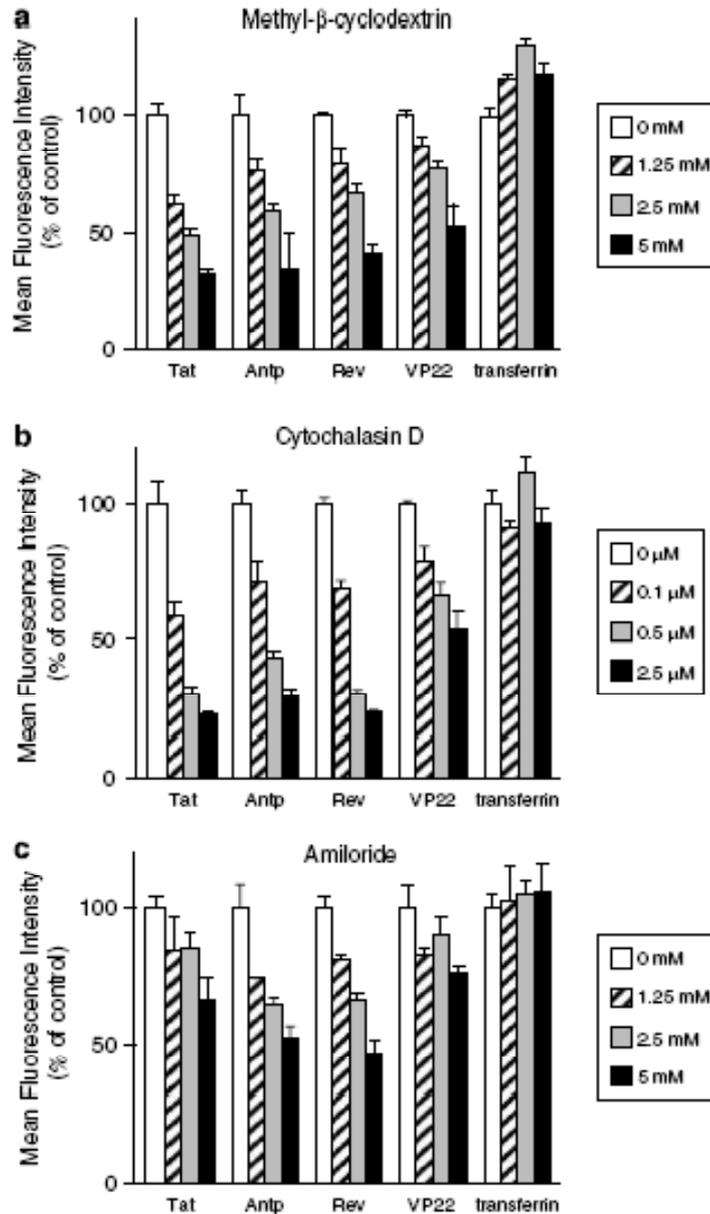
chaîne d'héparine (6 à 7 CPP par héparine pour Tat et Penetratin, 5 à 6 pour R<sub>9</sub> et seulement 3 pour K<sub>16</sub>).<sup>71</sup> La voie d'internalisation est ensuite dirigée par plusieurs paramètres incluant la nature et la structure secondaire du CPP, la nature et le type du cargo ainsi que le type cellulaire et la composition membranaire. Il est de plus en plus admis qu'un CPP donné n'est pas internalisé par une seule voie mais que plusieurs voies pourraient se produire simultanément. Jiao et al. ont montré que l'endocytose et la translocation (passage direct à travers la membrane plasmique) peuvent se produire dans des proportions différentes selon le CPP étudié (tableau 4).<sup>72</sup> Dans cette étude, la translocation est considérée comme l'internalisation à 4°C. Celle à 37°C est la somme de la translocation et de l'endocytose. Dans les cellules CHO-K1, il apparaît que les peptides à caractère plus hydrophile semblent s'internaliser de façon majoritaire par la translocation. Pour les trois autres peptides, l'endocytose serait le mécanisme principal. Cette étude montre également l'importance des protéoglycanes dans l'endocytose des CPP. A part pour (R/W)<sub>9</sub>, l'absence de protéoglycanes diminue le pourcentage d'endocytose ce qui est compensé par l'augmentation de la translocation. Pour Tat et R<sub>9</sub>, les protéoglycanes apparaissent être essentiels car leur absence au niveau membranaire empêche l'endocytose de ces deux peptides, amenant ceux-ci à s'internaliser par la translocation.

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/W) <sub>9</sub> (+7)	15	85	15	85
5 μM Antp (+7)	30	70	60	40
5 μM P1 (+7)	20	80	75	25
7.5 μM Tat (+8)	75	25	100	0
5 μM R <sub>9</sub> (+9)	50	50	100	0

**Tableau 4 :** Différents mécanismes d'internalisation selon le CPP et les conditions. D'après Jiao et al.<sup>72</sup>

Toutes les voies endocytiques ont été reportées comme participant au mécanisme d'internalisation. L'utilisation de sondes endocytiques marquées par un fluorophore comme la transferrine, les dextrans ou des toxines (choléra) définissent une internalisation via la clathrine, la macropinocytose en phase fluide ou les caveolae respectivement. La contribution de chaque voie est difficile à mesurer car l'inhibition d'une voie provoque la sur-régulation d'une autre.<sup>73</sup> Et les marqueurs utilisés pour visualiser une voie particulière

manquent de spécificité,<sup>74</sup> rendant l'extrapolation des résultats plus difficile. L'utilisation de ces inhibiteurs permet très rarement l'arrêt total de l'internalisation. Ceci a été démontré par Sugita et al. qui ont étudié l'internalisation de quatre CPP : Tat, Antp, Rev et VP22 (figure 4).<sup>75</sup> Selon les auteurs, tous ces peptides internalisent par macropinocytose car les trois inhibiteurs diminuent l'internalisation de façon dose-dépendante, sauf pour la transferrine dont la voie d'internalisation est différente de la macropinocytose (CME). Par exemple, pour Tat, la plus forte diminution (75 %) est obtenue avec la cytochalasin D à une concentration de 2,5  $\mu$ M. Une diminution n'étant pas une inhibition, on peut conclure que la macropinocytose contribue à l'internalisation de ces quatre CPP mais il n'est pas exclu qu'une autre voie puisse également se produire.



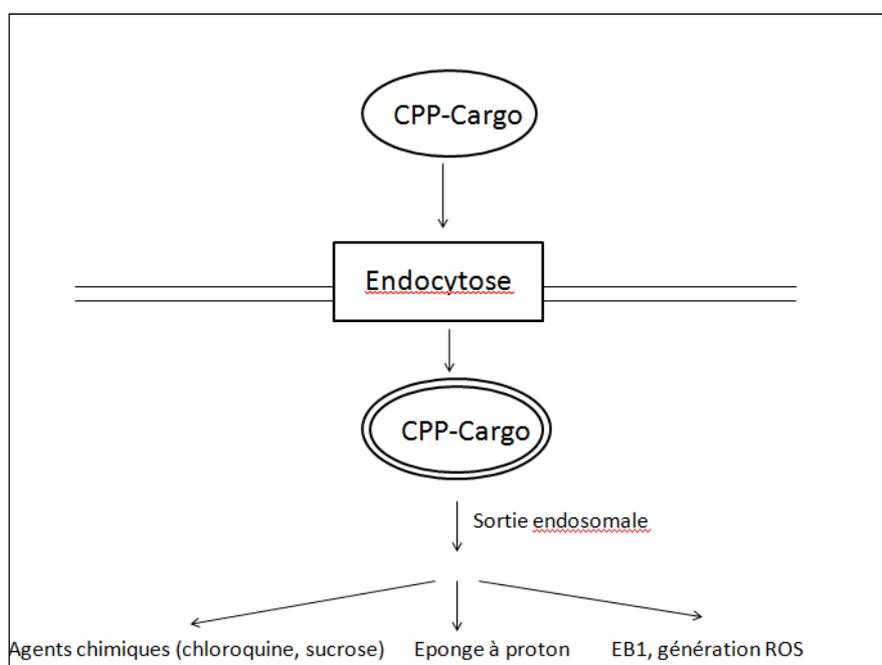
**Figure 4 :** Effet d'inhibiteurs de macropinocytose sur l'internalisation de quatre CPP. D'après Sugita et al.<sup>75</sup>

### 3.1.5. Augmentation de la sortie endosomale

Une des limitations dans l'utilisation des CPP est leur séquestration dans des endosomes, suite à leur internalisation par endocytose. Une partie des endosomes est recyclée au niveau membranaire, mais il a été démontré que pour les CPP, cette voie de recyclage est négligeable.<sup>76</sup> La plupart du matériel endocyté est alors dirigé vers la voie de dégradation endo-lysosomale. Cette voie est comprise dans un réseau complexe de structures vésiculaires où la composition protéique et le niveau d'acidité reflètent leur niveau de maturation. Le matériel encapsulé suit étape par étape le procédé de maturation puis, après la fusion de

l'endosome tardif avec le lysosome, le matériel est dégradé par l'action d'enzymes lysosomales. Cette voie a un impact négatif pour la délivrance du cargo envers sa cible intracellulaire, plusieurs études ayant montré une séquestration endosomale non négligeable du matériel internalisé.<sup>77</sup> Des stratégies ont alors été mises en œuvre afin d'augmenter la sortie endosomale des CPP et CPP-cargo.

Des composés comme la chloroquine améliorent la sortie endosomale mais en raison d'une trop forte cytotoxicité, ils ne peuvent être utilisés *in vivo* (figure 5). L'incorporation d'une séquence polymérique d'histidine (10 résidus) au CPP Tat améliore l'efficacité de transfection du complexe Tat/ADNplasmidique d'un facteur 7000.<sup>78</sup> Suite à la protonation de la chaîne latérale des histidines dans l'endosome, dont le pH est inférieur à celui du milieu extracellulaire, il se produit un gonflement osmotique de l'endosome, ce qui provoque la rupture de la membrane et le relargage du matériel endocyté. Cet effet est également connu sous le nom d'éponge à proton. Une autre voie étudiée a été la modification de la séquence peptidique de la penetratin en y incorporant plusieurs résidus hydrophobes ainsi que deux His obtenant ainsi le peptide EB1. Suite à la protonation des His dans l'endosome, EB1 forme une hélice  $\alpha$  amphipathique qui perméabilise la membrane endosomale.<sup>61</sup>



**Figure 5** : Stratégies pour augmenter la libération endosomale. D'après Fonseca et al.<sup>79</sup>

Abes et al.<sup>58</sup> ont démontré que l'activité biologique supérieure de (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PMO comparé à R<sub>8</sub>-PMO était dû à une sortie endosomale plus efficace, notamment grâce à l'hydrophobicité accrue du complexe suite à l'intégration d'Ahx (acide 6-aminohexanoïque).

Une autre stratégie consiste en la co-incubation du complexe CPP-cargo avec un photosensibilisateur, AIPc<sub>2a</sub> puis à irradier les cellules à la lumière rouge. AIPc<sub>2a</sub> produit des espèces oxygénées réactives (ROS) sous photostimulation. Les ROS causent des dommages à la membrane endosomale, favorisant ainsi le relargage dans le cytosol du couple CPP-cargo. Ce relargage du complexe CPP-cargo est spécifique car il est uniquement obtenu sous stimulation à la lumière rouge. Cette stratégie a amélioré l'internalisation d'un complexe polylysine/ADN plasmidique codant pour la GFP dans des cellules de carcinome colorectal humain.<sup>80</sup> Matsushita et al. ont utilisé la même stratégie pour la délivrance de trois CPP couplés au FITC (R<sub>11</sub>, Tat et Antp) dans des cellules neuronales, puis avec R<sub>11</sub>-p53 dans des gliomes, sans toutefois évaluer cet effet bénéfique sur la viabilité de ces cellules cancéreuses.<sup>81</sup>

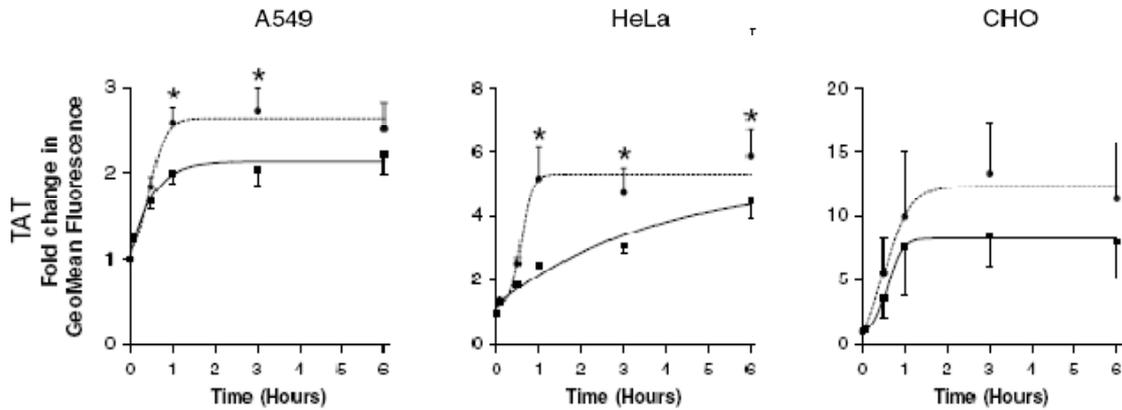
L'utilisation de peptides fusiogènes sensibles au pH augmente également la sortie endosomale. HA2, un peptide dérivé de la séquence N-terminal de la protéine Hemagglutinine du virus influenza, a été utilisé en ce sens. A faible pH, le peptide se structure en hélice  $\alpha$  et déstabilise la membrane endosomale, permettant le relargage du contenu de l'endosome au niveau intracellulaire.<sup>82</sup>

### *3.2. Facteurs affectant l'efficacité d'internalisation*

#### *3.2.1. Influence du cargo*

Dans la plupart des études, la visualisation du CPP à l'intérieur de la cellule est basée sur l'utilisation de cargo fluorescent, avec le risque que le cargo altère le mécanisme ou l'efficacité d'internalisation.<sup>83</sup>

Une étude comparative entre quatre CPP sur trois lignées cellulaires a été réalisée par Jones.<sup>84</sup> Dans cette étude, Tat, Antp, R<sub>11</sub> et Transportan ont été comparés seuls ou couplé à un cargo sur des cellules de carcinome épithélial (A549), de cancer du col de l'utérus (HeLa) et d'ovaire de hamster chinois (CHO). La figure 6 montre, à titre d'exemple, la cinétique d'internalisation pour Tat avec ou sans cargo (PKI, peptide inhibiteur de kinase A).



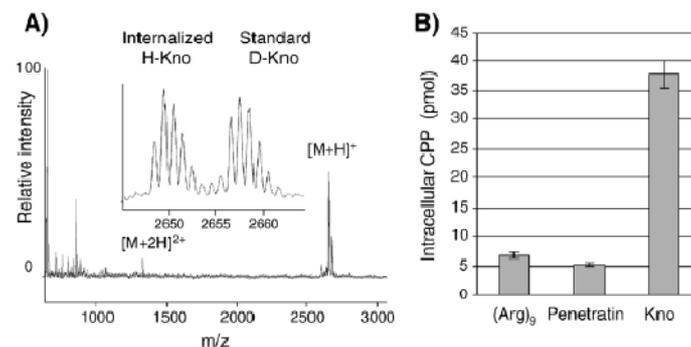
**Figure 6 :** Cinétique d'internalisation de Tat (—) ou Tat-PKI (⋯). D'après Jones et al.<sup>84</sup>

Cette étude met en évidence que selon le type de cellule étudiée, la cinétique d'internalisation peut être plus ou moins rapide et l'internalisation plus ou moins efficace. Ceci est valable pour tous les CPP sauf pour le Transportan. Mais le point le plus marquant est l'effet du cargo sur l'efficacité de l'internalisation. Pour trois CPP (Tat, Antp, Transportan), l'internalisation est plus élevée (jusqu'à 7 ou 8 fois pour le Transportan) après couplage du cargo PKI. Au contraire, R<sub>11</sub> a vu son efficacité diminuer. De plus, le type de cellule a également son importance. Antp-PKI est plus internalisé que Antp seul dans les cellules A549 et HeLa mais l'est moins dans les CHO. Ceci démontre d'une part que les résultats obtenus avec un CPP seul ne sont pas forcément transposables au CPP-cargo et d'autre part, que ces résultats peuvent être différents selon la lignée cellulaire.

Egalement dans cette étude, les auteurs avaient à leur disposition les CPP couplés à trois cargos peptidiques de séquences différentes (PKI, NBD et Control), Control étant une séquence brouillée du domaine de liaison à NEMO (NBD). Nous venons de voir que le couplage du cargo PKI affecte l'internalisation des quatre CPP, il aurait donc été très intéressant de vérifier si les deux autres cargos (NBD et Control) augmentent ou diminuent l'efficacité l'internalisation. Hélas, les auteurs ont seulement démontré que l'ajout de NBD aux CPP augmente leur cytotoxicité sur les cellules A549.

Maiolo et al. ont démontré de leur côté que l'ajout de cargo peptidique à R<sub>7</sub> et R<sub>7</sub>W diminue l'internalisation entre deux et trois fois en comparaison des CPP seuls. La quantification a été réalisée grâce un algorithme et à des images issues de microscopie confocale.<sup>85</sup> Toutefois, ces résultats restent à confirmer en utilisant des techniques qui permettent une quantification exacte de l'internalisation (radiomarquage par exemple).

Dans une autre étude, le groupe de Burlina a mis au point une méthode basée sur la spectrométrie de masse MALDI-Tof pour quantifier l'internalisation de CPP, couplés ou non à un cargo.<sup>86,87</sup> La spectrométrie de masse n'étant pas une méthode quantitative, les auteurs ont utilisé un étalon interne qui possède la même structure que l'analyte mais où huit hydrogènes sont remplacés par huit deutérium, créant ainsi une différence de masse de huit daltons. Les deux molécules possèdent la même efficacité de désorption/ionisation et uniquement dans ce cas là, il est possible de quantifier de manière absolue la proportion relative entre des deux entités par rapport à l'intensité relative du signal dans le spectre obtenu. La quantité d'étalon interne étant connu, il est possible alors de calculer la quantité d'analyte internalisé. Un exemple des résultats est montré à la figure 7.



**Figure 7:** A : Spectre MALDI obtenu après analyse du CPP Kno. B : Quantité de CPP internalisé intact. D'après Aussedat et al.<sup>87</sup>

Kno est un CPP correspondant à la troisième hélice de l'homéodomaine de la protéine Knotted-1, un facteur de transcription présent dans le maïs. Le tableau 5 résume et compare les résultats obtenus avec des cellules CHO.

CPP	Cargo	Quantité internalisé	Pourcentage de la quantité initiale	Ecart induit par le cargo
R <sub>9</sub>	Aucun	7 pmol	0,093 %	/
	PKCi	6 pmol	0,08 %	- 14 %
Penetratin	Aucun	5 pmol	0,067 %	/
	PKCi	10,5 pmol	0,14 %	+ 110 %
Kno	Aucun	38 pmol	0,5 %	/
	PKCi	18,5 pmol	0,247 %	- 51 %
/	PKCi-SAcM	0,7 pmol	0,009 %	/

**Tableau 4 :** Quantification des différents CPP et CPP-Cargo.

Dans ces expériences, les peptides sont incubés à une concentration de 7,5  $\mu\text{M}$  dans un volume final de 1 mL, ce qui donne une quantité de matière initiale de 7,5 nmol. En comparant cette valeur avec celles qui correspondent aux quantités internalisés, la meilleure efficacité d'internalisation n'est que de 0,5 %. Cette valeur extrêmement faible est toutefois en accord avec celles d'autres groupes qui ont quantifié l'internalisation de CPP<sup>88</sup> et déterminé entre autres que Tat internalise à hauteur de 1 à 2 % et entre 1 et 6 % pour R<sub>9</sub>, selon les lignées cellulaires. Une fois de plus, cette étude démontre que le même cargo peut avoir des effets totalement différents selon le CPP utilisé, allant de la diminution à l'augmentation de l'internalisation d'un facteur deux. Enfin, l'amélioration de la translocation du cargo varie d'un CPP à l'autre (d'un facteur 8,6 pour R<sub>9</sub> ; 15 pour Penetratin ; 54 pour Kno). Toutefois, ces résultats sont à pondérer par le fait que la quantification se fait grâce à un étalon interne possédant la même structure que l'analyte intact, ce qui signifie si une partie de l'analyte est dégradé au niveau intracellulaire, les fragments générés ne seront pas pris en compte. Ce qui en soit pourrait amener à une efficacité d'internalisation plus grande si tel en était le cas.

Un autre point à considérer est que les cargos peuvent augmenter la cytotoxicité des CPP. Cardozo et al. ont couplé deux cargos bloquant des voies pro-apoptotiques à deux CPP, Tat et Antp.<sup>89</sup> La cytotoxicité a été évaluée sur des cellules INS-1E (cellule pancréatique de rats) et HeLa. Le tableau 5 montre la cytotoxicité des complexes après 48h d'incubation, à une concentration de 30  $\mu\text{M}$ . Les cargos seuls ne sont pas cytotoxiques.

CPP	Cargo	Cellules INS-1E	Cellules HeLa
Tat	Aucun	< 5%	< 5%
	JNKi	40%	20%
	NBD	5%	10%
Antp	Aucun	10%	20%
	JNKi	50%	60%
	NBD	30%	30%

**Tableau 5 :** Cytotoxicité des différents CPP-cargo.

Les résultats montrent que le cargo NBD induit moins de toxicité cellulaire que JNKi mais dans les deux cas, leur couplage au CPP a eu pour conséquence de diminuer la viabilité cellulaire de façon dose-dépendante. Cette diminution est moins forte pour Tat par ailleurs. Ceci montre pour cette étude un effet négatif du couplage du cargo sur la viabilité des cellules.

Enfin, un paramètre assez peu étudié est l'influence du cargo dans la cinétique d'internalisation. Le tableau 6 montre le temps de demi-vie ( $t_{1/2}$ ) dans le cas d'une cinétique du premier ordre. Pour un même CPP, la cinétique d'internalisation peut être plus ou moins longue selon le cargo qui lui est couplé. Par exemple, pour Tat, le  $t_{1/2}$  varie entre une et trente minutes. Pour les cellules Jurkat, la cinétique est plus rapide quand le cargo est un peptide que quand c'est la fluorescéine, montrant là aussi un effet du cargo sur la cinétique de Tat.

CPP	Label/cargo	Cell line	$t_{0.5}$ (min)
Penetratin	pentapeptide	Bowes	60
	NBD	K562	45 <sup>a</sup>
	NBD	K562	20 <sup>a</sup>
Tat	pentapeptide	Bowes	30
	fluorescein	Jurkat	20 <sup>a</sup>
	peptide chelator	Jurkat	1
	rhodamine	HeLa	1 <sup>a</sup>
MAP	pentapeptide	Bowes	10
Transportan	pentapeptide	Bowes	10
	Abz	Caco-2	15 <sup>a</sup>
	<sup>125</sup> I	Bowes	35
Transportan-10	Abz	Caco-2	25 <sup>a</sup>

**Tableau 6 :** Effet du cargo sur la cinétique d'internalisation de quatre CPP. D'après Zorko et al.<sup>90</sup> a : valeur recalculée par les auteurs à partir d'une étude déjà publiée.

Comme nous venons de la voir, l'efficacité ainsi que la cinétique d'internalisation d'un CPP sont affectées par le couplage d'un cargo. Ceci est prévisible car le CPP peut vectoriser des cargos très variables en terme de structure. Nous avons également vu que la cinétique d'internalisation du CPP diffère selon le type de cellule. Le temps d'incubation des CPP est aussi un paramètre important car s'il est trop court, il est possible que le plateau cinétique ne soit pas encore atteint ce qui induit une efficacité d'internalisation non-maximale. Lors de la comparaison de l'internalisation de plusieurs CPP, la variation d'un seul de ces paramètres peut affecter le classement des CPP en terme d'efficacité d'internalisation.

### 3.2.2. Le type cellulaire

Comme il a été évoqué précédemment, le type cellulaire a une influence sur l'efficacité d'internalisation. Mueller et al. ont réalisé une très vaste étude en étudiant 22 CPP sur quatre lignées cellulaires.<sup>88</sup> Le tableau 7 montre le pourcentage d'internalisation obtenu pour quatre CPP couramment utilisés.

Cellules	Tat	Antp	Transportan	R <sub>9</sub>
COS-7	1	3	32	1
HEK293	2	5	20	3
HeLa	1	21	39	6
MDCK	0	2	58	0

**Tableau 7 :** Pourcentage d'internalisation de différents CPP sur 4 lignées cellulaires. Source Mueller et al.<sup>88</sup>

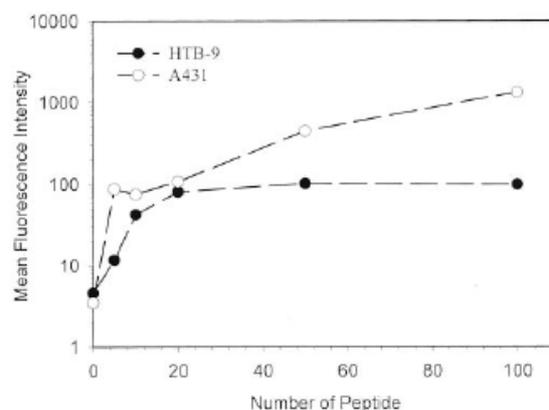
Toutefois, la méthode de quantification est peu commune. Les CPP sont couplés au FITC puis sont incubés 30 min à une concentration de 10  $\mu$ M et à une température de 37°C. Les cellules sont trypsinées (ou pas) puis lysées. La fluorescence obtenue à partir du lysat permet la quantification du CPP grâce à une courbe de calibration obtenue avec la BSA (Bovine Serum Albumine). Les résultats sont donnés en pourcentage d'efficacité d'internalisation, qui est le ratio de la quantification obtenue avec les cellules trypsinées sur celle obtenue avec les cellules non trypsinées. Pour Tat et R<sub>9</sub> l'écart entre la valeur la plus faible et la plus élevée n'est que de quelques pourcents. Leur internalisation est donc assez homogène. Mais pour Antp et Transportan, cet écart est très élevé (variation de 19 % pour Antp, 38 % pour Transportan). Par ailleurs, pour un CPP donnée, l'internalisation la plus efficace n'est pas

obtenue pour le même type de cellule. Ainsi, l'efficacité d'internalisation est plus ou moins élevée selon la lignée cellulaire utilisée.

### 3.2.3. Ratio peptide sur cellule

Une étude a comparé l'internalisation de CPP en fonction du ratio peptide sur cellule.<sup>91</sup> Pour MAP et Penetratin, avec une concentration extracellulaire et un nombre de cellule fixe, l'internalisation augmente linéairement avec le volume d'incubation. Les auteurs démontrent que pour un nombre de cellules fixe, doubler le volume d'incubation augmente la concentration intracellulaire du peptide plus efficacement que lorsque la concentration extracellulaire du peptide est doublée. Ces résultats laissent envisager que le ratio peptide sur cellule est un facteur plus important que la concentration extracellulaire du peptide.

Ce paramètre peut également être appliqué lors de l'utilisation de liposomes. La densité de peptide sur la surface du liposome influence l'efficacité de l'internalisation. Un liposome contenant 45 peptides Tat sur sa surface est trois fois moins internalisé par des cellules de mélanome murin que lorsque le nombre de Tat est de 145.<sup>92</sup> Ce nombre peut varier d'une lignée cellulaire à l'autre. Pour des cellules de cancer de la vessie (HTB-9), 20 Tat par liposomes sont suffisants pour obtenir l'internalisation optimale. Mais pour des cellules de carcinome squameux (A431), ce nombre est de 100 (figure 8).



**Figure 8 :** Effet du nombre de peptide sur l'internalisation. D'après Tseng et al.<sup>93</sup>

Concernant les liposomes, ces faits corroborent l'impact positif du CPP sur l'internalisation du liposome, un cargo très large dont le diamètre peut être de plusieurs centaines de nanomètres. Le nombre maximal de CPP varie selon le type cellulaire, ce qui peut se rapprocher au fait que l'efficacité d'internalisation d'un CPP est variable selon le type de cellules, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent.

#### 3.2.4. Pont disulfure

Cet aspect a été « pointé du doigt » dans une étude très récente.<sup>94</sup> Le pont disulfure, stable dans le milieu biologique extracellulaire, est réduit dans le milieu intracellulaire grâce à une concentration de glutathione élevée. Ce type de liaison est très largement utilisé lors du couplage CPP-cargo. La réduction intracellulaire de la liaison provoque la dissociation du complexe CPP-cargo, permettant au cargo d'exercer son activité biologique. Dans ce travail, les auteurs ont quantifié l'internalisation de Antp et de (R/W)<sub>9</sub>. Les deux CPP possèdent soit aucune fonction thiol, soit une (pour (R/W)<sub>9</sub>), soit deux fonctions thiols libres.

La présence d'une et de deux fonction thiol augmente l'internalisation (R/W)<sub>9</sub> d'un facteur 10 et 28, respectivement. Concernant Antp, deux fonctions thiols libres augmentent 17 fois l'internalisation.

Le TCEP est un agent réducteur qui ne traverse pas la membrane cellulaire. Le NEM est un composé qui se lie au résidu cystéinyl (thiol libre) de façon irréversible et capable de traverser la membrane cellulaire. Le traitement des cellules par ces deux composés avant la trypsinisation diminue entre trois et dix fois la quantité de peptide internalisé, suggérant ainsi qu'il existe un réservoir de CPP liés extracellulairement à la membrane et qui n'est pas touché par l'action de la trypsine. Il est possible que les CPP contenant des fonctions thiols puissent réagir avec des protéines présentes au niveau de la membrane extracellulaire par formation de réactions croisées avec les molécules contenant des ponts disulfures. Cela génère de fortes quantités de peptides liés à la surface cellulaire, dont une partie n'est pas accessible à la trypsine, ce qui crée des surestimations dans l'internalisation.

#### 3.2.5. Stabilité à la dégradation enzymatique

La stabilité des peptides envers les enzymes est un paramètre important. Lors d'incubation du CPP sur les cellules pendant des temps dépassant quelques fois plusieurs heures, le peptide doit être stable pour que l'internalisation soit efficace.

La comparaison de la stabilité métabolique de trois CPP a mis en évidence un temps de demi-vie du CPP extrêmement variable, jusqu'à 80 fois plus élevé selon la lignée cellulaire.<sup>95</sup> Le tableau 8 résume les résultats obtenus.

CPP	Demi-vie (min)		
	Cellule Calu-3	Cellule TR146	Cellule MDCK
Tat	544	503	6065
Penetratin	45	166	2079
hCT (9-32)	21	601	1668

**Tableau 8 :** Demi-vie de CPP en fonction du type cellulaire.

Dans une autre étude, deux CPP, MAP et Penetratin, ont été incubés sur des cellules CHO à une concentration de 1  $\mu\text{M}$ .<sup>96</sup> Le temps de demi-vie extracellulaire de MAP est de 10 min et pour Penetratin, il est de 5,7 min. Les temps de demi-vie sont donc très variables d'une lignée cellulaire à l'autre, et des investigations plus poussées doivent être menées afin de déterminer quels sont les facteurs qui influencent la stabilité de ces CPP.

Grunwald et al. ont mis en évidence une stabilité très courte de Tat dans le plasma humain car le temps de demi-vie est de 3,5 min.<sup>97</sup> Concernant sa stabilité protéolytique, il a été déterminé que les sites de clivages principaux sont situés du côté N-terminal au niveau de la tyrosine et du côté C-terminal pour les trois arginines (résidus 55 à 57) (tableau 9).

incubation time (min)	residual intact TA7p YGRKKRRQRRR	main fragments
10	25%	GRKKRRQRRR GRKKRRQR GRKKRRQR YGRKKRRQR
30	12%	GRKKRRQRRR GRKKRRQR YGRKKRRQR YGRKKRRQR

**Tableau 9 :** Stabilité protéolytique de Tat. D'après Grunwald et al.<sup>97</sup>

L'ensemble de ces résultats montrent une stabilité très variable selon le CPP. Le temps de demi-vie varie entre quelques minutes et plusieurs heures, voire plusieurs jours (Tableau 8, 6065 min correspondent à 4 jours et 5 heures). Il a été déterminé que pour Tat, la suppression d'une seule arginine dans la séquence diminue l'internalisation de 80 %.<sup>26</sup> Les principaux sites de clivages étant situés au niveau des arginines côté C-terminal du peptide, il est alors certain que dès qu'une arginine a été clivée du peptide, le fragment obtenu n'internalisera que très peu. Mais ceci est à pondérer par le fait que des CPP constitués de résidus en série D, donc plus stables à la dégradation enzymatique, possèdent une efficacité d'internalisation

équivalente ou légèrement supérieure au CPP parent, comme nous le verrons pour le peptide Tat. L'influence de ce paramètre serait donc faible en ce qui concerne l'efficacité d'internalisation.

Nous venons de le voir, comparer différentes études entre elles est délicat car plusieurs facteurs influencent l'efficacité d'internalisation. Il devient donc très difficile d'établir un classement entre plusieurs CPP. Le tableau 10 regroupe certains résultats préalablement détaillées sur des cellules HeLa.

Temps incubation	Concentration du CPP	Efficacité d'internalisation	Détection	Référence
30 min	10 $\mu$ M	Tat < R <sub>9</sub> < Antp < Transportan	FITC	Mueller <sup>88</sup>
75 min	7,5 $\mu$ M	Antp < R <sub>9</sub> < Kno	MALDI	Aussedat <sup>87</sup>
180 min	10 $\mu$ M	VP22 < Tat < Antp < Rev	FAM	Sugita <sup>75</sup>
360 min	5 $\mu$ M	Tat = Transportan < Antp < R <sub>11</sub>	Rhodamine	Jones <sup>84</sup>

**Tableau 10 :** Efficacité d'internalisation de CPP selon différentes études.

La séquence peptidique utilisée pour Tat, Antp et Transportan est strictement la même. Cependant les paramètres liés aux conditions expérimentales diffèrent totalement. Le temps d'incubation, la concentration ainsi que le mode de détection varient, ce qui pour le dernier paramètre conduit à une différence entre les mêmes peptides (fluorophores différents ou peptide biotinylé). Tout ceci amène à un ordre d'efficacité d'internalisation qui n'est pas le même selon l'étude. Le cas le plus représentatif est la comparaison entre Tat et Transportan, qui dans l'étude de Jones sont équivalents alors que dans l'étude de Mueller, ils sont en opposition totale, Tat étant le moins internalisé.

Un point important est que ces classements sont obtenus à partir de CPP « seul », si on ne considère pas le fluorophore comme un cargo. L'ajout d'un cargo, même identique, modulerait très certainement l'efficacité d'internalisation ce qui entraînerait des changements dans l'ordre de ces classements. Il devient donc très difficile de classer avec précision l'efficacité d'internalisation des CPP.

### 3.3. Etudes sur des membranes artificielles

L'avantage de ce modèle est que les membranes artificielles permettent d'obtenir des caractéristiques physico-chimiques semblables à celles d'une membrane biologique intacte. Une étude très complète a été réalisée par le groupe de Divita sur dix CPP couramment utilisés.<sup>54</sup>

Peptide	Structure <sup>2</sup> (water)	Structure <sup>3</sup> (DOPG)	Structure <sup>3</sup> (DOPC/DOPG)
YDEGE (control)	rc	rc	rc
Tat	rc	rc	rc
Arg <sub>9</sub>	rc	rc	rc
pVEC	rc	β-strand/rc	rc
Retro-pVEC	rc	β-strand/rc	rc
Penetratin	rc	β-strand/rc	rc
M918	rc	β-strand	rc
M1073	rc	β-strand	rc
TP10	rc	α-Helix	α-Helix/rc
MAP	rc	α-Helix	α-Helix/rc
EB1	rc	α-Helix	α-Helix/rc
MPG	rc	β-strand/rc	β-strand/rc
MPG-α	rc	α-Helix/rc	α-Helix/rc
Pep-1	rc and α-Helix at high concentration	α-Helix/rc	α-Helix/rc
CADY	rc	α-Helix	α-Helix

**Tableau 11** : Caractérisation structurale des CPP. Rc : random coil, α : structure secondaire principale. D'après Eiriksdottir et al.<sup>54</sup>

Dans l'eau, les CPP possèdent une structure en random coil, assimilable à une pelote statistique non périodique en opposition aux hélices et aux feuillettes. Mais cela ne signifie pas pour autant une absence de structuration (tableau 11). En présence de phospholipides, les CPP peuvent alors être classés en trois sous groupes.

Tout d'abord, Tat, Arg<sub>9</sub> et YDEGE (peptide non internalisant) ne changent pas de conformation quelle que soit la nature du phospholipide. Le second groupe concerne pVEC, rétroVec, Penetratin, M918 et M1073. Ces peptides possèdent une structure en feuillet β en présence de phospholipides chargés négativement (DOPG). Ce changement de structure se produit lorsque la concentration du CPP augmente. Enfin, le troisième sous groupe comprend TP10, MAP et EB1. La conformation est de type hélice α en présence de DOPG. Ce groupe possède la capacité de s'insérer spontanément dans des membranes biologiques au travers de fortes interactions électrostatiques avec les têtes polaires des lipides plutôt que par des contacts hydrophobes avec les lipides.

Les auteurs concluent que les interactions peptides/lipides contribuent dans le mécanisme d'internalisation. Celles-ci peuvent amener à l'induction d'une voie endocytaire ou à une

perturbation membranaire. La force et la nature de ces interactions déterminent le mécanisme d'internalisation et donc le futur intracellulaire du peptide. Ceci peut expliquer qu'un même CPP puisse être internalisé par différents mécanismes, la composition lipidique de chaque type cellulaire étant différente.

De son côté, Ziegler et al. ont démontré que les CPP amphipathiques primaires (Transportan, TP10, Pep-1, MPG) lient fortement les lipides membranaires neutres et anioniques suggérant que leur interaction avec la membrane plasmique est principalement de type hydrophobe.<sup>98</sup> La translocation directe est observée à faible concentration pour ces CPP. Les CPP amphipathiques secondaires (Antp, KLAK, RL16) possèdent cette propriété seulement au travers de changements conformationnels dans la structure secondaire lors d'interactions avec les lipides ou GAG. Leur affinité envers les membranes électriquement neutres est faible, mais elle augmente avec un contenu en lipide anionique supérieur. Enfin, les CPP non amphipathiques ne sont que faiblement adsorbés au niveau membranaire et la contribution d'une translocation directe dans le mécanisme d'internalisation est faible. Pour ces deux derniers groupes, l'endocytose est la voie d'entrée majeure. Mais à des concentrations supérieures à 100  $\mu\text{M}$  et à une faible température, la translocation devient le mécanisme d'internalisation.<sup>98</sup>

### *3.4. Prédiction de l'internalisation ?*

Pouvoir prédire l'internalisation d'un CPP donné n'est pas une chose aisée. La diversité des résultats obtenus entre les études ainsi que l'influence de multiples paramètres sur l'internalisation ne rendent pas la tâche facile. Toutefois, une étude assez récente a essayé de prédire les capacités d'internalisation de plusieurs dizaines de CPP en suivant certaines règles.<sup>99</sup> A partir d'une séquence protéique :

- trouver la séquence contenant le plus d'acides aminés basiques possibles
- les séquences contenant des arginines sont préférées à celles contenant des lysines
- ne pas prendre de séquences contenant des résidus acides (chargés négativement)
- les séquences amphipathiques ont plus de chance d'être CPP même si certaines sont lytiques pour la membrane
- l'hydrophobicité est nécessaire mais provoque une insolubilité aqueuse
- les séquences trop longues, supérieures à 30 résidus, sont difficiles à synthétiser et à purifier. Mieux vaut privilégier des séquences inférieures à 20 résidus.

Mais ces règles ne sont pas universelles. En effet, au moins deux CPP très largement utilisés n'y correspondent pas. Il s'agit des polymères d'arginine (non hydrophobe) ainsi que le transportan (faiblement chargé positivement). Le descripteur z qui prend en compte un certain nombre de variable pour chaque aminoacide a ensuite été utilisé.<sup>100</sup> Les auteurs ont alors essayé de prédire la capacité de translocation de 85 séquences peptidiques dont les propriétés étaient déjà connues. 58 prédictions sont correctes, la méthode est alors efficace dans 68 % des cas. Il y a eu 15 faux positif ainsi que 13 faux négatif.

Cette méthode s'est donc avérée exacte dans plus d'un cas sur deux, mais repose que sur l'évaluation des CPP seuls. Prédire l'internalisation d'un complexe CPP-cargo est encore plus délicat étant donné la diversité des cargos qui ont déjà été couplés aux CPP ce qui montre les limites de cette méthode.

#### **4. Applications des CPP dans la délivrance de molécules thérapeutiques**

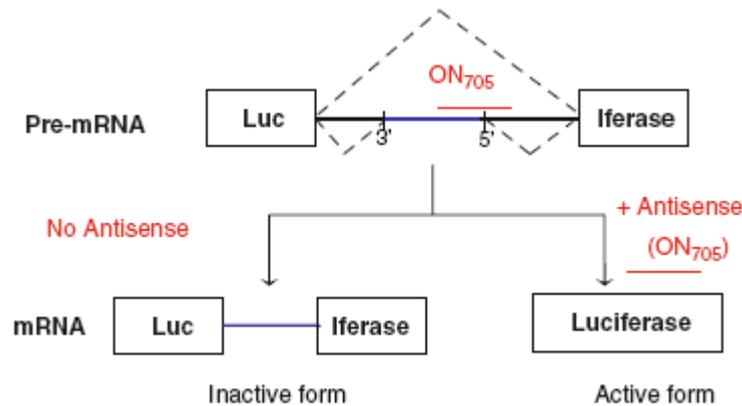
Beaucoup de molécules thérapeutiques doivent être délivrées dans le cytoplasme ou à des organelles individuels pour exercer leur action thérapeutique. Ces organelles peuvent être le noyau dans le cadre de thérapie génique, les lysosomes pour la délivrance d'enzymes lysosomiales déficientes ou encore la mitochondrie qui est la cible de composés anti-cancéreux pro-apoptotiques. Le nombre d'application des CPP *in vitro* et *in vivo* est en constante augmentation. En 2009, plus de 300 études ont été reportées.<sup>101</sup> Voici quelques applications représentatives de l'utilisation des CPP, le but n'étant pas de lister toutes les études déjà réalisées mais plutôt de montrer la diversité des domaines dans lesquels les CPP sont utilisés.

##### *4.1. Délivrance d'acides nucléiques*

La faible capacité de l'ADN à traverser la membrane plasmique limite son accès au niveau de sa cible intracellulaire, ce qui constitue un obstacle majeur dans l'utilisation d'ADN comme molécule thérapeutique. L'utilisation de CPP peut contourner ce problème. Voici quelques exemples de leur utilisation pour augmenter la délivrance de différents acides nucléiques

La plupart des groupes de recherches utilisent le test « splicing redirection » décrit par le groupe de Kole<sup>102</sup> (figure 9) pour tester l'efficacité de leur CPP à délivrer un PNA. Brièvement, les cellules sont transfectées stablement avec une luciférase non fonctionnelle.

L'ajout de CPP-PNA, après internalisation et action du PNA dans le noyau, permet d'obtenir une luciférase fonctionnelle.



**Figure 9** : Test développé par Kole pour le test de CPP-PNA.<sup>102</sup>

En utilisant ce test, il a été démontré que (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PNA augmentait très fortement l'expression de la luciférase, avec des EC<sub>50</sub> de l'ordre du micromolaire, sans utiliser d'agents endosomolytiques. Des résultats similaires ont été obtenus avec (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PMO et R<sub>6</sub>-Pen-PMO.<sup>103</sup>

(R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PMO a été utilisé avec succès dans le traitement de la myopathie de Duchenne, une maladie héréditaire causant la plus sévère des dystrophies musculaires.<sup>58</sup>

Un PNA ciblant l'ARNm du récepteur à la galanine de type 1 a été couplé au transporteur, par l'intermédiaire d'une liaison covalente. Une forte réduction de l'expression du récepteur à la galanine dans des cellules de mélanome de Bowes a alors été observée. De son côté, Pep-2 a permis une délivrance efficace de HypNA-pPNA, un composé thérapeutique ciblant la cycline T1,<sup>35</sup> ce qui a eu pour conséquence l'inhibition *in vitro* de la prolifération de cellules de cancer du sein de plus de 90 %. Un CPP, nommé POD (peptide for ocular delivery) a délivré avec succès un ARNsi dans des cellules rétinienne, après injection intravitréenne, résultant en une extinction de gène supérieure à 50%.<sup>104</sup>

#### 4.2. Augmentation de l'absorption

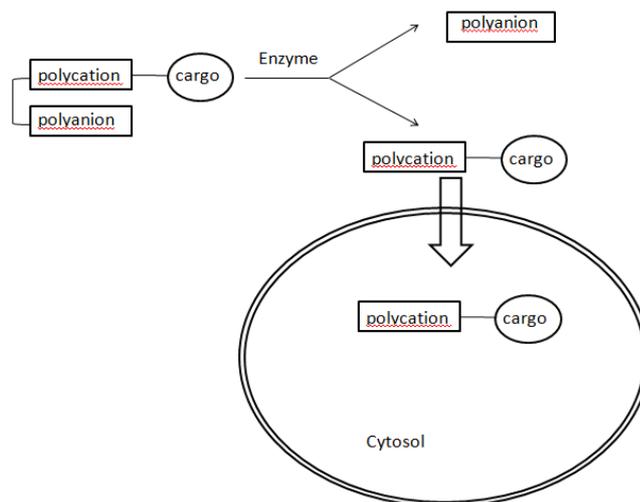
Les CPP améliorent l'absorption de molécules thérapeutiques à travers la paroi intestinale et la peau. Le couplage d'un polymère d'arginine à la cyclosporine A augmente l'absorption

dermique *in vivo* après une simple application topique, dans le cadre de traitement de psoriasis, maladie cutanée chronique caractérisée par l'éruption de plaques érythématosquameuses.<sup>105</sup>

L'insuline, utilisée lors du traitement du diabète, est typiquement injectée au patient par voie sous-cutanée. Toutefois, dans plusieurs études, il a été démontré que la co-administration de polyarginine améliore l'absorption intestinale de l'insuline, prouvant ainsi la faisabilité d'utiliser une autre voie d'administration que l'injection en sous-cutanée.<sup>106,107</sup> Les interactions ioniques entre le CPP et l'insuline sont le facteur clé dans cette stratégie.<sup>108</sup>

#### 4.3. Délivrances ciblées

Les MMPs (Matrix Metalloproteinase) sont des enzymes présentes dans le milieu extracellulaire à la périphérie tumorale. MMP-2 a la capacité de cliver la liaison G-L de la séquence PLGLAG.<sup>109</sup> En suivant ce rationnel, un CPP activable (ACPP) a été conçu (figure 10). Il s'agit d'un polymère d'arginine (Arg<sub>9</sub>) en série d dont les charges cationiques sont neutralisées grâce à un polymère d'acide glutamique, lui aussi en série d. Ces deux polymères sont reliés par la séquence substrat Ahx-PLAGLAG.



**Figure 10 :** Structure schématique de l'ACPP. D'après Jiang et al.<sup>109</sup>

Le polymère d'arginine internalise 120 fois plus que l'ACPP suite à l'action de MMP-2 (clivage au site GL et séparation des deux homopolymères). Cela permet une internalisation préférentielle du peptide au niveau tumoral. Récemment, le groupe de Nguyen a appliqué cette stratégie pour la visualisation de tumeur avec le même ACPP conjugué à un dendrimère

(ACPPD),<sup>110</sup> le but étant d'aider le chirurgien à visualiser les nodules tumoraux restant après ablation de la tumeur. Après injection iv, les deux molécules (ACPP et ACPPD) couplés à la sonde Cy5 permettent la visualisation de tumeurs non visibles à la lumière blanche. Mais le nouveau composé permet un meilleur contraste par rapport à l'ACPP (bruit de fond plus faible). De plus, avec l'ACPPD, le nombre de cellules tumorales (mélanome humain) restantes après la chirurgie diminue d'un facteur 10 comparé au protocole standard appliqué par le chirurgien. Cette diminution augmente la survie des souris d'un facteur deux (25 semaines de suivi après la chirurgie).

Plusieurs autres stratégies d'internalisation ciblée, réalisées avec le peptide Tat, seront développées dans le chapitre IV de cette introduction bibliographique.

## 5. Essais cliniques

Cette partie concerne les essais thérapeutiques de molécules couplées à un CPP. Voici la définition des différentes phases :

La **phase I** cherche à déterminer la dose maximale tolérée d'un médicament pour un schéma d'administration précis et comporte éventuellement une étude pharmacocinétique.

La **phase II** évalue l'efficacité d'un nouveau traitement et sa toxicité à court terme pour une dose et un schéma déterminés. Les patients doivent présenter des cibles mesurables.

La **phase III** cherche à confirmer l'efficacité d'un thérapeutique ayant montré un intérêt en phase II en comparaison avec un traitement de référence. Ces essais conduisent en général à une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Les **phases IV** ont pour objectif l'étude des toxicités tardives.

### 5.1. *AviBiopharma, AVI-5038*

La myopathie de Duchenne, qui affecte un garçon sur 3500, est due à des mutations portant sur le gène de la dystrophine. La stratégie thérapeutique consiste à restaurer la synthèse de la dystrophine par les cellules de patients corrigées par saut d'exon. AVI-5038 a été conçu dans cette optique. Les études pré-cliniques concernant AVI-5038 (ou [(R-Ahx-R)<sub>4</sub>]-PMO) ont montré que le composé est toléré à des doses supérieures à 9 mg/kg, en injection par voie iv une fois par semaine pendant quatre semaines. Toutefois, l'injection pendant douze semaines à des doses supérieures à 15 mg/kg a montré chez certains patients une toxicité significative. Les études précliniques sont achevées mais les analyses des résultats sont toujours en cours

lors de la rédaction de ce manuscrit. Par ailleurs, en février 2010, AVI-5038 a reçu la désignation de médicament orphelin de la part du comité des produits médicaments orphelin de l'EMA (European Medicines Agency).

### *5.2. Kai Pharmaceutical, KAI-9803*

Le traitement contre l'infarctus du myocarde (IDM) est essentiellement la thrombolyse afin de rompre l'occlusion présente dans l'artère coronaire suivie d'une reperfusion de l'artère. Mais, pendant la reperfusion, l'œdème ainsi que les débris thromboemboliques perturbent le flux microvasculaire, ce qui augmente les dommages cardiaques.

La protéine kinase C  $\delta$  est un médiateur de dommage cardiaque après ischémie et reperfusion. Son inhibition permet la réduction de l'apoptose microvasculaire de 70 %. Un peptide inhibiteur de PKC  $\delta$  conjugué de façon covalente au CPP Tat a été évalué contre l'IDM. Ce peptide chimérique porte le nom de KAI-9803.

Dans l'étude de phase I/II (DELTA-MI), les patients ayant reçu KAI-9803 ont montré des lésions du muscle cardiaque moins importantes que les patients ayant reçu le placebo. De plus, la taille de l'infarctus est plus faible et la perfusion microvasculaire est améliorée.

La phase IIb (PROTECTION AMI), mesurant l'efficacité de KAI-9803 à réduire les dommages cardiaques de patients ayant présentés un IDM avec élévation du segment ST (STEMI), est en cours à l'heure actuelle.

### *5.3. Revance Therapeutics Inc, RT001*

La technologie TransMTS™ rend possible la délivrance transcutanée de grosses macromolécules sans utiliser de procédure invasive, comme l'injection par exemple. Cette technologie est basée sur l'utilisation d'un peptide constitué d'une part de lysines qui forment des interactions non covalentes avec les résidus chargés négativement de la protéine cargo et d'autre part par le CPP Tat qui est présent à chaque extrémité du peptide. Un exemple de cette technologie est RT001 où le cargo est la toxine botulinum de type A, mieux connu sous le nom de BOTOX®. RT001 est en phase II/III pour le traitement des rides d'expression (« pattes d'oie ») modérés à sévères.

#### 5.4. Traversa Inc

Traversa a développé une technologie pour la délivrance d'ARNsi nommée PTD-DRBD. PTD-DRBD est une protéine contenant plusieurs domaines de transduction protéique (PTD correspondant au peptide Tat) ainsi qu'un domaine de liaison à un ARN double-brin (DRBD, Double-stranded RNA Binding Domain). Le motif PTD de la protéine induit la délivrance dans la cellule par macropinocytose. Le motif DRBD permet la liaison à un ARNsi, au travers d'interactions non covalentes. La protéine PTD-DRBD recouvre et ainsi protège l'ARNsi des dégradations enzymatiques. Une fois internalisé, l'ARNsi est relargué dans la cellule. Grâce à cette technologie, la réponse biologique est nettement supérieure en comparaison à celle obtenue en utilisant des liposomes ou la lipofectamine, avec une efficacité de transfection supérieure à 99 % dans de nombreux types cellulaires (tableau 12).

Percentage siRNA delivery and RNAi response by cell type						
	Use	Less than 10%	Less than 25%	Less than 50%	Less than 75%	Greater than 99%
PTD-DRBD	Therapeutics, Screening & Target Validation				Neuronal cells	Primary cells Tumor cells B cells T cells Macrophage Stem cells Fibroblasts Melanoma Adenocarcinoma Carcinoma Glioblastoma Keratinocyte
Liposomes	Therapeutics		B cells T cells Macrophage Neuronal cells Stem cells Fibroblasts	Primary cells Melanoma	Tumor cells Adenocarcinoma Carcinoma Glioblastoma Keratinocyte	
Lipofection (e.g. Lipofectamine)	Screening & Target Validation	B cells T cells Macrophage	Neuronal cells Stem cells Fibroblasts Melanoma	Primary cells	Tumor cells Adenocarcinoma Carcinoma Glioblastoma Keratinocyte	

**Tableau 12 :** Réponse cellulaire en fonction de la méthode de délivrance.

Source : Traversathera.com

Enfin, depuis mars 2010, Traversa Therapeutics et Sanofi-aventis se sont associés pour développer la technologie de délivrance d'ARNi de Traversa et tester de nouvelles molécules en essais cliniques.

### 5.5. CDG Therapeutics Inc.

L'azurine est un membre de la famille des cuprédoxine qui pénètre préférentiellement les cellules cancéreuses et y exerce des effets cytostatiques et cytotoxiques (apoptose). La séquence PTD correspondant aux résidus 50 à 77 est nommée p28. Le peptide p28 internalise plus efficacement les cellules tumorales probablement à cause d'une N-glycosylation supérieure de ces cellules par rapport aux cellules saines.<sup>111</sup> Une étude de phase I portant sur l'utilisation de p28 dans le traitement de tumeurs solides exprimant p53 et résistantes aux traitements standards a débuté en avril 2009.

## 6. Technologies basées sur les CPP

### 6.1. Panomics Inc

DeliverX™ est un agent de transfection basé sur une technologie de délivrance grâce au CPP MPG. Ce peptide se complexe à des acides nucléiques et forme des nanoparticules (150-200 nm) capables de diffuser à travers la membrane plasmique et de relarguer leur contenu à l'intérieur de la cellule. Le mécanisme d'entrée se fait par translocation directe, ce qui évite la dégradation endosomale et lysosomale du cargo. Cette technologie n'induit pas de diminution de la viabilité cellulaire et est applicable à des lignées cellulaires difficiles à transfecter.

### 6.2. CEPEP-III

CePeP a conçu un CPP activable dont la délivrance localisée est induite lorsqu'une enzyme spécifique est présente (cf figure 10). Par exemple, le CPP s'internalise uniquement lorsque la MMP2 (Matrix Metallo-Protease 2) clive une petite séquence peptidique au sein du CPP, rendant ainsi le CPP « actif ». CePeP a également observé qu'un CPP couplé au méthothrexate permettait d'inhiber les phénomènes de résistance des cellules tumorales envers cet agent chimiothérapeutique, comme nous l'avons vu avec R<sub>8</sub>-Taxol. CePeP ne mentionne pas la nature des CPP utilisés, toutefois, il apparaît que l'un d'eux soit pVEC, un peptide dérivé de la glycoprotéine cadhérine qui est impliquée dans l'adhésion cellulaire.

En conclusion de ce chapitre, il a été largement démontré que les CPP permettent de contourner les problèmes de biodisponibilités associées à certaines drogues telles que les peptides, protéines et acides nucléiques et présentent une faible cytotoxicité cellulaire. Une délivrance rapide et efficace du cargo dans la cellule est alors obtenue. Vingt ans après leur découverte, les CPP sont à la porte de la clinique. La majeure attention à l'heure actuelle est le ciblage spécifique du transporteur-cargo dans les cellules visées afin de limiter sa dispersion dans tout l'organisme.

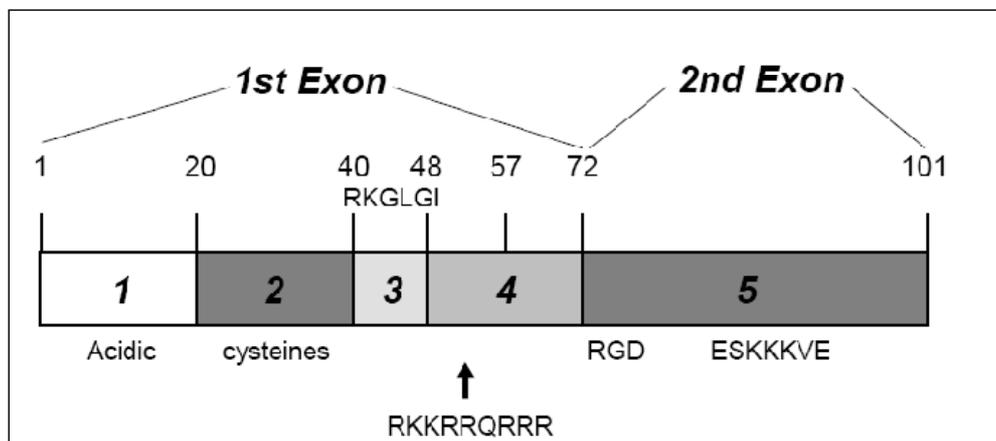
### III Tat

Bien souvent, la protéine Tat ainsi que sa séquence PTD (aa 49-57) sont abrégées par le terme Tat, sans aucune distinction. Pour plus de clarté dans ce manuscrit, l'acronyme Tat correspond à la séquence PTD. Le terme « protéine Tat » correspond à la protéine virale.

#### 1. La protéine Tat

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) contient six gènes régulateurs dont *tat*. La protéine Tat, pour Trans-Activateur de Transcription, est requise pour la transcription et pour l'amplification des gènes viraux dans les cellules infectées.<sup>112</sup> En tant que facteur de transcription, Tat régule la vitesse de réplication du virus, ce qui est un des éléments essentiels dans la progression de la maladie vers le stade SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise).

En plus de son rôle dans le cycle viral, la protéine Tat, libérée dans le sérum des patients infectés, est capable d'interagir avec les cellules non infectées favorisant la réplication du virus, montrant ainsi la capacité de cette protéine à s'internaliser dans les cellules. Tat induit la production d'IL-10, une cytokine fortement immunosuppressive.<sup>113</sup> Cela suggère que la protéine Tat peut jouer un rôle dans l'évolution de la maladie en participant à l'affaiblissement du système immunitaire.<sup>114</sup> La protéine Tat possède également un fort pouvoir pathogène, allant de l'induction de l'apoptose<sup>115</sup> à l'augmentation de l'expression des co-récepteurs du VIH.<sup>116</sup>



**Figure 11** : Domaine de classification de la protéine Tat, d'après Jeang et al.<sup>117</sup>

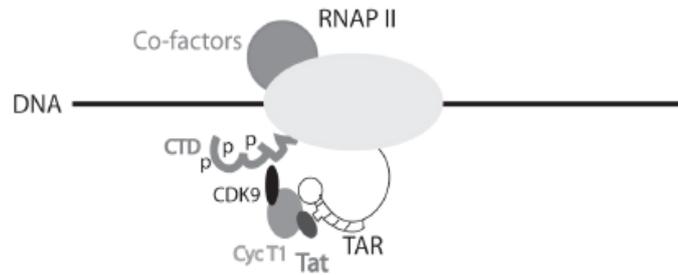
La protéine Tat est synthétisée à partir d'un ARNm composé de deux exons. Le premier code pour les aminoacides (aa) 1 à 72 et le second pour les aminoacides 73 à 101 (figure 11).

Cette protéine est caractérisée par cinq domaines, dont quatre localisés dans le premier exon.<sup>118</sup> Le premier domaine comprend les vingt premiers aminoacides et est riche en résidus acides. La région 20 à 39 constitue le second et contient 7 cystéines très importantes pour l'activité de transactivation car la mutation d'une seule abolit l'activité biologique de la protéine Tat.<sup>119</sup> Le domaine 3 constitué des résidus 40 à 48 contient le motif RKGLGI qui est commun à HIV-1, HIV-2 et SIV (Simian Immunodeficiency Virus). Il est à noter que les aminoacides 1 à 48 sont impliqués dans l'interaction de Tat avec de nombreuses protéines cellulaires telles que la cycline T1 (Cyc T1).<sup>120</sup> La quatrième région (aa 49 à 72) contient le domaine basique (aa 48 à 56) responsable de la localisation nucléaire et de la transduction de la protéine.<sup>121, 23</sup>

Le second exon couvre les aa 73 à 101 et contient la séquence RGD qui est utilisée comme signal d'adhésion cellulaire pour la liaison aux intégrines. Cet exon n'est pas essentiel pour la transactivation du gène de transcription<sup>122</sup> mais il est important pour la propagation virale et la pathogénicité.<sup>123, 124, 125</sup>

### *1.1 Rôle de la protéine Tat dans la transcription virale*

La protéine Tat se lie sur l'élément TAR (Trans-Activation Responsive element), une séquence présente à l'extrémité 5' de tous les ARNm du virus. Cette interaction augmente jusqu'à plusieurs centaines de fois la transcription virale. Lors de cette activation, Tat joue le rôle d'adaptateur entre l'ARN viral et des protéines cellulaires impliquées dans la transcription des gènes de la cellule (figure 12). En particulier, Tat interagit avec la cycline T1, et recrute l'activité kinase de CDK9 ce qui induit la phosphorylation du domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II. Ceci a pour conséquence la stimulation de la transcription et augmente fortement la synthèse des ARNm viraux.



**Figure 12 :** Transactivation induite par Tat. D'après Liang et al.<sup>126</sup>

### 1.2. Mécanisme d'internalisation de la protéine Tat

La protéine Tat peut se lier au récepteur cellulaire CD26<sup>127</sup> puis est endocytée. Une fois dans l'endosome, Tat traverse la membrane pour atteindre le cytosol. Cette étape de translocation est déclenchée par le faible pH endosomal (5,3-5,5) et est aidée par la protéine chaperone cytosolique Hsp90.<sup>128</sup> Le mécanisme est l'endocytose dépendant de la clathrine.<sup>128</sup>

## 2. Le peptide Tat

### 2.1. De la protéine Tat au domaine de transduction protéique

En 1988, deux groupes distincts, celui de Frankel<sup>19</sup> et celui de Green,<sup>20</sup> ont démontré la capacité de la protéine Tat à pénétrer dans les cellules et à atteindre le noyau.

Frankel et Pabo, en utilisant le gène rapporteur CAT (Chloramphénicol AcétylTransférase) placé sous le contrôle du LTR (Long Terminal Repeat) de HIV-1, ont montré une activation dose-dépendante par la protéine Tat. L'ajout de chloroquine augmente 7000 fois l'activité, ce qui indiquait déjà une séquestration endosomale conséquente de la protéine. Enfin, en radiomarquant la protéine à l'iode 125, il a été démontré que seulement 3 % de la quantité de protéine extracellulaire était internalisée dans les cellules et 80 % de la radioactivité était concentrée dans le noyau.

Au même moment, pour identifier le domaine de la protéine Tat qui active l'expression virale, Green et Loewenstein montrent également que la protéine Tat extracellulaire possède un taux de transactivation rapide (40 % en 30 min et 100% en 1 à 2 heures). En utilisant des protéines mutées, les auteurs mettent notamment en évidence l'importance des résidus 37 à 52 dans la translocation intracellulaire de la protéine Tat. Suite à la synthèse d'un mutant composé des aa

49 à 57 (RKKRRQRRR), ils avancent que cette séquence est importante pour la translocation de Tat et qu'elle se lie très fortement au LTR. Le mutant 37-62 où les aminoacides 55 à 57 (3 Arg) ont été remplacés par trois alanines n'est plus internalisé, indiquant déjà un rôle important joué par les résidus arginines.

En 1991, Mann et Frankel furent les premiers à proposer l'utilisation de la protéine Tat comme « instrument » pour faciliter la transduction intracellulaire de protéines ou de macromolécules d'intérêts.<sup>129</sup> En 1994, Fawell et al. ont démontré que le couplage de la séquence 37-72 à diverses enzymes permettait leur délivrance intracellulaire par un mécanisme de type endocytaire.<sup>130</sup> L'injection iv de Tat(37-72)- $\beta$ -galactosidase à des souris montre que le complexe est principalement localisé au niveau du foie, de la rate, du cœur et de façon plus faible dans les muscles squelettiques et les poumons. Le complexe n'est localisé ni dans les reins, ni dans le cerveau. Dans cette même étude, deux variantes de Tat (37-58 et 47-58) ont également amélioré l'internalisation de  $\beta$ -galactosidase, RNase A et PE(III) avec une efficacité qui dépend du cargo. Ces résultats démontrent l'efficacité de Tat dans la délivrance de cargos protéiques *in vitro* et *in vivo*.

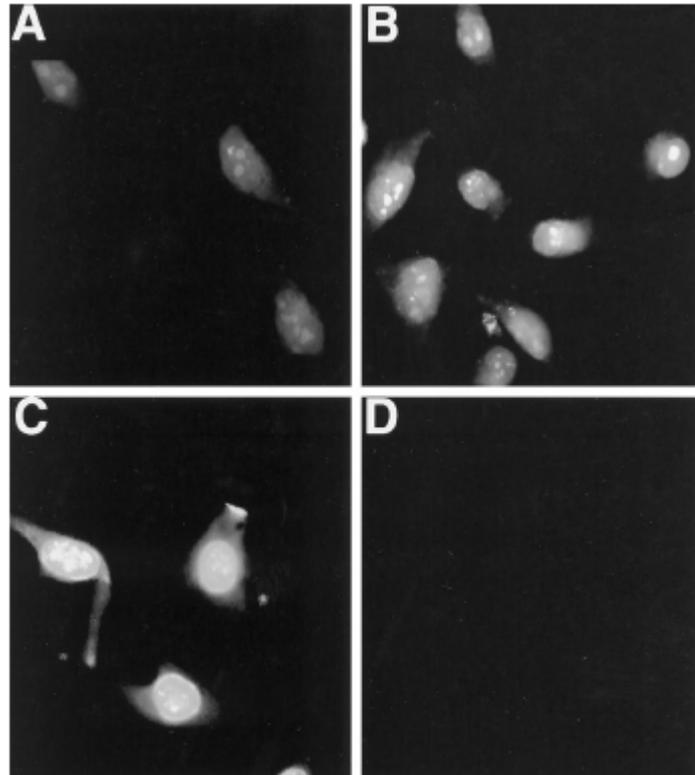
Mais ce n'est qu'en 1997 que la séquence peptidique minimale responsable de l'internalisation a été déterminée.<sup>23</sup> Cette séquence est également nommée PTD, pour domaine de transduction protéique. Les auteurs ont comparé quatre séquences peptidiques issues de la protéine Tat, correspondant aux aa 37-60 (qui sert de référence pour cette étude), aux aa 37-53, 43-60 et 48-60 (figure 13). Les résidus hydrophobes soulignés sont impliqués dans la structure en hélice  $\alpha$  amphipatique au niveau des résidus 38 à 49.

TAT48-60                                    C(Acm)GRKKRRQRRRPPQC  
 TAT43-60                                    C(Acm)LGISYGRKKRRQRRRPPQC  
 TAT37-60 C(Acm)FITKALGISYGRKKRRQRRRPPQC  
 TAT37-53 C(Acm)FITKALGISYGRKKRRC

**Figure 13** : Structure primaire des différents peptides. D'après Vivès et al.<sup>23</sup>

Ces différents peptides ont été incubés à 37°C, à une concentration de 1  $\mu$ M pendant 10 minutes (20  $\mu$ M pour Tat 37-60). Ainsi, les auteurs ont pu déterminer que la séquence 37-53 (figure 14D) n'est pas internalisée par les cellules. Le peptide (48-60) s'accumule dans le

noyau (Figure 14C) plus efficacement que les trois autres peptides testés (Figure 14A : Tat 37-60, Figure 14B : Tat 43-60).

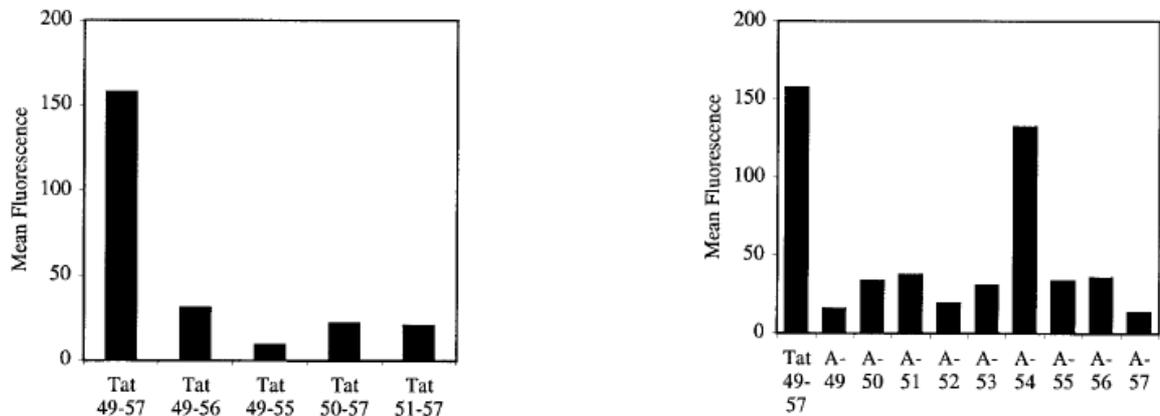


**Figure 14 :** Internalisation cellulaire des peptides dans les cellules HeLa.  
D'après Vivès et al.<sup>23</sup>

Il apparaît donc que la fonction de translocation intracellulaire soit portée par la séquence fortement cationique 48-60. L'internalisation est dose-dépendante et l'accumulation nucléaire est observée aussi bien sur cellules fixées que sur cellules vivantes. L'internalisation est également indépendante de la température et n'est pas due à une rupture de l'intégrité membranaire des cellules. En effet, la co-incubation des cellules avec du peptide et un excès de TAMRA-SE (un dérivé de la rhodamine) ne permet pas l'incorporation de TAMRA-SE alors que le peptide fluorescent y est détecté. De plus, le peptide (48-60) n'est que faiblement toxique et seulement à haute concentration (85 % de viabilité à 100  $\mu$ M, après 24h d'incubation).

Enfin, un peptide contenant la séquence basique entière (aa 48-57) montre les mêmes résultats que ceux obtenus avec les aa 48-60, montrant ainsi que les trois résidus côté C-terminal (PPQ) n'ont pas d'influence.<sup>131</sup>

Ces résultats ont été confirmés par Wender et al.<sup>26</sup> suite à la délétion d'une ou plusieurs arginine dans la séquence correspondant aux résidus (49-57) (RKKRRQRRR) et à l'étude de la contribution de chaque acide aminé dans l'internalisation de Tat par un « Ala scan ».



**Figure 15 gauche :** Influence de la délétion d'arginine sur Tat (49-57).

**Figure 15 droite :** « Ala scan » de la séquence peptidique de Tat (49-57).

D'après Wender et al.<sup>26</sup>

La délétion d'une seule arginine côté N-terminal (Tat 50-57) ou C-terminal (Tat 49-56) diminue de 80 % l'efficacité de l'internalisation (figure 15 gauche). La délétion d'une seconde arginine côté C-terminal (Tat 49-55) diminue encore l'efficacité de 65 %, alors que la délétion supplémentaire d'une lysine (Tat 51-57) n'a aucun effet. La contribution de chacun des acides aminés basiques dans l'efficacité d'internalisation de Tat (49-57) est élevée (figure 15 droite) induisant une diminution de l'internalisation de 70 et 90 % suite à leur remplacement individuel par une alanine. Par contre, la substitution de la glutamine 54 n'induit pas de réduction notable de l'internalisation du peptide. Les auteurs montrent également que les séquences de Tat en série D et rétro-inverso sont aussi efficacement internalisées que la séquence native. La chiralité n'a pas d'influence dans le mécanisme d'internalisation.

Depuis ces études, de nombreux groupes de recherche ont utilisé cette séquence 47 à 57 du peptide Tat (YGRKKRRQRRR) afin d'augmenter la délivrance intracellulaire de différents cargos

## 2.2. Mécanismes d'internalisation

Comme mentionné précédemment, les formes rétro-inverso et la séquence Tat en série d sont aussi efficacement internalisés que la séquence native, ce qui signifie qu'aucun récepteur spécifique n'est impliqué dans l'internalisation.<sup>26</sup> Par contre, l'association initiale avec la membrane plasmique repose sur des interactions multivalentes avec des sulfates d'héparanes protéoglycanes (HSPG) présent à la surface cellulaire. Toutefois, il est clairement admis que l'endocytose joue un rôle majeur.<sup>132</sup> Les peptides utiliseraient les trois voies endocytotiques simultanément (dépendante de la clathrine, macropinocytose et radeaux lipidiques/caveolae), ce qui est corrélé par le manque d'inhibition complète de l'internalisation par des drogues sélectives de chacune de ces voies d'internalisation.<sup>133</sup>

### 2.2.1. Liaison à la surface cellulaire : importance des arginines et des protéoglycanes

Les arginines (Arg) sont nécessaires pour la transduction, comme démontré précédemment. L'arginine diffère des autres aminoacides cationiques par sa capacité à former des liaisons hydrogènes bidentates avec les groupements sulfates, phosphates ou carboxylates.<sup>134</sup> Il a été démontré que ces liaisons contribuent fortement dans les interactions du peptide Tat avec la membrane cellulaire. Kida et al. ont remplacé les deux résidus lysines de Tat par deux arginines « Tat-8Arg » et ont montré une activité luciférase 50 fois supérieure en comparaison de l'ADNp seul.<sup>135</sup> Toutefois, afin de démontrer de façon non équivoque l'effet bénéfique lorsque les deux lysines sont mutées par deux arginines, il aurait fallu comparer l'efficacité de transfection de Tat-8Arg et Tat.

Dans une autre étude, Tat a été couplé à du polyéthylène imine (PEI) et l'efficacité de transfection de Tat-PEI envers un gène rapporteur a été comparé au PEI seul. L'ajout de Tat a permis d'augmenter la transfection d'un facteur 100. Mais de façon plus importante, ce résultat suggère que cette augmentation est due aux groupements guanidinium de Tat et non à sa charge positive.<sup>136</sup>

Les protéoglycanes (PG) comprennent un groupe hétérogène de protéines substituées avec des polymères linéaires polysulfatés nommés GAG, pour GlycosAminoGlycanes.<sup>137</sup> Le protéoglycane est formé après des modifications complexes, incluant des réactions de sulfatation, rendant à la molécule un caractère anionique. C'est pourquoi les chaînes GAG peuvent servir de sites d'attachement extracellulaires pour un grand nombre de composés polycationiques au travers d'interactions électrostatiques. Il a été démontré que les

protéglycanes jouent un rôle dans l'internalisation de facteurs de croissances, de lipoprotéines, de virus ou de bactéries.<sup>138, 139, 140</sup>

La quantité de peptide Tat internalisé diminue de 99 % avec des cellules ovariennes d'hamster chinois (CHO) déficientes en PG, en comparaison avec les cellules CHO sauvages.<sup>141</sup> De plus, un prétraitement des cellules avec du chlorate (inhibiteur de la sulfatation de GAG) montre là aussi une inhibition presque totale (98 %) de l'internalisation. Les PG servent « de réservoir de liaison » pour Tat et facilitent son interaction électrostatique avec la membrane.<sup>71</sup> Dans cette étude, Ziegler et al. ont également montré l'importance du nombre d'arginine pour la liaison à GAG. Une forte interaction est observée entre R<sub>9</sub> et GAG mais aucune entre le monomère d'arginine et GAG, suggérant ainsi que les interactions électrostatiques avec GAG requièrent une densité de charge minimale.

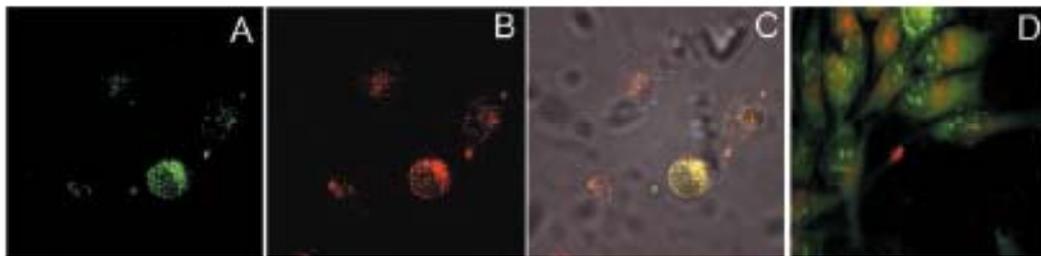
Les GAG sont donc importants pour l'interaction de Tat mais cet acronyme correspond à plusieurs polymères sulfatés différents (cf chapitre II). Parmi les GAG se trouvent les sulfates d'héparanes. Ce sont des polymères linéaires, ayant comme unité de base répétée un disaccharide, constitué d'un acide uronique et d'une glucosamine N-acétylée. L'héparine est un analogue soluble des sulfates d'héparanes. Sa présence en solution peut empêcher la liaison de Tat à la surface cellulaire, réduisant ainsi la transduction par compétition.<sup>142</sup> L'internalisation de Tat avec des cellules déficientes en sulfates d'héparanes ou prétraitées à l'héparinase III diminue également de 40 à 60 %.<sup>64</sup> Ces résultats indiquent clairement la forte contribution des sulfates d'héparane dans l'interaction des GAG avec Tat.<sup>143</sup>

Les sulfates d'héparane sont donc importants mais pas essentiels. En effet, l'internalisation étant seulement diminuée (jusqu'à 60 %) mais pas abolie, cela prouve l'existence d'un mécanisme indépendant des HS.

### 2.2.2. Artéfacts associés aux techniques expérimentales

Pour déterminer le mécanisme d'internalisation de Tat, beaucoup d'études se sont basées sur des résultats de microscopie de fluorescence sur des cellules fixées et de cytométrie en flux, suggérant que le peptide était internalisé par un mécanisme indépendant de l'énergie, indépendant de l'endocytose et de récepteurs spécifiques. Dans les cellules vivantes, les études par microscopie de fluorescence montraient que Tat présentait une distribution cytoplasmique ponctuelle. Mais la fixation des cellules avec 3,7 % de formaldéhyde changeait la distribution cellulaire du peptide, induisant principalement une localisation nucléaire marquée artéfactuelle. Suite à la fixation et à la poration de la membrane plasmique, le

peptide chargé positivement va alors interagir fortement avec les acides nucléiques chargés négativement. En 2007, Ziegler et al. ont en effet démontré que le CPP Tat possédait une forte affinité pour l'ADN.<sup>144</sup> Ainsi, en 2003, le mécanisme d'internalisation de Tat a été réévalué.<sup>62</sup> Les auteurs montrent que le mécanisme d'internalisation de Tat est l'endocytose et que le peptide se trouve majoritairement dans les endosomes (figure 16). L'observation de cellules non fixées fait apparaître une distribution d'Alexa-Tat vésiculaire (figure 16A, fluorescence verte), se co-localisant avec l'Alexa-Transferrine (figure 16B, fluorescence rouge et superposition sur la figure 16C, fluorescence jaune). La fixation de ces cellules induit ainsi une redistribution nucléaire de Tat, alors que la localisation de la transferrine reste inchangée (figure 16D).



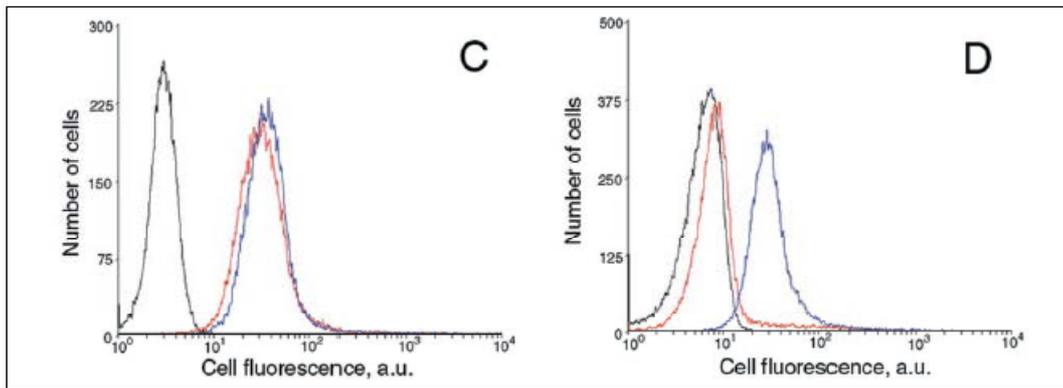
**Figure 16 :** Effet de la fixation cellulaire sur la distribution intracellulaire de Tat.

A : Alexa 488-Tat. B : Alexa 456-Transferrine. C : Colocalisation Tat et Transferrine.

A,B,C : cellules non fixées. D : Localisation nucléaire Tat et Transferrine sur cellules fixées.

D'après Richard et al.<sup>62</sup>

Dans cette même étude, un autre artefact a été identifié lors d'analyses par cytométrie en flux (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting). La fluorescence enregistrée du peptide associé aux cellules considère sans distinction le peptide lié à la membrane extracellulaire et la fraction internalisée (figure 17). Comme nous l'avons vu, Tat s'associe fortement à la surface des cellules, et la quantité de peptide internalisé peut être alors largement surestimée. Avant l'analyse, un traitement des cellules à la trypsine entraîne la digestion du peptide et d'une grande majorité des récepteurs cellulaires portant les chaînes anioniques, ce qui élimine alors le peptide lié extracellulairement.



**Figure 17 :** Association cellulaire de Tat avec ou sans traitement à la trypsine.

C : Incubation à 37°C. D : Incubation à 4°C. Traitement à la trypsine avant analyse FACS (rouge) ou non (bleu). Histogramme noir : cellules Jurkat seules. D'après Richard et al.<sup>62</sup>

La nécessité d'utiliser la trypsine lors d'études de délivrance de Tat avait déjà été préalablement observée par le groupe de Juliano en 2002.<sup>145</sup> Lors de l'étude de l'internalisation d'un oligonucléotide par Tat ou Antp, la vectorisation était efficace à 37°C mais totalement inhibée à 4°C. Cependant, en examinant le protocole expérimental utilisé lors des analyses par microscopie de fluorescence et par cytométrie en flux, on remarque que les cellules adhérentes ont été trypsinées, éliminant de fait les CPP-oligonucléotides adsorbés à la surface cellulaire.

D'autres groupes ont utilisé des protocoles alternatifs ne nécessitant pas l'action de la trypsine. Ainsi, une méthode très élégante avait été utilisée par Drin et al. en 2001.<sup>146</sup> Le fluorophore NBD (7-nitrobenz-2-oxo-1,3-diazol-4-yl) peut voir sa fluorescence quenchée par la dithionite, un composé imperméable à la membrane plasmique. La fluorescence émise par les cellules correspond donc seulement au peptide internalisé.

Une autre voie proposée est l'utilisation de cette construction : Abz-cargo-SS-CPP-(2-nitroTyr). Cette méthode requiert l'utilisation d'un fluorophore, Abz (acide 2-aminobenzoïque) couplé à un cargo. Le cargo est relié au CPP par l'intermédiaire d'un pont disulfure. Le CPP contient une 2-nitrotyrosine dont la fonction principale est de « quencher » la fluorescence émise par Abz. Une fois le complexe internalisé, le pont disulfure est donc réduit dans le cytoplasme rendant ainsi le cargo fluorescent uniquement lorsque celui-ci est internalisé.<sup>147</sup>

### 2.2.3. La macropinocytose

La macropinocytose, forme spécialisée de la pinocytose, a été de nombreuses fois considérée comme le mécanisme d'internalisation de Tat. L'utilisation d'inhibiteurs de la macropinocytose comme le Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD), la cytochalasine D ou l'EIPA (5(N-éthyl-N-isopropyl)amiloride), diminue de façon dose-dépendante l'internalisation de Tat ou de Tat couplé à un cargo.<sup>63,148,149</sup> Mais, une fois de plus, l'internalisation étant seulement diminuée mais pas totalement abolie, on peut en conclure que cette voie participe au mécanisme d'internalisation de Tat, mais elle n'est probablement pas la seule.

### 2.2.4. L'endocytose

Un autre mécanisme dépendant de l'énergie qui est l'endocytose a également été suggéré comme mécanisme d'internalisation de Tat.<sup>62,64</sup> En effet, des traitements à l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) ou au déoxyglucose inhibent ou réduisent très fortement l'internalisation du peptide.<sup>150</sup> Par ailleurs, comme vu précédemment, des études par imagerie de microscopie confocale sur des cellules vivantes montrent que Tat colocalise avec la transferrine (Tf), un marqueur d'endocytose typique.<sup>62, 150</sup>

Une internalisation efficace de Tat dans cellules Jurkat ou HeLa déficientes en caveoline-1 a été observée.<sup>67</sup> L'utilisation de cellules CHO exprimant fortement la caveoline a montré que la nystatine et la filipine III, deux inhibiteurs d'endocytose caveoline-dépendante, n'avaient pas d'effets sur l'internalisation. Il a donc été conclu que l'internalisation de Tat est caveoline-indépendante.<sup>62</sup> Toutefois, ces résultats sont en contradiction de ceux obtenus par Ferrari et al.<sup>151</sup> ainsi que Fittipaldi et al.<sup>152</sup>, où les auteurs démontrent une internalisation dépendante de la caveoline.

D'un autre côté, l'internalisation de Tat diminue de 50 % quand des cellules sont déplétées en potassium ou pré-incubées avec la chlorpromazine, deux stratégies utilisées pour inhiber l'endocytose dépendante de la clathrine. Ces résultats suggèrent alors que ce mécanisme est responsable de l'internalisation de Tat.<sup>64</sup>

Quel que soit le mécanisme d'internalisation, il apparaît que l'étape cruciale reste la sortie endosomale du peptide et de son cargo pour atteindre sa cible intracellulaire (cf Chapitre IV sur les applications de Tat). Cette étape clé requiert l'acidification de l'endosome sans quoi, la matériel endocyté est retenu dans l'endosome puis est dégradé lorsque celui-ci fusionne avec les lysosomes. En effet, l'ajout de chlorure d'ammonium NH<sub>4</sub>Cl, une base faible qui

augmente le pH des organelles acides tels que les vésicules endocytiques, sur des cellules HeLa induit une diminution de la fluorescence diffuse (cytoplasmique) mais pas celle qui est ponctuelle (vésiculaire). NH<sub>4</sub>Cl inhibe donc la sortie endosomale mais pas l'internalisation de Tat.<sup>150</sup> Zhang et al. ont également obtenu ce résultat avec la séquence rétro-inverso de Tat.<sup>153</sup>

Une des stratégies utilisées pour favoriser la sortie endosomale est l'utilisation du peptide fusiogène HA2, qui possède la propriété de déstabiliser la membrane endosomale à faible pH.<sup>154</sup> Wadia et al. ont prouvé que la co-incubation de Tat-Cre et Tat-HA2 augmentait de façon dose-dépendante la sortie endosomale de Tat-Cre, améliorant ainsi l'activité de recombinaison spécifique de Cre.<sup>63</sup>

L'utilisation d'agents lysosomotropiques peut également potentialiser la sortie endosomale du CPP ou du CPP-cargo. Le terme « agent lysosomotropique » désigne des substances qui sont internalisées spécifiquement dans les lysosomes. La chloroquine est une base faible qui tamponne le pH de l'endosome. Elle peut amener à son gonflement, ce qui altère son intégrité membranaire et permet le relargage intracellulaire de son contenu.<sup>155</sup> Wadia et al. ont également utilisé la chloroquine pour augmenter la sortie endosomale de Tat-Cre. L'effet escompté est effectivement atteint mais pour cela il faut utiliser la chloroquine à une concentration très élevée (> 100 µM) et qui induit une cytotoxicité supérieure à 90 %, <sup>63</sup> ce qui proscrie toute utilisation *in vivo*. Yang et al. ont aussi étudié l'effet de la chloroquine sur la délivrance d'ADN plasmidique codant pour la luciférase médiée par des dérivés de Tat (cf Chapitre IV).<sup>156</sup> L'expression du gène est 500 fois supérieure suite à l'utilisation de la chloroquine à une concentration de 100 µM. Dans ce cas, l'augmentation est nettement supérieure à celle induite par le peptide fusiogène HA2.

D'autres agents comme la bafilomycine qui inhibe l'acidification des lysosomes, ou l'acide poly(propylacrylique), un polymère sensible au pH qui induit la lyse des membranes endosomales, permettent également d'augmenter très fortement la quantité de Tat-cargo dans le cytoplasme.<sup>148</sup>

#### 2.2.5. Facteurs influençant l'internalisation

Un des faits les plus remarquables dans l'utilisation de Tat comme vecteur d'internalisation est que le cargo peut posséder une structure chimique très petite jusqu'à une structure massive de plus de 200 nm de diamètre (liposome). Le couplage du cargo au peptide Tat peut se réaliser sur chacune des deux extrémités, côté N-terminal ou C-terminal. Dans la plupart des cas, le cargo est couplé à Tat par l'intermédiaire d'un pont disulfure. Une fois le complexe

Tat-cargo internalisé, le pont est réduit dans le cytoplasme grâce à une concentration intracellulaire élevée en glutathione, ce qui provoque le relargage du cargo qui peut alors exercer son activité biologique. Le couplage d'un cargo à Tat a une influence notable sur son internalisation, que ce soit en termes qualitatif ou quantitatif.

Dennison et al.<sup>157</sup> ont démontré que le peptide Tat seul exerce un faible changement de pression au niveau de la surface de monocouche de phospholipides (2 mNm<sup>-1</sup>). Lorsqu'il est conjugué à un peptide cytotoxique (P10), le changement de pression de surface augmente (15 mNm<sup>-1</sup>). La perturbation subie par la membrane est alors plus forte, ce qui signifie que le cargo contribue à la capacité de Tat d'interagir avec la membrane. En conséquence, l'addition de molécules hydrophobes comme la fluorescéine peut favoriser la pénétration de Tat dans les cellules, point à considérer lors d'études du peptide dont le marquage par un fluorophore est nécessaire (cytométrie de flux, microscopie de fluorescence).

Un autre fait remarquable a été observé par El Andaloussi et al.<sup>158</sup> Trois CPP (Tat, TP10 et Penetratin) ont été comparés entre eux suite à leur couplage à différents cargos (tableau 13).

Cargos	Efficacité d'internalisation
Fluorescéine	Tat < Penetratin << TP10
Streptavidine	Penetratin < Tat << TP10

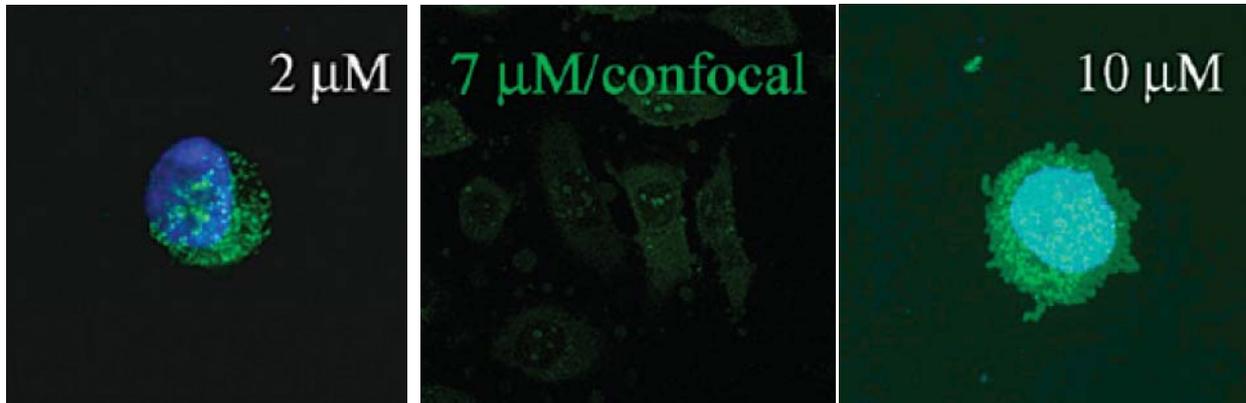
**Tableau 13 :** Efficacité d'internalisation selon le cargo. D'après El Andaloussi et al.<sup>158</sup>

Ces différences dans l'efficacité d'internalisation, obtenues avec des cellules HeLa, montrent bien qu'il est difficile de comparer plusieurs CPP, point déjà abordé dans le chapitre III.

En plus de son effet sur l'efficacité, le cargo peut « diriger » la voie d'internalisation de Tat. L'endocytose a été décrite comme la voie d'internalisation de Tat lorsqu'il est couplé à des micelles,<sup>159</sup> à des nanoparticules,<sup>152</sup> à l'ADN plasmidique.<sup>160</sup> La macropinocytose a été relatée comme mécanisme d'internalisation de PSD-Tat-Micelle,<sup>161</sup> de Tat-streptavidine,<sup>148</sup> de Tat-Cre.<sup>63,149</sup> Pour le dernier complexe Tat-Cre, l'endocytose a également été décrite comme voie d'internalisation dominante<sup>162</sup> montrant encore la difficulté à déterminer sans ambiguïté un mécanisme d'internalisation unique.

La concentration à laquelle le peptide est incubé sur les cellules a également une influence sur sa localisation intracellulaire. Zhang et al.<sup>153</sup> ont incubé des cellules Hela pendant 40 min avec le peptide Tat ou sa version rétro-inverso (figure 18). Par microscopie confocale, lorsque la

concentration en peptide est inférieure à 3  $\mu\text{M}$ , une fluorescence ponctuelle (vésiculaire) est observée. A 7  $\mu\text{M}$ , la fluorescence est également ponctuelle mais aussi diffuse. Puis pour une concentration supérieure à 7  $\mu\text{M}$ , la fluorescence est totalement diffuse aux niveaux cytoplasmique et nucléaire.



**Figure 18** : Localisation de Tat rétro-inverso selon la concentration (fluorescente verte). La fluorescence bleue est celle associée au noyau. D'après Zhang et al.<sup>153</sup>

La co-incubation des cellules avec de l'iodure de propidium (IP) exclut que cet import résulte d'un dommage membranaire induit par le peptide. De plus, un test de toxicité de type MTT a par ailleurs montré que le peptide n'était pas toxique pour une concentration jusqu'à 40  $\mu\text{M}$ . Cette localisation intracellulaire différente selon la concentration du peptide a également été observée par Duchardt et al.<sup>132</sup> ainsi que par Fretz et al. en utilisant des CPP de type octaarginines.<sup>164</sup>

### 2.3. Etudes de Tat sur des membranes artificielles

Les interactions ioniques entre les charges positives de Tat et les charges négatives de la membrane plasmique sont, nous l'avons vu, importantes. Mais les liaisons hydrogènes et hydrophobes de type Van der Waals contribuent également à hauteur de 20 % dans l'énergie de liaison du peptide avec la membrane.<sup>165</sup>

Mishra et al. ont démontré que les aminoacides cationiques de Tat interagissaient fortement avec les charges négatives localisées des lipides neutres zwitterioniques (DOPC) et anioniques (DOPS).<sup>166</sup> Une autre étude a mis en évidence une liaison de Tat avec le squelette glycérol et les têtes polaires à l'interface membrane-eau, dans un modèle de bicouche

lipidique DMPC/DMPG. La traversée membranaire du peptide est due à de fortes interactions électrostatiques entre Tat et les lipides anioniques membranaires, ainsi qu'à la stabilisation par liaison hydrogène des résidus arginines par les phosphates lipidiques et l'eau.<sup>167</sup>

La mobilité de Tat sur la surface de GUV (Giant Unilamellar Vesicle) anioniques est deux fois plus faible que sur des GUV neutres car l'interaction est plus longue avec le GUV anionique (20 ms contre 13 ms avec le GUV neutre).<sup>168</sup> Tat n'est pas immergé dans le domaine hydrophobe de la membrane mais flotte sur les têtes polaires de la bicouche lipidique. Pour les GUV anioniques, Tat est attiré par les charges négatives des lipides ce qui cause un attachement prolongé (association plus élevée) et une mobilité réduite en comparaison des membranes neutres. Un résultat similaire a également été observé en 2010 par le même groupe. Après 30 minutes d'incubation, le peptide Tat est seulement présent sur la surface mais pas à l'intérieur du GUV.<sup>169</sup>

#### 2.4. Biodistribution

Une étude très complète a été réalisée par Sarko et al.<sup>170</sup> et porte sur plusieurs paramètres pharmacocinétiques de 10 CPP différents radiomarqués à l'indium 111.

L'internalisation *in vitro* des CPP sur différentes lignées de cellules tumorales humaines a été quantifiée (SW1736 : carcinome de la thyroïde ; PC-3 : cancer de la prostate ; MH : cancer du foie ; HNO 97 : carcinome cellulaire squameux ; MCF-7 : cancer du sein ; HCT116 : carcinome colorectal). Les résultats concernant les peptides Tat (48-59) et penetratin sont donnés au tableau 14.

Peptide	Time (min)	% applied dose/10 <sup>6</sup> cells					
		SW 1736	PC-3	MH wt	HNO 97	MCF- 7	HCT 116
Penetratin	30	186.6 ± 41.5	88 ± 11.5	42 ± 3	76.4 ± 19.9	59.9 ± 2.4	21.1 ± 2.5
	180	111.6 ± 6.5	60.7 ± 2.6	19.9 ± 3.5	89.3 ± 7.4	44.1 ± 3.1	16.9 ± 1
Tat	30	105.6 ± 3.4	57.6 ± 23.1	31.4 ± 4.6	53.8 ± 6.3	19.2 ± 1.8	12.5 ± 3.3
	180	31.4 ± 14.1	15.2 ± 3.5	11.5 ± 5.1	44.8 ± 11.8	2.5 ± 1.2	2.4 ± 0.2

**Tableau 14 :** Internalisation cellulaire de penetratin et Tat. D'après Sarko et al.<sup>170</sup>

Le pourcentage de peptide internalisé est dans certains cas assez élevé en comparaison des valeurs qui ont déjà été décrites, notamment pour Tat (entre 1 et 2 % en moyenne, cf chapitre III). Les valeurs sont extrêmement variables, allant de 12 % à plus de 100 %, à 30 minutes. Ceci reflète bien la différence d'efficacité d'internalisation d'un même CPP pour différents types de cellules. Toutefois, les auteurs ont quantifié cette internalisation, après incubation du peptide sur les cellules, en les lavant avec du PBS puis en les lysant avec une solution de soude. Ce protocole ne mentionne pas l'utilisation d'une quelconque enzyme (trypsine ou autre). Or pour Tat, il a clairement été démontré que sans ce traitement, il y avait une surestimation de l'internalisation.<sup>62</sup> Dans l'étude de Sarko, les auteurs parlent d'internalisation alors qu'il s'agirait plutôt d'une association cellulaire. La biodistribution des différents CPP chez la souris présentant une tumeur de la prostate a été évaluée. Les composés ont été injectés par voie intraveineuse et les résultats obtenus avec le peptide Tat sont exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme de tissu (%ID/g) dans le tableau 15.

temps	sang	cœur	poumon	rate	foie	reins	muscles	intestin	cerveau	tumeur
10 min	5,9	6,5	12,6	9,5	16,7	43,9	2,6	7	0,4	3,6
60 min	1,1	0,7	2	1,9	11,8	66,5	0,7	0,8	0,1	0,8
240 min	0,1	0,2	0,3	1,3	10,2	55,4	0,5	0,4	0,1	0,2

**Tableau 15** : Biodistribution de Tat. D'après Sarko et al.<sup>170</sup>

Nous pouvons observer une élimination rapide de Tat présent dans le sang. La tumeur est faiblement ciblée par Tat, présentant des valeurs (%ID/g) très faibles, ce qui est également le cas pour le cerveau et les muscles. Sans réelle surprise, Tat est fortement localisé au niveau du foie et des reins en correspondance avec son élimination. La même tendance a été obtenue avec les autres CPP. Les résultats de Tat ont été confirmés par PET (Positron Emission Tomography) en visualisant la biodistribution de <sup>68</sup>Ga-Tat chez des rats sains, une heure après injection iv. L'image montre une localisation du peptide préférentiellement au niveau du foie et des reins mais pas au niveau du cerveau. Simon et al.<sup>171</sup> ont aussi observé que Tat-GFP et Tat ne traversent pas des monocouches de cellules endothéliales mimant la BHE. Ces deux études ne reproduisent donc pas les résultats obtenus par Schwarze et al.<sup>28</sup> Récemment, Simon et al. ont montré une internalisation efficace de Tat-GFP dans un modèle de cellule endothéliale représentatif d'une ischémie.<sup>171</sup> Une conséquence de l'ischémie est l'altération de la BHE, ce qui explique probablement pourquoi dans plusieurs études, le complexe Tat-cargo a traversé la BHE pour obtenir un effet neuroprotecteur dans des modèles d'ischémie.<sup>172,173</sup>

En conclusion de ce chapitre, il est important de considérer que la diversité de la séquence peptidique utilisée pour Tat, le très grand nombre de types de cellules étudiées, les variations en terme de cinétique (de quelques minutes à plusieurs heures), de concentration (de 1 à plusieurs dizaines de micromolaire), de mode de détection (microscopie de fluorescence, cytométrie en flux) font qu'il est difficile d'extraire des informations claires et non contradictoires pour définir un mécanisme d'entrée universel. Cette diversité d'informations indiquerait ainsi que le peptide est internalisé par endocytose suivant plusieurs voies simultanées. Mais un fait reste inchangé : le peptide Tat augmente l'internalisation du cargo qui lui est couplé, améliorant ainsi son activité biologique et ceci pour un domaine d'application extrêmement varié.

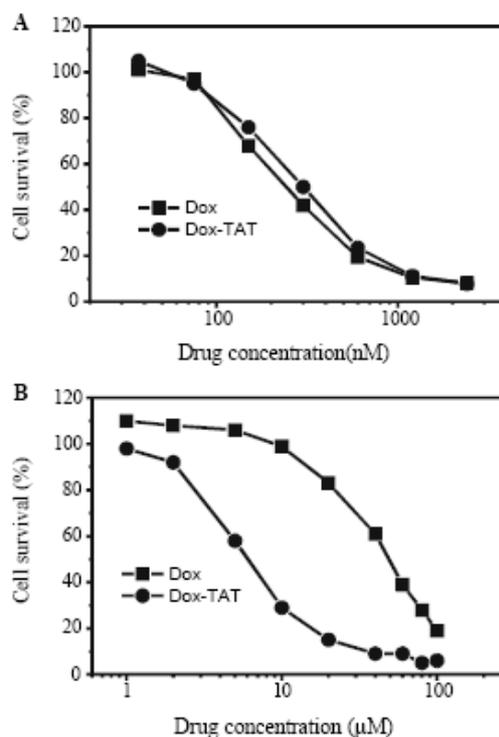
## IV Applications thérapeutiques de Tat

### 1. Thérapies anticancéreuses

#### 1.1. Composés chimiothérapeutiques

La résistance clinique des composés anticancéreux est la principale raison d'échec des traitements. En effet, 50 % des cancers humains sont résistants à la chimiothérapie, phénomène connu sous l'acronyme MDR (multidrug resistance).<sup>174</sup> Pour lutter efficacement contre cette perte d'efficacité, plusieurs groupes de recherche ont utilisé les CPP et notamment le peptide Tat pour augmenter l'activité anti-tumorale des chimiothérapeutiques.<sup>40,175,176</sup>

Ainsi, Tat a été couplé à la doxorubicine (Dox) de façon covalente.<sup>177</sup> La cytotoxicité envers des cellules de cancer du sein est sensiblement la même pour la doxorubicine seule et pour le complexe Tat-Dox, avec une  $IC_{50}$  de 0,25  $\mu$ M et 0,28  $\mu$ M, respectivement. L'effet bénéfique de Tat est obtenu seulement avec les cellules de cancer du sein MDR (figure 19).



**Figure 19** : Comparaison de la cytotoxicité de Dox et de Tat-Dox envers des cellules de cancer du sein (A) et des cellules MDR (B). D'après Liang et al.<sup>177</sup>

La concentration intracellulaire de Tat-Dox est 12 fois supérieure à celle de la Dox, ce qui se traduit par une  $IC_{50}$  9 fois plus faible (45,2  $\mu$ M pour Dox comparé à 5,8  $\mu$ M pour Tat-Dox). La doxorubicine internalise dans les cellules par diffusion passive. Les pompes à efflux (glycoprotéine p) peuvent permettre le relargage extracellulaire de la doxorubicine qui a été préalablement internalisée, conduisant à une résistance des cellules envers ce composé. Le complexe Tat-Dox internalise par endocytose et n'est pas soumis à l'action de la P-gp, ce qui induit une diminution de la survie cellulaire. Aroui et al.<sup>178</sup> ont également observé un effet bénéfique de Tat-Dox seulement sur des lignées de cellules résistantes à la doxorubicine. Récemment, un peptide Tat-DBM a été utilisé pour une délivrance de la doxorubicine de façon non covalente.<sup>179</sup> La séquence DBM (LWSPWYGGSW), pour motif de liaison à la drogue, forme des interactions hydrophobes avec la doxorubicine. Tat-DBM a augmenté l'internalisation de la Dox dans des cellules de leucémie humaine MDR ou non. Toutefois, les  $IC_{50}$  de Tat-DBM/Dox et de Dox seule sont comparables. L'ajout de chloroquine améliore de 48 % l'internalisation de Tat-DBM/Dox seulement pour la lignée MDR. D'ailleurs les auteurs en concluent que le système est moins efficace que celui de Liang puisque la liaison non covalente entre Dox et le CPP est plus faible qu'une liaison covalente. Le couplage de Tat à un agent chimiothérapeutique est donc seulement bénéfique dans le cadre de tumeurs résistantes à la chimiothérapie, en contournant l'action des P-gp, comme d'ailleurs nous l'avons vu pour d'autres CPP. Pour des tumeurs non MDR, l'ajout de Tat ou d'un autre CPP aux agents antitumoraux semble inutile.

### *1.2. Protéines et peptides antitumoraux*

Outre des molécules chimiothérapeutiques, des protéines ou des peptides antitumoraux ont été couplées à Tat dans le cadre de la thérapie des cancers.

La protéine p53 induit entre autres l'apoptose quand l'ADN génomique est sévèrement endommagé. Dans approximativement 50 % des cancers, le gène p53 est muté, ce qui augmente la résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie.<sup>180,181</sup> Dans le but de restaurer l'activité de p53, le domaine N-terminal de la protéine a été couplé à Tat.<sup>182</sup> Une accumulation rapide de p53 ainsi que l'activation des gènes apoptotiques est obtenue suite à l'injection intravitréenne de Tat-p53N, provoquant préférentiellement la mort des cellules tumorales et à la régression de rétinoblastome humain. Le gène VHL (von Hippel-Lindau) est

un gène suppresseur de tumeur et sa mutation est à l'origine de cancers. L'injection ip de Tat-VHL induit un retard de croissance de carcinome rénal.<sup>183</sup>

Les IAPs sont des protéines inhibitrices d'apoptose souvent surexprimées dans les tumeurs malignes.<sup>184</sup> La protéine Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) antagonise les IAPs pour promouvoir l'apoptose. La co-administration de TRAIL (TNF-related apoptosis-induced ligand) avec Tat couplé à un peptide dérivé de la séquence N-terminal de Smac améliore la capacité d'Apo2L/TRAIL à induire l'apoptose et à éradiquer des gliomes (tumeur du système nerveux central) *in vivo*.<sup>185</sup> Les auteurs montrent alors un effet synergique entre TRAIL et Tat-Smac.

Le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) est impliqué dans les propriétés d'invasion et de métastases des cellules tumorales.<sup>186</sup> L'ubiquitination du domaine de dégradation oxygène-dépendant (ODD) régule l'expression de HIF-1 $\alpha$ , sous-unité de HIF. L'injection ip de Tat-ODD- $\beta$ -Gal à des souris montre que l'activité  $\beta$ -Gal est uniquement détectée dans la région hypoxique de la tumeur solide prouvant ainsi un ciblage spécifique de ce complexe, dont l'internalisation est améliorée grâce à Tat. En remplaçant  $\beta$ -Gal par un précurseur de caspase-3, le complexe diminue la croissance tumorale *in vivo* chez la souris.<sup>187</sup>

### 1.3. Anticorps

Tat internalise également des anticorps<sup>188</sup> comme par exemple l'anticorps dirigé contre un inhibiteur intracellulaire de kinase cycline-dépendant, p21<sup>WAF-1/Cip-1</sup>. p21 protège les cellules des lésions létales de l'ADN et interférer avec la fonction protectrice de p21 peut augmenter la cytotoxicité d'agents anticancéreux. *In vitro*, la radioactivité associée au noyau est entre 12 à 15 fois supérieure dans des cellules de cancer du sein suite au couplage de Tat à l'anticorps radiomarqué,<sup>189</sup> montrant ainsi le potentiel de Tat à potentialiser la réponse biologique associée à un anticorps.

Le scFv (L19) est fragment d'anticorps qui lie le domaine ED-B de la fibronectine, un marqueur de la matrice extracellulaire environnant la néovasculature tumorale.<sup>190</sup> Malgré une internalisation plus efficace *in vitro*, la conjugaison de Tat à L19 a diminué par trois le ciblage de tératocarcinome de souris après injection iv, montrant bien que dans certains cas, les résultats obtenus peuvent être différents entre les études *in vitro* et *in vivo*. Un bon résultat *in*

*in vitro* n'est pas obligatoirement retranscrit *in vivo*, notamment à cause d'une aspécificité du complexe CPP-cargo envers sa cible ainsi qu'à une élimination rapide de la circulation systémique. Dans ce cas, l'utilisation de stratégie permettant un ciblage des tumeurs peut s'avérer utile.

#### 1.4. Liposomes

L'utilisation de liposomes comme système de délivrance présente de multiples avantages comme épargner les tissus sains des sous effets toxiques de la drogue qu'ils contiennent. En effet, la drogue étant seulement présente dans le cœur du liposome, elle ne peut pas interagir avec les tissus sains. De plus, les liposomes protègent également la drogue des dégradations enzymatiques ou métaboliques et augmentent le temps de circulation systémique. Enfin, les effets EPR induisent une accumulation préférentielle des liposomes au niveau tumoral notamment grâce à une vasculature poreuse des tumeurs. Tous ces facteurs revêtent leur importance dans le cadre d'études *in vivo*.

L'ajout de Tat à la surface de liposomes améliore leur internalisation dans des cellules de fibroblaste de rein,<sup>191</sup> de mélanome murin<sup>92</sup> de cancer de la vessie et de carcinome squameux.<sup>93</sup> Le couplage de Tat à des liposomes chargés en Dox fait croire d'un facteur 12 la doxorubicine dans des cellules de carcinome squameux. Mais cet effet *in vitro* n'a pas été confirmé *in vivo* car les deux types de liposomes (liposomes-Dox +/- Tat) ont la même capacité à ralentir la croissance de carcinome du colon murin. Deux cas de figures se présentent pour expliquer ce phénomène. Le premier est que l'ajout de Tat aux liposomes permet seulement d'augmenter la concentration intracellulaire de la Dox mais n'améliore pas l'effet biologique associé car celui-ci est déjà très efficace, comme il a été démontré avec les cellules MDR. La seconde hypothèse est que l'ajout de Tat diminue le « ciblage » des cellules cancéreuses par le liposome à cause de l'aspécificité cellulaire de Tat, ce qui est compensé par une internalisation plus efficace du complexe Tat-liposome lorsque celui-ci est proche de la tumeur.

Torchilin et al. ont montré une internalisation élevée de Tat-liposome/ADN plasmidique codant pour la GFP dans des cellules d'adénocarcinome du sein, de fibroblaste de souris et de cardiomyocyte de rats *in vitro*. L'analyse par microscopie confocale montre que 30 à 50 % des cellules ont été transfectées.<sup>192</sup> Après injection intratumorale de liposomes/ADNp avec ou

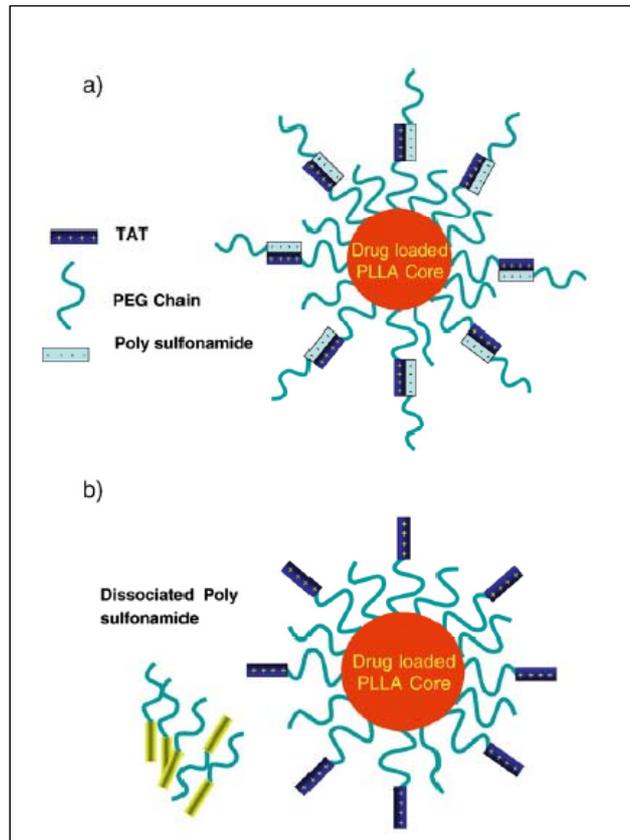
sans Tat, la microscopie de fluorescence des tissus tumoraux (carcinome de poumon) montrent une fluorescence supérieure suite au couplage de Tat.

Toutefois, il faut garder à l'esprit que le liposome ne permet pas une délivrance ciblée de la drogue qu'il contient mais seulement un ciblage passif via les effets EPR (internalisation du liposome supérieure à cause d'une vasculature poreuse des cellules tumorales). Toutefois, un ciblage du liposome est possible en couplant sur sa surface un anticorps (immunoliposome) ou des ligands dont le récepteur est surexprimé spécifiquement sur la cellule tumorale (VIP, RGD, EGF).<sup>17</sup>

### *1.5. Stratégie de ciblage de cellules tumorales*

Une des principales difficultés dans l'utilisation d'un complexe Tat-cargo *in vivo* est l'aspécificité cellulaire de Tat. En effet, comme précédemment décrit, la première étape du mécanisme d'internalisation est la liaison de Tat à la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques entre les aminoacides basiques de Tat et les constituants anioniques de la membrane, comme les protéoglycanes ou l'acide sialique.<sup>141</sup> Ceci signifie que Tat est potentiellement internalisable par n'importe quel type de cellule. Diverses stratégies ont donc été mises en œuvre pour obtenir une délivrance spécifique de Tat-cargo au niveau des cellules ciblées.

Sethuraman et al.<sup>161</sup> ont utilisé des micelles à base de Tat pour un ciblage actif de tumeur solide par des agents anti-cancéreux. Le peptide Tat, exposé à la surface du micelle, a ses charges positives neutralisées par des polysulfonamides (PSD) chargés négativement à pH physiologique (figure 20a). A la périphérie de la tumeur, le pH devient plus acide et entraîne la protonation des PSD qui, en se clivant du micelle expose Tat à la surface des cellules tumorales (figure 20b) ce qui induit une internalisation préférentielle du micelle dans le voisinage direct de cellules d'adénocarcinomes.



**Figure 20 :** Modèle schématique du micelle Tat-PSD. D'après Sethuraman et al.<sup>161</sup>

Une autre stratégie a été de greffer Tat, par l'intermédiaire de longues chaînes polyéthylène glycol (PEG), sur des micelles polymériques composés de polyhistidine (polyHis) et de polyacide lactique (PLA). A pH physiologique, Tat se trouve à l'interface entre le cœur hydrophobe et la couronne hydrophile grâce à des interactions avec les PLA et les polyHis neutres. A la périphérie tumorale, les polyHis s'ionisent, exposant ainsi Tat à la surface. Il en résulte là aussi une internalisation préférentielle dans les cellules tumorales environnantes induisant de fait un ciblage tumoral. En y incorporant de la doxorubicine, les micelles sensibles au pH sont jusqu'à huit fois plus cytotoxiques *in vitro* comparés aux micelles sans Tat sur plusieurs lignées de cellules tumorales MDR.<sup>159</sup>

Très récemment, des nanoparticules magnétiques composées d'oxyde de fer, d'or et de Tat soumises à champ magnétique externe ont été internalisées plus fortement par des fibroblastes humains immortalisés que les nanoparticules sans Tat.<sup>193</sup> En suivant le même raisonnement que précédemment, on peut envisager d'incorporer dans ces nanoparticules des drogues cytotoxiques pour obtenir une délivrance ciblée au niveau tumoral et une augmentation de l'effet biologique de la drogue sur la tumeur.

La modification chimique de micelles n'est pas la seule solution possible. On peut également coupler un peptide d'adressage à Tat. Par exemple, l'octréotate (Oct) est un peptide avide du récepteur à la somatostatine (STR) sur-régulé dans les cellules cancéreuses.<sup>194</sup> Le complexe Tat-Oct est sélectivement internalisé *in vitro* dans des cellules de carcinome pancréatique de rat STR positive. Par contre, le complexe n'internalise pas dans des cellules de cancer de poumon humain STR négative, ni dans des cellules non tumorales STR négative,<sup>195</sup> ce qui prouve une internalisation STR dépendante pour ce complexe. En absence du récepteur, les auteurs pensent que Oct doit interférer avec Tat, empêchant ainsi l'internalisation du complexe dans les cellules n'exprimant pas STR.

Une autre voie est l'utilisation de l'apoptine, une protéine dérivée du virus anémique du poulet. L'apoptose est obtenue dans de nombreuses tumeurs humaines et cellules transformées mais pas chez les cellules humaines saines.<sup>196</sup> Ceci est dû à la différence de localisation intracellulaire de l'apoptine dans les cellules saines (uniquement dans le cytoplasme) et dans les cellules cancéreuses (localisation nucléaire). Une protéine de fusion Tat-apoptine a induit *in vitro* l'apoptose uniquement sur des cellules tumorales (ostéosarcome humain) alors que les cellules saines (fibroblaste de poumon humain) ne montrent aucun signe de mort cellulaire<sup>197</sup> car le complexe Tat-apoptine est uniquement localisé au niveau cytoplasmique pour ces cellules. Cette restriction de localisation au niveau du cytoplasme est provoquée par l'apoptine puisque Tat-GFP est également présent dans le noyau des cellules saines et tumorales.

Enfin, Bidwel et al.<sup>198</sup> ont couplé Tat à polypeptide ELP (Elastin-Like Polypeptide) pour une délivrance ciblée de la doxorubicine. Une petite séquence peptidique reconnue par la cathépsine a été insérée entre ELP et Dox permettant son accumulation intracellulaire spécifique. L'ajout de Tat à cette construction ainsi que l'application d'une hyperthermie (température de 42 °C) augmente l'internalisation d'un facteur six dans des cellules de sarcome utérin et diminue l'IC<sub>50</sub> du complexe d'un facteur 15 (1,1 μM). Le but de l'hyperthermie est de provoquer une agrégation sélective du complexe via le peptide ELP, ce qui a pour conséquence une accumulation spécifique du complexe au niveau des cellules environnantes.

## 1.6. Imagerie

L'imagerie médicale sert à visualiser de manière non-invasive certaines parties du corps humain comme le système nerveux central, cardiovasculaire, des tumeurs et bien d'autres. Le peptide Tat, lorsqu'il est couplé à un agent de contraste ou à une sonde fluorescente, a permis avec succès la visualisation de la zone ciblée par différentes techniques. Ainsi, un marquage fluorescent de la rétine est observé après injection intravitréenne de Tat-Alexa Fluor 594 chez le rat. Le complexe Tat-FITC-Gd-DOTA (sonde fluorescence couplée avec un agent de contraste pour l'imagerie de résonance magnétique) est efficacement transloqué *in vitro* dans des cellules de gliomes, au contraire du complexe sans Tat.<sup>199</sup> Tat a également été couplé avec des particules d'oxyde de fer (CLIO-Tat) et à des nanoparticules superparamagnétiques pour des applications IRM.<sup>200</sup> Son ajout améliore l'internalisation jusqu'à 100 fois. Une délivrance cytoplasmique et nucléaire, rapide et efficace, de Tat-Technétium-99m est également observée dans des cellules Jurkat.<sup>201</sup> Ainsi, une efficacité d'internalisation du complexe plus élevée est obtenue suite au couplage de Tat et cette stratégie peut être appliquée à des techniques comme l'IRM, le PET ou encore l'imagerie de scintigraphie.

## 2. Autres pathologies

### 2.1. Délivrance d'enzyme

La galactocérébrosidase (GALC) est une enzyme lysosomiale dont la sous expression entraîne une démyélination qui affecte le système nerveux central. Cette pathologie est mieux connue sous le nom de maladie de Krabbe. L'ajout de Tat à GALC produit une internalisation efficace tout en maintenant la fonction enzymatique de GALC.<sup>202</sup>

La lipoamide déhydrogénase (LAD) est une enzyme mitochondriale dont la déficience peut causer de sévères troubles neurologiques. Rapoport et al.<sup>203</sup> ont démontré que Tat-LAD, qui contient également une séquence ciblant la mitochondrie, restaure l'activité LAD dans des fibroblastes issus de patients déficients en LDA.

## 2.2. Ischémie

La capacité des CPP, notamment Tat, à traverser la barrière hémato-encéphalique et à délivrer des protéines dans le cerveau a été mise à profit dans le cas de traitement après une ischémie cérébrale.

Bcl-xl est une protéine qui induit la suppression de l'apoptose dans beaucoup de type cellulaires. Bien souvent, l'ischémie est la conséquence d'une apoptose neuronale. L'injection ip de Tat-Bcl-xl diminue de 60 % le volume de l'infarctus cérébral et réduit l'activité caspase 3 neuronale.<sup>172</sup> Dans une autre étude, le couplage de Tat à NR2, un peptide dérivé du récepteur de la protéine PSD-95, séquestre intracellulairement PSD-95 ce qui inhibe alors la production d'oxyde nitrique et bloque ainsi l'apoptose. Une réduction du volume de l'infarctus cérébral est observée une heure après injection iv.<sup>204</sup>

D'autres études similaires ont montré l'implication de Tat dans la réduction d'ischémie cérébrale<sup>205</sup> ou cardiaque où le peptide Tat- $\delta$ V1 réduit efficacement le volume de l'ischémie.<sup>206,207</sup> Ces résultats confirment que Tat améliore la délivrance de protéines au niveau du cerveau et prouvent le potentiel de l'utilisation de Tat-protéine *in vivo*.

## 2.3. Asthme

L'asthme est une affection respiratoire chronique des bronches pouvant provoquer une insuffisance respiratoire importante (asthme aigu grave). Pour lutter contre cette inflammation, la protéine Pi3K (phosphoinositol 3 kinase) a été fusionnée à Tat et le complexe a inhibé *in vitro* la réponse inflammatoire en bloquant des cytokines.<sup>208</sup> Une autre stratégie a été de coupler Tat à un peptide inhibiteur du facteur de transcription STAT-6, ce qui atténue *in vivo* la réponse inflammatoire induit par l'ovalbumine ainsi que la production de mucus.<sup>209</sup> Ces résultats montrent encore une fois que l'association de molécules thérapeutiques à Tat induit une meilleure réponse de ces molécules obtenant ainsi un traitement plus efficace.

## 2.4. Infection virale

Les Molecular Beacons (MB) sont des oligonucléotides qui ciblent une région non codante du génome viral. Les MB possèdent une structure en semi-boucle où est greffé un fluorophore à une extrémité et un quencheur de fluorescence sur l'autre. Lors de l'infection virale d'une

cellule, le MB s'hybride au génome viral, change de conformation, entraînant une émission de fluorescence. La conjugaison de Tat au MB permet la translocation intracellulaire de façon non-invasive.<sup>210</sup> L'infection virale cellule par cellule et en temps réel est ainsi visualisée.

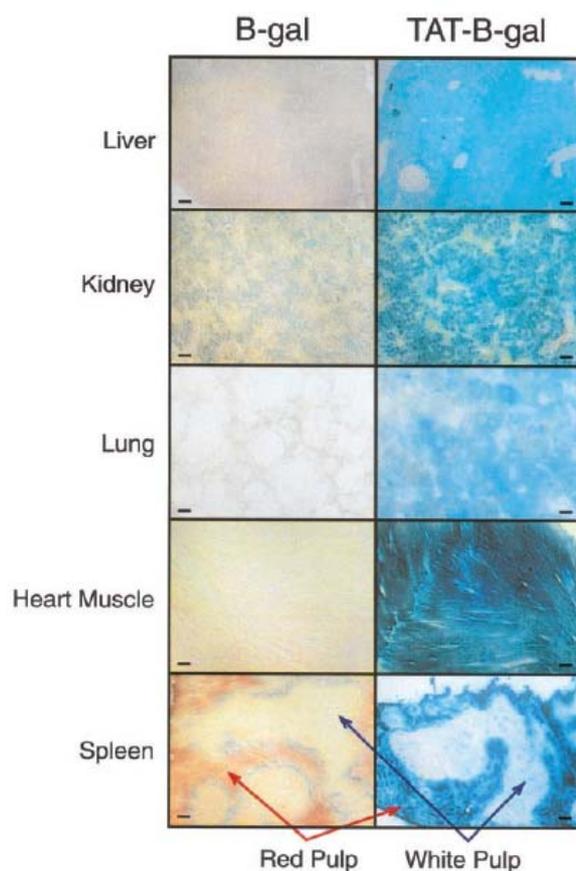
## 2.5. Vaccins

La stimulation des cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'un antigène est cruciale pour le contrôle de beaucoup d'infection et peut augmenter le succès de la vaccination contre des pathogènes intracellulaires.<sup>211</sup> Par exemple, Tp2, un antigène dirigé contre un parasite protozoaire, a été couplé à Tat obtenant ainsi une stimulation plus efficace des cellules T CD8<sup>+</sup> *in vivo*.<sup>212</sup> Le couplage de Tat à l'ovalbumine augmente l'internalisation du complexe dans des cellules dendritiques qui induisent alors une puissante réponse cellulaire T CD8<sup>+</sup>.<sup>213</sup> Tat a été également utilisé contre le virus de l'hépatite B. HBcAg est le seul antigène qui élicite une réponse immune prééminente dans le traitement de la maladie. La vaccination de souris avec Tat-HBcAg provoque une production d'anticorps IgM anti-HBC plus grande que celle obtenue suite à la vaccination avec HBcAg seul.<sup>214</sup> Toutes ces applications montrent donc, une fois encore, l'utilité de coupler Tat à ces agents afin d'obtenir une vaccination encore plus efficace.

## 3. Autres applications

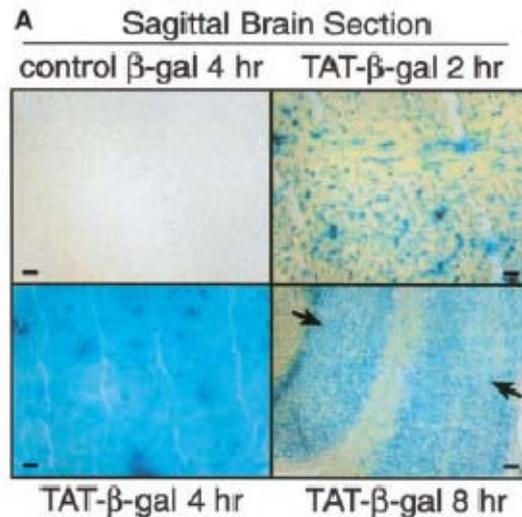
### 3.1. Protéines et Peptides

En 1999, Schwarze et al.<sup>28</sup> ont étudié l'internalisation d'une protéine de fusion composée du domaine PTD de Tat et de la  $\beta$ -galactosidase. La microscopie de fluorescence a montré que Tat- $\beta$ -gal-FITC est internalisé dans des cellules Jurkat alors que  $\beta$ -gal-FITC ne l'est pas, prouvant ainsi pour la première fois l'utilité du couplage à Tat pour internaliser une protéine *in vivo*. Quatre heures après une injection ip, et après isolation des tissus, une forte et uniforme activité  $\beta$ -gal a été observée dans le foie, les reins, les poumons, le muscle cardiaque et la rate avec Tat-  $\beta$ -gal alors qu'une faible activité  $\beta$ -gal, correspondant à une internalisation lymphatique, a été observée avec  $\beta$ -gal seule (figure 21).



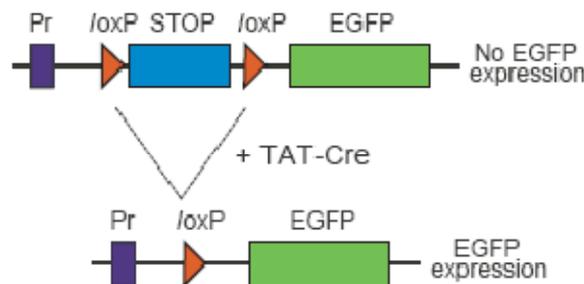
**Figure 21** : Transduction de  $\beta$ -gal et Tat-  $\beta$ -gal chez la souris. D'après Schwarze et al.<sup>28</sup>

Mais le point le plus remarquable est que l'activité  $\beta$ -gal est observée dans toutes les régions du cerveau après injection ip de Tat- $\beta$ -gal, fait non observé avec  $\beta$ -gal seule (figure 22). Ceci a été la première démonstration que le peptide Tat pouvait traverser la barrière hémato-encéphalique, sans la détériorer qui plus est. Depuis, à de nombreuses reprises, Tat a été utilisé avec succès dans la délivrance de divers composés au niveau de cerveau, comme par exemple dans les traitements d'ischémie cérébrale comme nous l'avons vu précédemment.



**Figure 22 :** Activité  $\beta$ -gal dans des sections de cerveau de souris. D'après Schwarze et al.<sup>28</sup>

Wadia et al.<sup>63</sup> ont utilisé un test basé sur l'expression d'EGFP induit par Tat-Cre pour étudier le mécanisme d'internalisation de Tat-Cre. L'expression d'EGFP par la cellule requière que Tat-Cre exogène pénètre la cellule et se localise dans le noyau afin d'exciser le segment transcriptionnel STOP (figure 23). Dans cette étude, les auteurs concluent que le mécanisme d'internalisation de Tat-Cre est la macropinocytose et l'action biologique nucléaire atteste alors de l'internalisation du complexe.



**Figure 23:** Système permettant l'expression d'EGFP induit par Tat-Cre.

D'après Wadia et al.<sup>63</sup>

Tat a également été couplé à la streptavidine, une protéine de 60 kDa, dans le but d'internaliser des cargos biotinylés. Tat améliore très fortement l'internalisation de la streptavidine mais la majorité du composé se trouve dans des compartiments vésiculaires.<sup>148</sup> Le couplage d'acide poly(propylacrylique) à Tat-SA augmente la quantité intranucléaire d'un facteur 2,5 confirmant qu'une majorité du peptide internalisé reste piégé dans les endosomes.

Tat internalise des protéines comme p27<sup>Kip1</sup>, impliquée dans la migration cellulaire ou encore CPP32, impliquée dans l'apoptose.<sup>121</sup> Le couplage de Tat à AKAPi inhibe de façon dose-dépendante l'interaction endogène PKA-AKAP (protéine kinase A-protéine qui ancre kinase A) dans des cellules pancréatiques.<sup>215</sup> Très récemment, le complexe Tat-ABG (avidine- $\beta$ -galactosidase) a montré une internalisation plus efficace *ex vivo* dans les tissus sains plutôt que dans les cellules tumorales (cellules de carcinome du cerveau).<sup>216</sup> Ce résultat est également observé avec le Transportan. De ce fait, les auteurs proposent l'utilisation de CPP comme agent de délivrance locale même si les facteurs causant cette spécificité d'internalisation doivent être élucidés.

### 3.2. Acides nucléiques

Tat, par l'intermédiaire de ses huit résidus basiques au sein de sa séquence, lie efficacement l'ADN.<sup>144,217</sup> En 2008, Lo et al.<sup>78</sup> ont étudié l'influence de l'ajout d'histidines à Tat pour la délivrance d'un plasmide codant pour le gène rapporteur de la luciférase. Sans histidines, l'efficacité de transfection de Tat est minimale. L'ajout de 5, 10 ou 20 histidines côté C-terminal augmente l'efficacité de transfection jusqu'à 7000 fois. Le meilleur résultat est obtenu avec Tat-10His. En effet, Tat-5His est moins efficace car le nombre d'histidine n'est pas assez important et Tat-20His est également inférieur à Tat-5His probablement à cause des répulsions électrostatiques entre les histidines qui conduisent à une condensation moins efficace avec l'ADN. Mais la meilleure augmentation de transfection est obtenue avec Cys-5His-Tat-5His-Cys, qui, *in vitro* et selon la lignée cellulaire, est 2 à 50 fois supérieur que Tat-10His, surpassant même le PEI 25kDa dans certaines lignées. Cette combinaison possède l'avantage de Tat pour la délivrance, de l'effet endosomolytique induit par les histidines (éponge à proton qui provoque la rupture de la membrane endosomale) et de ponts disulfures intra et intermoléculaires qui stabilisent le complexe peptide/ADN. La viabilité cellulaire en présence du complexe Tat est de 95 % alors qu'elle n'est que de 40 % avec le PEI.

Yang et al.<sup>156</sup> en 2009, ont utilisé des complexes contenant Tat pour la délivrance dans des cellules HeLa d'un plasmide codant pour le gène rapporteur luciférase. Les complexes sont composés de un, de deux ou des trois motifs suivants : Tat (pour la translocation cellulaire), NLS (séquence dérivée de la protéine SV40, par la localisation nucléaire) et d'un dendrimère (DEN), peptide ramifié de 7 lysines (pour la condensation avec l'ADN plasmidique). DEN et NLS ne montrent qu'une faible transfection alors que l'ajout de Tat permet une augmentation d'un facteur 7 ou 4, respectivement. La transfection est plus élevée en utilisant Tat et DEN-

NLS mais la meilleure efficacité est obtenue avec Tat-NLS-DEN (3 fois supérieures à DEN-NLS). Dans cette même étude, les auteurs montrent la capacité de la chloroquine à augmenter l'efficacité de transfection, suggérant ainsi un mécanisme d'internalisation dépendant de l'endocytose.

Des nanoparticules lipidiques solides (SLN) ont été utilisées pour transférer un ADN plasmidique codant pour la luciférase. *In vitro*, SLN est 37 fois inférieur au PEI,<sup>218</sup> mais l'ajout de Tat dimérique (Tat<sub>2</sub>, 2 peptides Tat reliés par un pont disulfure) à SLN a permis d'obtenir une transfection trois fois supérieure au PEI sur des cellules bronchoépithéliales humaines. Mais *in vivo*, Tat<sub>2</sub>-SLN est 80 à 100 fois moins efficace que le PEI. Ce résultat décevant est dû au mode d'administration des vecteurs. Tat<sub>2</sub>-SLN est en effet dégradé pendant la nébulisation produisant une fragmentation de l'ADN.

## V Augmentation de l'internalisation

Comme nous venons de le voir, les CPP sont des vecteurs efficaces pour promouvoir l'internalisation de différents cargos induisant une augmentation de son effet biologique. Cependant, il a été montré que seul un faible pourcentage de la quantité appliquée était réellement internalisé.<sup>88</sup> Partant de ce constat, de nombreux groupes de recherches se sont attachés à augmenter l'efficacité d'internalisation. Plusieurs stratégies ont alors été appliquées comme l'utilisation d'un pulse électrique induisant une internalisation de Tat 100 fois supérieure,<sup>219</sup> ou encore l'utilisation de dendrimère à base de Tat (Tat est ramifié sur un polyacrylamide) qui améliore la transfection d'ADN.<sup>220</sup> Toutefois, ces stratégies n'ont été que très peu utilisées car elles sont difficilement applicables *in vivo* ou trop complexes pour être développées. Maiolo et al.<sup>85</sup> ont montré que l'ajout d'un seul résidu tryptophane (de nature hydrophobe) côté C-terminal à un heptamère d'arginine augmente l'internalisation d'un facteur deux à trois selon la lignée cellulaire. Ainsi, plusieurs stratégies basées sur l'hydrophobisation du CPP ont été développées afin d'obtenir une internalisation plus élevée.

### 1. Pré-incubation des cellules avec une molécule hydrophobe

Dans certains cas, des polyarginines peuvent acquérir une lipophilicité transitoire grâce à la formation d'une paire d'ions entre les groupements guanidinium et des anions hydrophobes présents dans le milieu.<sup>221</sup> Cet effet est la conséquence d'une minimisation des répulsions électrostatiques intramoléculaires causées par les charges cationiques du polymère.

#### 1.1. Pyrènebutyrate

Le pyrènebutyrate (PB), groupement hydrophobe possédant une fonction carboxylate, forme une paire d'ions avec les groupements guanidinium des chaînes latérales des arginines grâce à des interactions électrostatiques. Ceci a pour conséquence l'augmentation de l'hydrophobicité du peptide et les études suivantes ont mis en évidence une internalisation plus efficace du complexe CPP-PB. Cependant, le PB est pré-incubé sur les cellules et non co-incubé avec les CPP sur les cellules. Il est probable que le PB s'insère dans la membrane plasmique des cellules puis interagit avec les CPP pour augmenter l'internalisation sans diminuer la viabilité cellulaire.

Ainsi, Takeuchi et al.<sup>222</sup> ont déterminé que la pré-incubation de cellules HeLa avec le PB à 50µM améliore l'internalisation de R<sub>8</sub>-PAD, un octaarginine couplé à peptide pro-apoptotique, induisant une baisse de la viabilité cellulaire de 50 % à 20 %.

En 2009, une étude plus complète a été réalisée par Guterstam et al.<sup>223</sup>. La pré-incubation des cellules HeLa au PB (5 min, 50 µM) augmente l'internalisation de FITC-Tat et de FITC-R<sub>9</sub> d'un facteur 2,5 et 4, respectivement. L'effet du PB est plus faible avec Pen (50 % d'augmentation). Avec TP10, le PB n'a aucun effet car le peptide ne possède aucune arginine dans sa séquence peptidique, rendant la complexation ionique impossible. Enfin, les auteurs ont couplé de façon non covalente les CPP avec un oligonucléotide qui, lorsqu'il est internalisé, permet l'obtention d'une luciférase fonctionnelle (cf test de Kole, chapitre II). La pré-incubation des cellules au PB (1 min, 50 µM) améliore l'activité luciférase induite par R<sub>9</sub>-ON d'un facteur cinq. Mais cet effet est bien plus faible pour Tat et Pen où l'augmentation est de 20 à 50 %. Le remplacement des lysines par des arginines dans la séquence de la pentratine (Pen-Arg) augmente l'activité luciférase d'un facteur deux, montrant ainsi l'importance des arginines dans cette stratégie. Il est à noter que pour chaque étude, l'internalisation de l'homopolymère R<sub>9</sub> est la plus fortement améliorée.

Cette méthode est donc applicable pour les CPP hydrophiles possédant des arginines dans leur séquence. Par contre, l'utilisation de PB n'améliore pas l'efficacité d'internalisation de CPP hydrophobes comme TP10.

## *1.2. Diméthylsulfoxyde*

Le DMSO est souvent utilisé en biologie comme agent cryoprotecteur lors de la congélation de cellules. Plusieurs groupes de recherches ont également montré que le DMSO augmentait la transfection d'ADN, les auteurs suggérant une perméabilité supérieure de la membrane plasmique en présence de DMSO.<sup>224,225</sup>

En 2009, Wang et al.<sup>226</sup> ont étudié l'influence de cette molécule sur l'internalisation de Tat. Un prétraitement des cellules avec 10 % de DMSO pendant une heure améliore l'internalisation de Tat 2 à 3 fois plus comparée à celle induite par la chloroquine. Le même résultat est obtenu avec Tat-GFP, ainsi que Tat-apoptine. L'incubation des cellules avec du DMSO ne provoque pas la formation de pores et donc n'augmente pas la cytotoxicité. Le DMSO est une bonne alternative à la chloroquine car la molécule possède la même capacité à améliorer l'efficacité de l'internalisation sans les effets cytotoxiques associés à la chloroquine.

### 1.3. Anthocyanines

Les anthocyanines sont des pigments de plantes qui possèdent plusieurs fonctions cellulaires comme des effets anti-inflammatoires et anti-oxydants. Les anthocyanines possèdent comme structure de base un domaine hydrophobe couplé à un résidu osidique, principalement le glucose.

En 2010, Lee et al.<sup>227</sup> ont pré-incubé des cellules HeLa avec des anthocyanines (préalablement solubilisées dans du DMSO). L'internalisation de Tat-SOD et l'activité enzymatique du cargo sont trois à quatre fois supérieures quand les cellules sont pré-incubées avec les anthocyanines. Les mêmes résultats sont obtenus avec Tat-GFP. Les auteurs pensent ainsi que les anthocyanines permettent d'augmenter la délivrance de CPP-protéine. Toutefois, Wang et al.<sup>226</sup> ont montré un effet bénéfique du DMSO dans l'internalisation de Tat-GFP entre autres, et il n'est pas exclu que le DMSO soit aussi en partie responsable de l'augmentation observée dans cette étude. Les auteurs auraient pu le vérifier en mesurant l'internalisation de Tat-SOD et/ou Tat-GFP en pré-incubant les cellules avec le DMSO mais sans les anthocyanines.

## 2. Modification du CPP

La pré-incubation des cellules avec une molécule hydrophobe montre des limites importantes principalement par le fait que cette stratégie est difficilement utilisable *in vivo*. Une voie beaucoup plus représentative est la modification directe du CPP. De courtes séquences peptidiques ou des entités chimiques différentes peuvent être ajoutées au CPP, modifiant ainsi la structure primaire du peptide.

### 2.1. Séquence Pas

Cath-D (GKPILFF) est un peptide dérivé lysosomale cathepsin D et son couplage à un octaarginine augmente l'internalisation d'un facteur cinq.<sup>228</sup> La séquence rétro de cath-D (FFLIPKG) améliore 18 fois l'internalisation de R<sub>8</sub>. Cette séquence est nommée Pas, pour Penetration Accelerating Sequences.

En 2009, Takayama et al.<sup>229</sup> ont alors déterminé que l'ajout de la séquence Pas à R<sub>8</sub> et Tat augmente l'efficacité, la vitesse d'internalisation ainsi que la sortie endosomale. A 4°C,

l'internalisation est 14 fois plus faible qu'à 37°C pour Pas-R<sub>8</sub> mais est équivalente à celle obtenue pour R<sub>8</sub> à 37°C, montrant ainsi l'effet bénéfique du couplage de Pas.

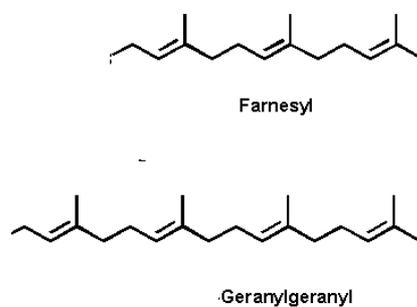
L'effet de Pas est en partie dû à son hydrophobicité en potentialisant l'interaction du peptide avec la membrane des endosomes et facilitant son relargage dans le cytosol. Toutefois, cath-D-R<sub>8</sub>, pourtant tout aussi hydrophobe que Pas-R<sub>8</sub>, est trois fois moins internalisé. On peut alors supposer que la position des résidus hydrophobes dans la séquence est un facteur important pour l'efficacité d'internalisation.

## 2.2. LK15

L'efficacité de transfection de complexes Tat-ADN est entre 10 et 50 fois plus élevée lorsque le peptide amphipathique LK15 est couplé à Tat. Les niveaux atteints sont proches de ceux obtenus avec la lipofectamine ou le PEI.<sup>160</sup> L'ajout de chloroquine améliore encore de 50 % la transfection de Tat-LK15, ce qui signifie que le vecteur reste une fois de plus en partie piégé dans les endosomes.

## 2.3. Prénylation

La prénylation est une modification post-traductionnelle résultant de l'addition d'un groupement farnésyle (15 carbones) ou géranylgeranyl (20 carbones). Les peptides prénylés possèdent des propriétés d'internalisation cellulaire.<sup>230,231</sup> Ainsi, Ochoki et al.<sup>232</sup> ont montré que l'ajout d'un groupement géranylgeranyl à un peptide augmente son internalisation quatre fois plus efficacement qu'un groupement farnésyle, probablement grâce à une hydrophobicité accrue car le groupement géranylgeranyl compte cinq carbones de plus (figure 24).

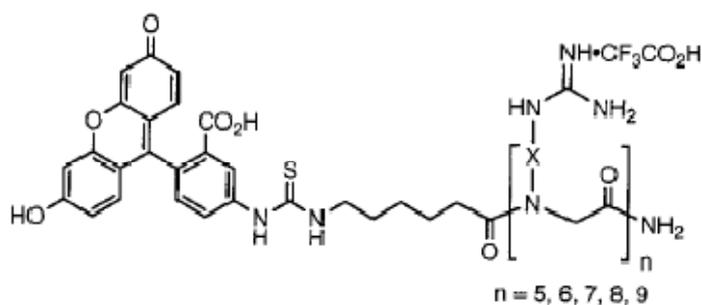


**Figure 24** : Représentation des groupements farnésyl et géranylgeranyl.

Toutefois, le groupement décyle (10 carbones, linéaire) est le plus efficace pour améliorer l'internalisation. Les auteurs attribuent ceci au fait que les interactions entre les lipides saturés de la membrane plasmique et une chaîne alkyle linéaire sont plus favorables qu'avec une chaîne isoprénoïde qui est ramifiée et insaturée. Ceci montre la capacité de longues chaînes alkyles linéaires à potentialiser l'internalisation de peptides.

#### 2.4. Modification de la chaîne principale du peptide

Un groupe pionnier dans l'hydrophobisation de polymère d'arginine est celui de Wender et Rothbard<sup>26</sup> qui ont synthétisé différents peptoïdes ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes (figure 25).



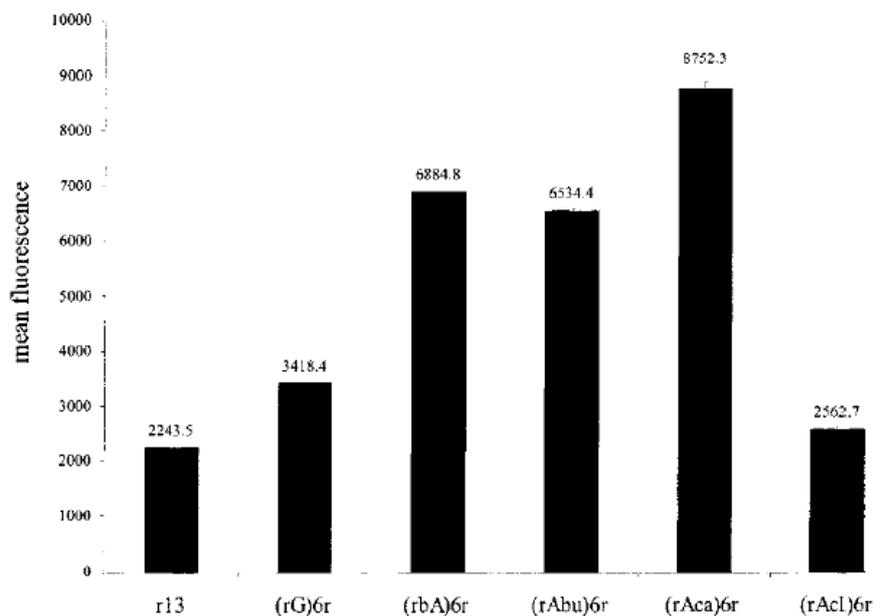
**Figure 25** : Peptoïdes conçus par Wender et al.<sup>26</sup>

Dans cette étude, le nombre de groupements méthylène (X) présent sur la chaîne latérale du dérivé arginine est variable, de deux à huit CH<sub>2</sub>. Le nombre de monomère (n) varie de cinq à neuf, donnant des peptoïdes de longueur variable.

Les peptoïdes de longueurs différentes mais composés de trois méthylènes ont été comparés aux polymères d'arginines « classiques ». L'internalisation croît avec la longueur du peptoïde mais reste toutefois moins efficace que celle obtenue avec les peptides standards. Puis les auteurs ont comparé des peptoïdes de longueur fixe (n = 9) mais ont fait varier la longueur des chaînes latérales du dérivé d'arginine. Plus le nombre de méthylène augmente, plus l'internalisation est efficace, avec un optimum pour 6 méthylènes. Le composé à 8 méthylènes n'a pas pu être évalué en raison d'une trop mauvaise solubilité. Tous les peptoïdes possédant 6 méthylènes sont d'ailleurs plus efficacement internalisés que leur homologue polyarginine en série d de même longueur.

Rothbard et al.<sup>233</sup> ont conçu de nouveaux polymères d'analogues d'arginines contenant un nombre variable de méthylène entre les fonctions acide et amine. Plus le nombre de

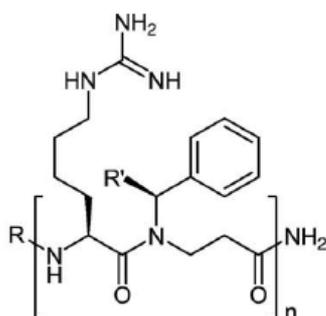
méthylène est élevé, plus l'internalisation est efficace sauf quand il y a sept méthylènes (figure 26). Ces résultats démontrent l'intérêt d'introduire un groupement hydrophobe au cœur même du CPP pour améliorer l'internalisation de peptides hydrophiles.



**Figure 26:** Espacement entre arginine en fonction de l'internalisation. G : 1 CH<sub>2</sub> ; bA : 2 CH<sub>2</sub> ; Abu : 3 CH<sub>2</sub> ; Aca : 5 CH<sub>2</sub> ; Acl : 7 CH<sub>2</sub>, r = résidu arginine en série d.  
D'après Rothbard et al.<sup>233</sup>

Suivant le même principe, le groupe de Lebleu a mis en évidence l'effet bénéfique de l'introduction d'un groupement hydrophobe (Ahx) à un octamère d'arginines dans la délivrance d'un PMO (analogue d'oligonucléotide) dans des modèles de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). L'efficacité du peptide chimérique est alors supérieure à celle du polyarginine parent et de Tat.<sup>234,235</sup> Sur plusieurs peptides testés (nombre de méthylène variant ainsi que le nombre de monomère), (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-PMO possède toujours la meilleure activité biologique comparé aux autres composés. Abes et al.<sup>58</sup> en étudiant divers paramètres tels que l'hydrophobicité, la stéréochimie ou encore l'influence du nombre de monomère, ont mis en évidence que cette efficacité était due à une meilleure sortie endosomale, induit très certainement là aussi par les groupements hydrophobes introduits au sein de la séquence peptidique.

En 2008, Foged et al.<sup>236</sup> ont synthétisé un polymère d'arginine-β-alanine N-alkylé (figure 27).



**Figure 27** : Modification de polyarginine. R = carboxyfluorescéine, R' = H ou Me, n = 6.

D'après Foged et al.<sup>236</sup>

Ainsi, le composé chimérique est quatre et cinq fois plus internalisé dans les cellules que R<sub>8</sub> et Tat, respectivement. L'efficacité d'internalisation est sensiblement la même quand R' = H ou Me.

D'un point de vue structural, le composé chimérique est notablement plus hydrophobe que les deux peptides R<sub>8</sub> et Tat de par la présence d'une β-alanine ainsi que d'un groupement benzyle ou éthylphényle, ce qui confirme le bénéfice de centres hydrophobes sur l'amélioration de l'internalisation. Mais les auteurs n'ont cependant pas comparé la stabilité enzymatique des trois peptides. L'effet bénéfique pourrait être le résultat partiel d'une plus grande résistance à la dégradation enzymatique due à la N-alkylation.

En 2010, Katayama et al.<sup>237</sup> ont montré que l'ajout d'un groupement hexanoyle à un octamère d'arginine conduit à une internalisation 13 fois supérieure. L'ajout du groupement hydrophobe à R<sub>8</sub>-PAD a diminué la viabilité de 65 % à moins de 20 %, pour des cellules de glioblastome.

Il a donc été clairement démontré que l'ajout d'une petite molécule hydrophobe à des CPP hydrophiles permet d'en augmenter l'internalisation et par conséquent l'activité biologique du cargo associé. Mais la plus grande majorité des travaux se base sur l'utilisation d'acide gras ayant un caractère encore plus hydrophobe.

### 3. Fonctionnalisation avec des acides gras

Dans de très nombreuses études dont certaines seront détaillées dans le paragraphe qui suit, il a été démontré que l'ajout d'un acide gras à un CPP améliore très sensiblement l'internalisation grâce à une plus grande lipophilicité du complexe acide gras/CPP. En effet,

les lipopeptides possèdent une affinité pour la bicouche lipidique supérieure à celle du peptide parent et sont capables de s'insérer dans la membrane cellulaire plus efficacement grâce au groupement lipophile.<sup>238</sup>

Les acides gras sont composés de longues chaînes hydrocarbonées. En fonction du nombre de groupement méthylène ( $\text{CH}_2$ ), l'acide gras porte un nom spécifique. Voici les abréviations utilisées :

C10 : Acide caprique ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_8\text{-CO}_2\text{H}$ ) ou C10:0

C12 : Acide laurique ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_{10}\text{-CO}_2\text{H}$ ) ou C12:0

C14 : Acide myristique ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_{12}\text{-CO}_2\text{H}$ ) ou C14:0

C16 : Acide palmitique ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_{14}\text{-CO}_2\text{H}$ ) ou C16:0

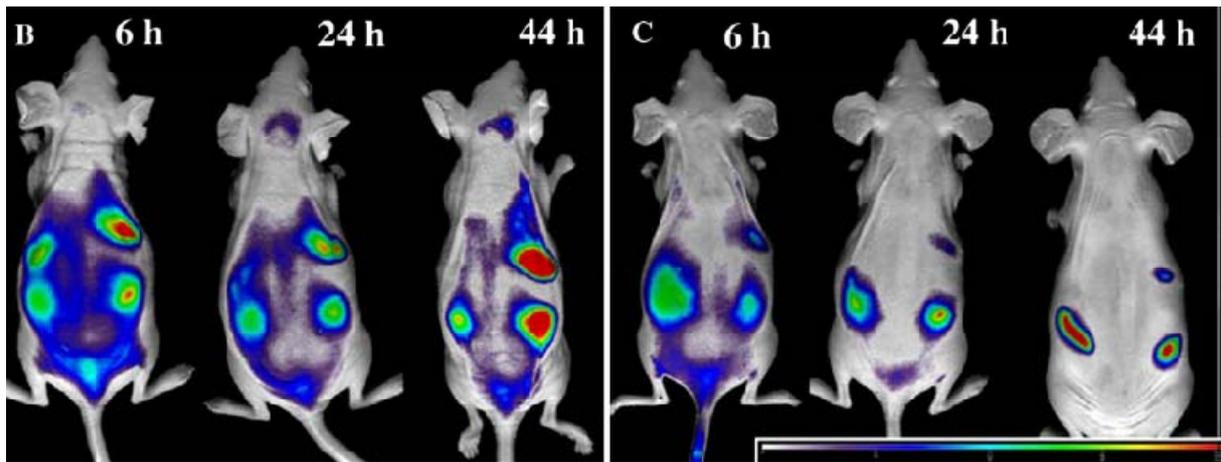
C18 : Acide stéarique ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_{16}\text{-CO}_2\text{H}$ ) ou C18:0

Le terme C10:0 signifie que la molécule comporte 10 atomes de carbones (et non 10 méthylènes) ainsi qu'aucune double liaison  $\text{C}=\text{C}$  (acide gras saturé).

### 3.1. Myristoylation

Pham et al.<sup>239</sup> ont couplé six acides gras différents à un heptamère d'arginine et mesuré l'impact de ces modifications sur l'internalisation dans des cellules HeLa. L'ajout d'un groupement hexanoyle (6 carbones), octanoyle (8 carbones) et décanoyle (10 carbones) n'a que peu d'effet sur l'internalisation. La lauroylation (12 carbones) l'améliore d'un facteur 4, la palmitoylation (16 carbones) d'un facteur 5 et la myristoylation (14 carbones) d'un facteur 7. Des études par microscopie confocale ont montré une localisation cytoplasmique de  $\text{C}_{14}\text{-R}_7$  alors que  $\text{C}_{16}\text{-R}_7$  apparaît être principalement localisé au niveau de la membrane cellulaire, ce qui indique une rétention du peptide difficilement explicable car la palmitoylation augmente la quantité de peptide internalisé d'un facteur 5 et le CPP possédant seulement deux méthylènes en moins (sur 16) est localisé principalement dans le cytoplasme.

Le même groupe<sup>240</sup> a alors utilisé un MPAP (polyarginine myristoylé). MPAP-Cy5.5 s'accumule dans le cerveau six heures après injection iv. et continue jusqu'à 44 heures (figure 28B). Toutefois, il y'a une distribution dans les tissus périphériques (reins et rate). La sonde suit le même profil mais sans accumulation dans le cerveau (figure 28C).



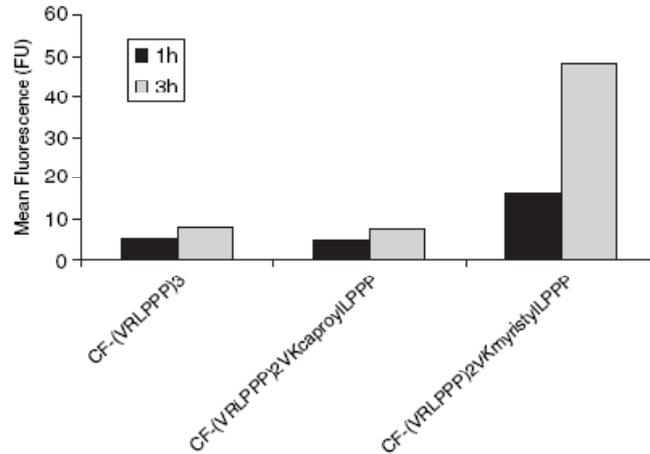
**Figure 28** : Imagerie *in vivo* des deux composés, MPAP-Cy5.5 (B) et Cy5.5 (C).

D'après Pham et al.<sup>240</sup>

24 heures après l'injection iv, le liquide contenu dans le cerveau a été analysé par HPLC et il apparaît que MPAP-Cy5.5 n'est pas dégradé. L'analyse par immunohistochimie a mis en évidence une localisation du composé dans toutes les régions du cerveau, incluant le cortex, l'hippocampe et le thalamus, montrant apparemment là aussi la capacité de MPAP à traverser la BHE.

Enfin, en 2010, Ifediba et al.<sup>241</sup> ont utilisé le MPAP pour la délivrance d'ARNsi pour lutter contre l'ischémie cérébrale. c-Src est une protéine kinase associée à des dommages tissulaires dans des modèles d'ischémie cérébrale. Le couplage non covalent d'un ARNsi dirigé contre c-Src au MPAP diminue l'expression de c-Src de 30 % sur des neurones et des astrocytes *in vitro*.

De façon plus originale, Fernandez-Carneado et al.<sup>242</sup> ont étudié l'influence de deux acides gras incorporés au sein de la séquence d'un peptide riche en proline sur son internalisation (figure 29).



**Figure 29 :** Internalisation de peptides riches en Pro. D'après Fernandez-Carneado et al.<sup>242</sup>

Le groupement myristoylé composé de 14 carbones augmente l'internalisation du peptide alors que le groupement caproylé composé de dix carbones est inefficace, ce qui confirme encore une fois le bénéfice d'une hydrophobisation accrue.

Enfin, Aussedat et al.<sup>243</sup> ont réalisé une étude très complète sur l'internalisation de molécules ayant pour structure de base la bis-ornithine. Les différentes molécules possèdent une structure linéaire ou en dendrimère, comporte un ou plusieurs cargos (PKCi ; peptide inhibiteur de la protéine kinase C) ainsi qu'un ou trois groupements myristoylés. De cette étude, seule la partie concernant la myristoylation sera détaillée.

Tout d'abord, la myristoylation d'un peptide chimérique linéaire possédant 8 groupements guanidinium améliore la quantité de PKCi intracellulaire d'un facteur 7,5. La fluorescence intracellulaire du peptide non myristoylé est ponctuelle confirmant une rétention endosomale importante alors que le peptide myristoylé est principalement retrouvé dans le cytosol. Un second peptide chimérique possédant une structure en dendrimère possédant 9 guanidinium a été myristoylé en trois positions distinctes. La quantité intracellulaire de PKCi est alors 6 fois supérieure. La microscopie de fluorescence montre également que le peptide hydrophobisé est principalement localisé au niveau membranaire, alors que le peptide sans myristoylé est encore une fois retenu en majorité dans les endosomes. Toutefois, nous déjà souligné l'importance des groupements guanidinium dans l'internalisation de CPP. Or, les myristoylations sont réalisées au niveau de la chaîne latérale de la bis-ornithine, au détriment de la guanidilation. Par conséquent, le peptide « tri-myristoylé » possède trois groupements guanidinium de moins. Il aurait ainsi été très intéressant de comparer l'internalisation d'un peptide tri-myristoylé portant un nombre de fonction guanidinium équivalent au peptide natif.

La myristoylation de CPP a été réalisée dans d'autres applications, impliquant notamment Tat. Sturzu et al.<sup>199</sup> ont couplé le peptide Tat à un complexe FITC-Gd-DOTA composé d'une sonde fluorescente et d'un agent de contraste extracellulaire utilisé en IRM. Ce complexe n'est effectivement pas internalisé et l'ajout de Tat étonnamment n'améliore que très peu l'internalisation. La simple myristoylation en position N-terminal de Tat conduit à une internalisation 30 fois plus efficace. Nelson et al.<sup>244</sup> ont démontré que le peptide Tat permettait la traversée membranaire d'un peptide inhibiteur de tyrosine kinase ABL dans des cellules de carcinome humain mais pas dans des lymphocytes B. Partant de ce constat, les auteurs ont étudié l'influence de la myristoylation d'ABL directement. Cette modification augmente la quantité intracellulaire d'ABL d'un facteur 12 dans les lymphocytes B et 5 dans le carcinome. De façon surprenante, l'ajout du groupement hydrophobe sur la séquence peptidique de Tat n'a pas été évalué. Encore plus troublant, l'efficacité d'internalisation d'ABL-Myr est supérieure celle d'ABL-Tat, ce qui signifie que l'effet induit par l'acide gras sur l'internalisation est supérieur à celui apporté par le peptide internalisant Tat.

### 3.2. Palmitoylation

En 2007, Incani et al.<sup>245</sup> ont couplé cinq groupements palmitoyles à du PEI ainsi que seize à du PLL. La transfection d'ADN plasmidique codant pour l'EGFP dans des cellules BMSC est supérieure de 75 % quand Palm-PEI est remplacé par Palm-PLL. L'ajout de palmitoyle à PEI n'améliore pas l'efficacité de transfection. La même année, ce groupe a montré que la palmitoylation du PLL augmentait l'internalisation d'un facteur deux sur des cellules de fibroblastes humains.<sup>246</sup> Puis en 2008, ce groupe a étudié l'influence de plusieurs acides gras sur la transfection de PLL/pEGFP.<sup>247</sup> Ainsi, les auteurs démontrent que la palmitoylation et la myristoylation du PLL restent des stratégies efficaces pour la transfection.<sup>247</sup>

En 2008, Yuan et al.<sup>248</sup> ont utilisé la palmitoylation pour potentialiser la délivrance d'interféron  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), un agent antiviral utilisé contre le virus de l'hépatite. L'interféron possède une demi-vie courte et manque de sélectivité envers le foie. Les auteurs ont alors couplé de façon réversible l'IFN- $\alpha$  à une cystéine palmitoylée par formation d'un pont disulfure. L'internalisation *in vitro* de l'IFN palmitoylé est neuf fois plus élevée dans des cellules hépatocytiques. Cette stratégie augmente *in vivo* la demi-vie d'un facteur cinq. Une

heure après injection iv à des souris, la radioactivité associée au foie est quatre fois supérieure pour le composé palmitoylé.

Enfin, une autre application de l'acide palmitique est son ajout à des quantum dots (QD). Delehanty et al.<sup>249</sup> ont utilisé différents agents pour obtenir une sortie endosomale plus élevée de QD qui restent piégés dans les endosomes pendant plusieurs jours. L'influx<sup>TM</sup>, la lipofectamine et le PEI n'améliorent pas la délivrance cytoplasmique des QD. Seul le PULSin<sup>TM</sup>, un polymère amphiphile conçu comme agent de délivrance cytosolique de protéine, induit une sortie endosomale du QD entre trois et quatre jours après l'incubation sur les cellules. L'ajout d'un peptide amphiphile contenant un groupement palmitoylé aux QD a permis une sortie endosomale plus efficace et plus rapide.

### 3.3. Stéarylation

En 2007, Khalil et al.<sup>250</sup> ont introduit un groupement stéaryle en N-terminal d'un octamère d'arginine. Dans des cellules NIH/3T3, le simple ajout du groupement stéaryle a augmenté l'efficacité de transfection d'un ADNp d'un facteur 1000.

Tönges et al.<sup>251</sup> ont montré que la transfection d'un ARNsi dans des neurones de rats par la lipofectamine ou par un octamère d'arginine stéarylé côté N-terminal est toute aussi efficace. Ce résultat a été confirmé ultérieurement par Mae et al. en utilisant un système comparable.<sup>252</sup> La stéarylation de TP10 augmente d'un facteur 30 l'activité luciférase. Dans cette même étude, les auteurs ont déterminé que la quantité intracellulaire de R<sub>9</sub> est deux fois plus élevée suite à la stéarylation mais de façon plus surprenante, elle est plus faible lors de l'utilisation du peptide Antp.

Enfin, Lehto et al.<sup>253</sup> ont montré que la stéarylation de (R-Ahx-R)<sub>4</sub>-oligonucléotide induisait une activité luciférase 20 fois supérieure. Un faible effet de la stéarylation est cependant observé avec R<sub>9</sub>-ON. Par contre, une co-incubation des CPP-ON avec la chloroquine a permis d'obtenir une expression de la luciférase plus forte avec stéa-R<sub>9</sub> qu'avec stéa-(R-Ahx-R)<sub>4</sub>, indiquant que stéa-R<sub>9</sub>-ON est principalement piégé dans des endosomes et en quantité supérieure par rapport à stéa-(R-Ahx-R)<sub>4</sub>-ON.

### 3.4. Comparaison entre acide gras

Plusieurs groupes de recherche ont mesuré l'effet d'acides gras différents sur l'internalisation d'une molécule commune. Ainsi, Niidome et al.<sup>254</sup> ont couplé plusieurs acides gras (lauryle, myristoyle, palmitoyle ou cholestéryle) au mastoparan et ont utilisé ces CPP hydrophobisés pour transférer efficacement un ADNp codant pour la luciférase. L'ajout de chloroquine augmente encore l'efficacité et la transfection atteint alors le niveau de celle obtenue avec la lipofectamine.

Futaki et al.<sup>255</sup> ont étudié l'influence de deux acides gras et de deux groupements stéroïdiques dans l'efficacité de transfection par divers CPP d'un ADNp codant pour la luciférase. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 16.

Groupement hydrophobe	Activité luciférase selon le CPP			
	R <sub>8</sub>	Rev	Tat	FHV
Aucun	1	1	1	1
Stéaryle (C18, linéaire)	90	7	200	125
Lauryle (C12, linéaire)	70	/	/	/
Cholestéryle (C27, cyclique)	20	/	/	/
Cholyle (C24, cyclique)	10	/	/	/

**Tableau 16 :** Augmentation de la transfection selon le CPP et le groupement hydrophobe.

L'amélioration de la transfection de R<sub>8</sub> par le groupement hydrophobe dépend de sa nature. Les groupements à structure linéaire semblent plus efficaces que ceux possédant une structure cyclique de type stéroïde. Le même groupement induit des améliorations variables selon le CPP utilisé. L'ajout d'un stéaryle sur Tat augmente d'un facteur 200 la transfection mais seulement d'un facteur 7 pour le peptide Rev. Il aurait été toutefois intéressant que les auteurs évaluent l'effet des trois autres groupements hydrophobes afin d'apporter une conclusion plus pertinente à cette étude.

En 2008, Prata et al.<sup>256</sup> ont étudié divers peptides lipophiles pour la transfection du gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Le peptide utilisé est KWK, un peptide non internalisant. Deux acides gras sont préalablement couplés sur deux des trois fonctions hydroxyles du glycérol. Puis la troisième fonction hydroxyle est alors couplée à la fonction acide C-terminale du peptide, ce qui permet la formation de liposomes en solution aqueuse.

Les efficacités de transfection dans des cellules CHO des peptides KWK-C<sub>14</sub> et KWK-C<sub>16</sub> sont supérieures à celles obtenues avec KWK-C<sub>18</sub> et KWK-C<sub>12</sub>. Les résultats sont les mêmes avec des cellules NIH/3T3, dépassant même l'efficacité obtenue avec la lipofectamine 2000 en ce qui concerne KWK-C<sub>16</sub>. Pour cette étude, il apparaît donc que le myristoyle et palmitoyle soient les groupements optimaux pour la transfection d'ADN.

Il a donc été maintes fois établi que l'ajout d'acide gras améliore plus ou moins l'effet biologique de la molécule associée dans des applications variées. Le tableau 17 récapitule les principaux résultats concernant l'utilisation des acides gras.

Auteurs	Molécules	Acide gras	Site couplage	Effet induit par l'acide gras
Nelson <sup>244</sup>	ABL	Ac myristoïque	C-terminal	Augmentation de l'internalisation d'un facteur 12
Pham <sup>240</sup>	Arg <sub>8</sub>	Ac myristoïque	N-terminal	Traversée in vivo de la BHE
Fernandez-Carneado <sup>242</sup>	Peptide riche en Pro	Ac myristoïque	Au sein de la séquence	Augmentation de l'internalisation d'un facteur 3
Prata <sup>256</sup>	KWK	Ac myristoïque et ac palmiltique	C-terminal	Formation liposomes permettant transfection d'ADN
Abbasi <sup>247</sup>	PLL	Ac myristoïque et ac palmiltique	Ramification	Transfection d'ADN augmentée d'un facteur 3
Khalil <sup>250</sup>	Arg <sub>8</sub>	Ac stéarique	N-terminal	Transfection d'ADN augmentée d'un facteur 1000
Mäe <sup>252</sup>	TP10	Ac stéarique	N-terminal	Activité biologique de l'oligonucléotide 30 fois supérieure
Futaki <sup>255</sup>	Arg <sub>8</sub> et Tat	Ac stéarique	N-terminal	Internalisation 200 fois supérieure pour Tat, 90 fois pour Arg <sub>8</sub>
Tönges <sup>251</sup>	Arg <sub>8</sub>	Ac stéarique	N-terminal	Transfection ARNsi équivalent à la lipofectamine

**Tableau 17** : Récapitulatif des principaux résultats obtenus avec les acides gras. Ac : acide.

Il apparaît que l'acide gras qui induit la meilleure amélioration de l'internalisation soit l'acide stéarique. Un premier constat peut d'ores et déjà être établi : quel que soit l'acide gras couplé,

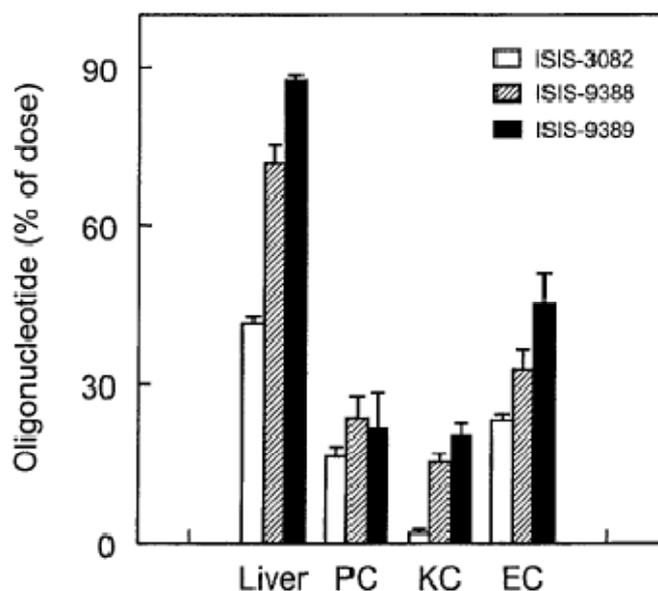
son ajout potentialise l'internalisation du CPP ou l'effet biologique du cargo. Les études observant l'inverse sont très peu nombreuses.<sup>252</sup> Un second constat est que l'incorporation de l'acide gras se fait dans la plupart des études sur l'extrémité N-terminal du peptide, et de façon moindre sur l'extrémité C-terminal. L'incorporation d'acide gras en position centrale (sur la chaîne latérale de la lysine par exemple) n'a été étudiée que par le groupe de Fernandez-Carneado et des investigations supplémentaires mériteraient d'être menées.

#### **4. Le cholestérol**

Le cholestérol est un lipide de la famille des stérols composé d'une base structurale qui contient quatre cycles. C'est un composé majeur des membranes cellulaires qui contribue à leur maintien en s'intercalant entre les phospholipides. Ce composé a également été utilisé pour accroître le caractère lipophile de diverses molécules afin d'améliorer leur internalisation cellulaire.

##### *4.1. Délivrance d'ODN et de PNA*

Bijsterbosch et al.<sup>257</sup> ont couplé une molécule de cholestérol à un oligodéoxynucléotide (ODN) phosphorothioate spécifique de l'adhésion intercellulaire murine via une uridine modifiée chimiquement présente en 3'. L'ajout de cholestérol à l'ODN a permis la formation de particules avec de la LDL (lipoprotéine de faible densité) lactosylée, un transporteur utilisé pour l'internalisation dans les cellules hépatiques. L'accumulation dans le foie de l'ODN-Chol/LDL est 50 % supérieure à celle obtenue pour l'ODN/LDL une heure après l'injection iv à des rats. Le même groupe en 2002<sup>258</sup> a étudié cette fois-ci l'influence de deux cholestérols présents à chaque extrémité sur l'internalisation de l'ODN. Les auteurs montrent une localisation préférentielle des ODN dans le foie une heure après injection iv à des rats. L'accumulation de l'ODN-bis chol (histogramme noir) est supérieure à celle de l'ODN-monochol (histogramme hachuré) qui est elle-même supérieure à l'ODN natif (histogramme blanc) (figure 30).



**Figure 30 :** Accumulation des différentes ODN dans les cellules du foie.

ISIS-9389 : ODN-bis chol ; ISIS-9388 : ODN-mono chol ; ISIS-3082 : ODN natif.

PC : cellules parenchymales ; KC : cellules de Kuppfer ; EC : cellules endothéliales.

D'après Bijsterbosch et al.<sup>258</sup>

Les trois ODN n'ont cette fois-ci pas été incubés avec la LDL lactosylée, ce qui se traduit par une perte de la localisation préférentielle dans les cellules de Kuppfer (KC).

Cette sélectivité *in vivo* a également été observée par Wolfrum et al.<sup>259</sup> lors de l'étude d'un ARNsi-cholestérylé. Les auteurs démontrent que le complexe cholestérylé s'associe *in vivo* aux HDL (lipoprotéine de haute densité) qui possèdent une forte affinité envers le récepteur SR-B1, principalement localisé au niveau du foie.

Brigui et al.<sup>260</sup> ont utilisé un ODN anti-sens dirigé contre la région de l'ARN messager qui initie le codon de *mdr1*, le gène qui code pour la protéine P-gp impliquée dans la résistance des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques. Les auteurs ont couplé un cholestérol en position 5' de l'ODN. *In vitro*, l'expression de P-gp est alors réduite de 98 %. Le même ODN sans cholestérol vectorisé avec du Superfect® et AMA induit une diminution de 85 et 80 % respectivement. Les auteurs ont donc prouvé, *in vitro*, un effet très supérieur du simple couplage d'un cholestérol dans l'internalisation de l'ODN.

L'ajout de cholestérol accroît également l'internalisation de molecular beacon (MB), des ODN qui permettent une détection d'ADN ou d'ARN dans des cellules vivantes. Mais leur

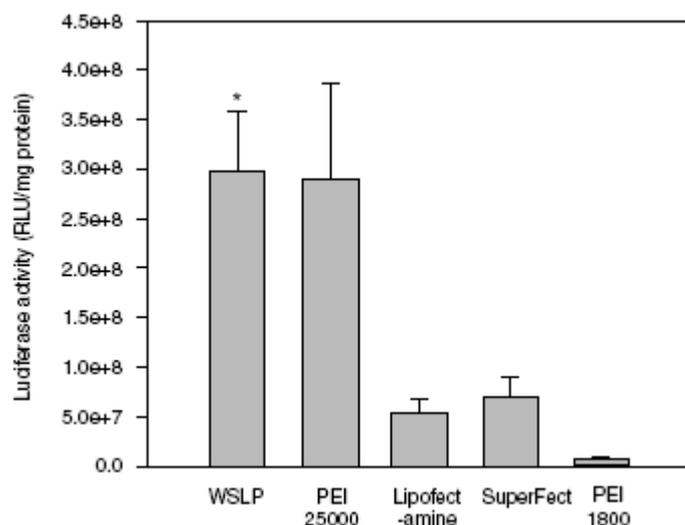
utilisation *in vivo* et leur internalisation cellulaire sont limitées par la nature polaire et anionique des MB. Pour palier à ce problème, Jeong et al.<sup>261</sup> ont alors couplé un groupement cholestéryle en 5' des MB augmentant ainsi l'internalisation d'un facteur six, et le niveau de transfection atteint celui obtenu avec la lipofectamine.

L'ajout de cholestérol pour potentialiser la délivrance de PNA a également été réalisé par Joshi et al.<sup>262</sup> Dans cette étude, les auteurs ont utilisé un PNA couplé à un fluorophore (FITC) et ont déterminé que l'internalisation du complexe Chol-PNA est deux fois supérieure à celle du Tat-PNA. Malgré ce résultat bénéfique, la solubilité aqueuse du complexe reste faible ce qui limite en l'état son développement *in vivo*.

#### 4.2. Délivrance d'ADN

Comme nous l'avons vu dans ce manuscrit, le PEI est un composé largement utilisé pour l'internalisation d'acides nucléiques. En 2003, Furgeson et al.<sup>263</sup> ont greffé cholestérol à des molécules de PEI linéaires afin d'améliorer encore l'efficacité de délivrance. Ainsi les auteurs ont étudié plusieurs constructions : LPC-L, sur lequel le cholestérol est couplé sur l'extrémité N-terminale du PEI et LPC-T, portant un seul cholestérol sur une amine secondaire du PEI. Les deux LPC ont alors été couplés à un ADN plasmidique codant pour l'interleukine 12 murine et l'efficacité de transfection a été comparée à celle obtenue avec un PEI ramifié (BPEI). Dans des mélanomes murins, les LPC permettent une transfection deux fois supérieure comparée au BPEI. En ce qui concerne des cellules de carcinome rénal murin, LPC-T (chol interne) est deux fois plus efficace que BPEI pour la transfection et LPC-L (chol terminal) est trente fois plus efficace. Cette étude prouve une fois de plus l'effet bénéfique du cholestérol dans la délivrance d'acide nucléique avec une amélioration de l'efficacité supérieure lorsque le cholestérol est sur le côté N-terminal du PEI.

Lee et al.<sup>264</sup> ont utilisé cette même stratégie pour la synthèse de WSLP (Water Soluble LipoPolymer) par couplage du cholestérol à du PEI, ce qui forme alors des micelles en solution aqueuse. Ainsi, les auteurs montrent une efficacité de transfection d'un ADNp du WSLP supérieure aux autres vecteurs disponibles (Figure 31). La cytotoxicité envers les cellules musculaires utilisées est par ailleurs largement moindre.



**Figure 31** : Efficacité de transfection des vecteurs. D'après Lee et al.<sup>264</sup>

La pré-incubation des cellules avec du cholestérol diminue de façon dose-dépendante l'internalisation du WSLP, ce qui signifie que WSLP utilise la même voie d'internalisation que le cholestérol. *In vivo*, cette construction protège l'ADNp de la dégradation enzymatique, une sortie endosomale efficace du micelle est obtenue grâce aux chaînes PEI et au cholestérol présents dans le WSLP. Le groupe de Yockman<sup>265</sup> a ensuite étudié la délivrance d'un ADN plasmidique codant pour l'interleukine 2 sur des souris possédant un adénocarcinome du colon. Ainsi, la médiane de survie pour le groupe contrôle (20 jours) passe à 35 jours pour le groupe recevant l'ADNp seul ou couplé à du PEI 25kDa et à 45 jours pour WSLP/ADNp. La biodistribution du complexe WSLP/ADNp montre une quantité intratumorale 10 à 20 fois supérieure à celle retrouvée dans les autres organes. Cette localisation préférentielle au niveau de la tumeur s'explique aisément par le fait que le complexe ait été injecté de façon topique (intratumorale).

#### 4.3. Applications aux peptides

Kim et al.<sup>5</sup> ont fonctionnalisé un polymère d'arginine avec du cholestérol en N-terminal. Le peptide obtenu forme un complexe stable avec un ARNsi dirigé contre le gène codant pour le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ainsi, l'injection intratumorale du complexe *in vivo* à des souris réduit la vascularisation tumorale et la quantité de VEGF au niveau de la tumeur.

Guo et al.<sup>266</sup> ont couplé du cholestérol à des oligopeptides dans le but de former des micelles cationiques qui serviront de vecteurs pour la délivrance de gènes. Les peptides amphiphiles obtenus, de type Chol-H<sub>n</sub>R<sub>10</sub> avec n = 5 ou 10, forment avec l'ADN une structure micellaire de taille inférieure à celle obtenue avec H<sub>n</sub>R<sub>10</sub>. L'ajout de cholestérol à H<sub>5</sub>R<sub>10</sub> et à H<sub>10</sub>R<sub>10</sub> augmente l'efficacité de transfection de l'ADNp d'un facteur 9 et 34, respectivement.

Le cholestérol pullulan est composé de groupements cholestéryles liés à un polymère de résidus osidiques. Ce polymère possède la particularité de former des nanogels dans l'eau. La fonctionnalisation du polymère par des groupements amines forme un nanogel cationique. Ainsi, Ayame et al.<sup>267</sup> ont démontré que ce nanogel est plus fortement internalisé que les lipides cationiques ainsi que Pep-1, un CPP commercialisé sous le nom de Chariot. Enfin, le nanogel améliore de façon considérable l'internalisation de Tat-GFP, avec une localisation prépondérante de la fluorescence au niveau nucléaire, indiquant une sortie endosomale efficace du complexe. Il a été de nombreuses fois démontrées dans ce manuscrit que le peptide Tat-cargo reste piégé dans les endosomes. Il serait très intéressant de coupler le cholestérol au complexe Tat-GFP, en s'affranchissant ainsi de la formation du nanogel, et de vérifier l'effet bénéfique de ce couplage sur l'efficacité d'internalisation et la sortie endosomale du complexe, comme il a été fait à de très nombreuses reprises avec les acides gras.

Enfin, au-delà des peptides internalisants, le cholestérol a été ajouté à un peptide inhibiteur du virus HIV-1.<sup>268</sup> L'activité anti-virale est 50 fois supérieure lorsque le cholestérol est couplé côté C-terminal du peptide C34. La palmitoylation du même peptide n'augmente l'activité anti-virale que d'un facteur trois, montrant dans cette étude l'effet supérieur du cholestérol comparé à un acide gras. Enfin, et de façon plus intéressante, l'ajout du cholestérol du côté N-terminal diminue l'activité anti-virale de C34, montrant ainsi que la position du groupement hydrophobe influence l'activité biologique de C34.

Ce paragraphe a mis en évidence un bénéfice du cholestérol dans l'augmentation de l'internalisation ou dans l'amélioration de l'effet biologique d'une molécule (ODN, WSLP, C34-chol., etc...). Toutefois, l'influence du cholestérol n'a été que très peu évalué sur les CPP. Pourtant, compte tenu du nombre d'applications des CPP relaté dans la littérature, il serait très intéressant de vérifier son effet sur l'internalisation de peptide hydrophile comme Tat.

## Définition du projet de recherche

Comme nous venons de le voir, la plupart des molécules thérapeutiques doivent être en premier lieu délivrées dans le cytoplasme pour exercer leur action thérapeutique à différents niveaux cellulaires. La principale limitation à l'usage de ces molécules est la traversée efficace de la membrane plasmique, dont le passage reste essentiellement limité aux molécules neutres, de faibles poids moléculaires ou à celles qui ont un transporteur ou un récepteur membranaire approprié. Une des stratégies alternatives pour augmenter l'internalisation de ces molécules est de les coupler à un Cell-Penetrating Peptides (CPP) dont un des plus utilisés est le peptide Tat dérivé de la protéine virale HIV-1. Ce peptide permet l'internalisation de molécules très diverses en taille et en caractéristique physicochimique (allant de la petite molécule organique à des liposomes de grandes tailles).

Il a été démontré que des peptides possédant un caractère hydrophobe présentent une meilleure affinité pour la bicouche lipidique supérieure à celle du peptide parent, et sont capables de s'insérer dans la membrane cellulaire plus efficacement via leur groupement hydrophobe. Une limite à l'utilisation de Tat, en plus de son aspécificité cellulaire, est son piégeage important dans les endosomes ce qui entraîne probablement une dégradation accrue par la voie endo-lysosomiale. L'hydrophobisation du peptide permet une sortie endosomale plus efficace. A l'heure actuelle, la stratégie majoritairement utilisée est le couplage côté N-terminal d'un acide gras à Tat, et de façon plus générale aux CPP. L'ajout d'acide caprylique, myristique ou stéarique aux CPP augmente considérablement l'efficacité d'internalisation. Cependant, le cholestérol n'a été que très peu utilisé pour améliorer l'internalisation de CPP, malgré des bénéfices observés sur les oligodéoxynucléotides (ODN) et les polymères cationiques.

### 1. Synthèse de nouveaux peptides internalisants

Notre stratégie est d'insérer un groupement cholestéryle à la séquence peptidique de Tat. Ceci permettrait une meilleure insertion de Tat au niveau de la membrane cellulaire, et donc une internalisation plus efficace. Un autre effet bénéfique est que son ajout favoriserait la

libération endosomale de Tat. Tout ceci montre que l'ajout de cholestérol à Tat pourrait augmenter considérablement son efficacité d'internalisation.

Sans modification préalable, il n'est pas possible de coupler le cholestérol côté N-terminal à Tat au contraire de la stratégie utilisée avec les acides gras. Pour contourner cette limitation, nous avons conçu un synthon original pouvant être intégré en toute position de la séquence peptidique. Ce nouveau synthon peut être incorporé en synthèse du peptide sur phase solide (SPPS) comme n'importe quel autre acide aminé "classique" car il possède une fonction acide libre et une fonction amine protégée par un groupement fmoc.

La séquence du peptide Tat (H-YGRKKRRQRRRG-C-NH<sub>2</sub>) contient 8 aminoacides basiques (6 R + 2 K) indispensables pour l'internalisation car responsables des interactions électrostatiques avec les constituants anioniques de la membrane cellulaire. Ces peptides intègrent une tyrosine côté N-terminal afin de réaliser un marquage à l'iode 125, pour une quantification absolue du peptide internalisé, et une cystéine côté C-terminal pour un couplage à un fluorochrome ou à un cargo, par exemple un agent antitumoral.

Dans la séquence, trois aminoacides (2 G + 1 Q) ne sont pas absolument requis pour l'internalisation. Ils sont donc tous les trois potentiellement remplaçables par notre aminoacide cholestérylé. Nous allons pouvoir insérer soit 1, soit 2 voire 3 groupements cholestéryles, et ceci de façon rationnelle (position latérale, position centrale, soit les deux). Au total, ce sont sept peptides cholestérylés différents qui peuvent être obtenus et nous pourrons mener une étude complète de relation structure-activité. Nous allons pouvoir déterminer le nombre ainsi que la (ou les) position(s) idéale(s) du groupement cholestéryle afin d'obtenir l'internalisation de Tat la plus efficace.

Des peptides "Tat" portant un groupement cholestéryle en position centrale ou latérale et le peptide Tat natif ont été synthétisés manuellement, purifiés par HPLC "semi-préparative" avec une pureté de 100% et caractérisés par chromatographie liquide haute pression (HPLC), spectrométrie de masse MALDI-Tof et dosages spectrophotométriques (dosage des thiols au réactif d'Ellman et mesure de l'absorbance de la tyrosine).

## 2. Evaluations *in vitro* des peptides internalisants

Pour mesurer l'influence du cholestérol sur l'internalisation de Tat, les différents peptides ont été évalués par cytométrie de flux sur des cellules de carcinomes ovariens humains (SKOV-3), et de lymphomes de lymphocytes T (Jurkat).

Dans une seconde étude, nous vérifierons que l'ajout du cholestérol à Tat n'induit pas la formation de pores au niveau membranaire et qu'elle n'engendre pas une diminution de la viabilité cellulaire. Dans un premier temps, nous avons évalué le potentiel cytotoxique de nos peptides par des essais de viabilité cellulaire. Ce test est basé sur le changement de couleur d'un dérivé du tétrazolium (MTS), lors de sa réduction par les cellules viables. La viabilité globale de la population cellulaire est estimée par simple mesure colorimétrique. Dans un second temps, après incubation des différents peptides, les cellules ont été marquées à l'iodure de propidium (IP). L'IP ne traverse pas la membrane cellulaire des cellules vivantes au contraire des cellules mortes où l'IP peut pénétrer en raison d'une intégrité membranaire défectueuse. Ainsi, nous verrons que l'ajout d'un groupement cholestéryle ne diminue pas la viabilité cellulaire de Tat, jusqu'à des concentrations de 20  $\mu$ M.

Dans une troisième étude, les peptides seront radiomarqués à l' $^{125}$ I au niveau de la tyrosine. Après une incubation des cellules SKOV-3 avec le peptide, la radioactivité contenue dans le culot cellulaire sera mesurée par un compteur gamma. Ce protocole nous permettra de quantifier de manière absolue la quantité de peptide internalisé par les cellules.

# Résultats et Discussion

## I Synthèse des peptides cholestérylés

Notre stratégie pour augmenter l'internalisation de Tat est d'intégrer en une position donnée du cholestérol sur sa séquence peptidique. Il est dans un premier temps nécessaire de synthétiser un aminoacide cholestérylé.

### 1. Synthèse de l'aspartate de cholestéryle

Ce synthon a été conçu avec une fonction acide libre et une fonction amine protégée par un groupement Fmoc pour être utilisable comme n'importe quel autre aminoacide commercial en synthèse peptidique sur phase solide (SPPS) en stratégie Fmoc/tBu. Je détaillerai un peu plus loin dans ce chapitre les principes de base de la SPPS.

L'acide aspartique commercial protégé au niveau de sa fonction amine et acide de la chaîne latérale (Fmoc-Asp(OtBu)-OH, molécule **1**) constitue la base de notre nouveau synthon. Dans une première étape, nous avons réalisé une réaction d'estérification entre la fonction acide  $\alpha$  de la molécule (**1**) et la fonction hydroxyle du cholestérol (figure 32). Deux composés activateurs de la fonction acide (HOBt et TBTU) ont été utilisés lors de ce couplage réalisé en milieu alcalin.

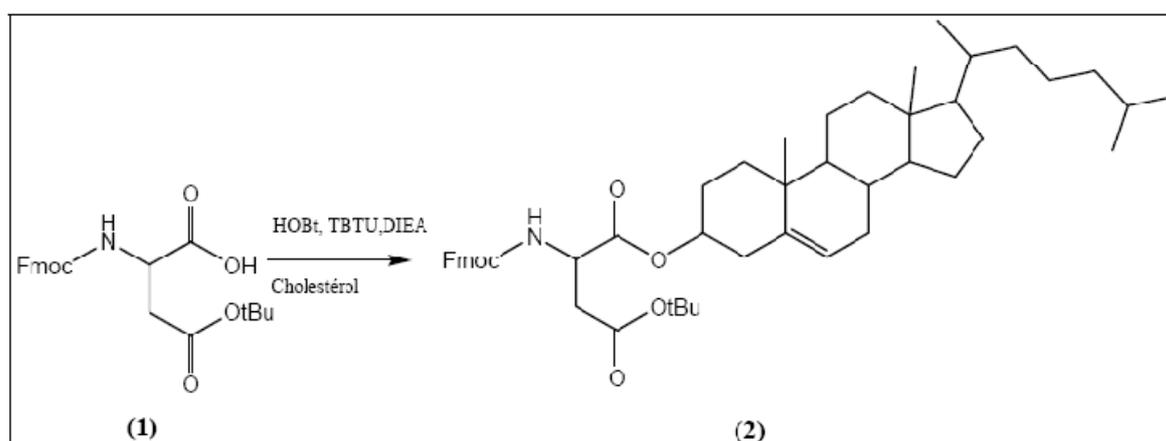
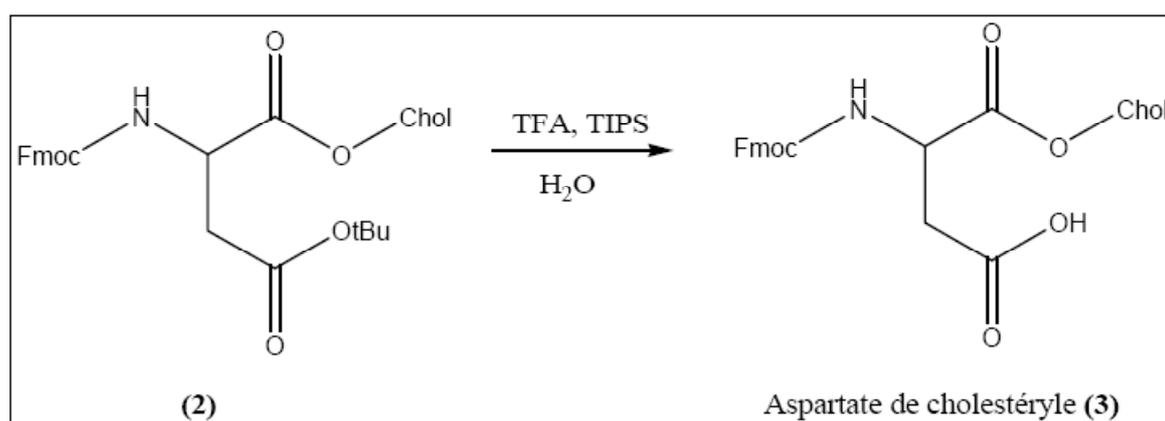


Figure 32 : Synthèse de l'intermédiaire (2).

D'un point de vue pratique, 1 équivalent de la molécule **(1)** est dissout dans du diméthylformamide (DMF) puis 1,2 eq. de HOBt et TBTU et 2,5 eq. de DIEA sont ajoutés. Parallèlement, 2,5 eq. de cholestérol sont dissout dans du dichlorométhane (DCM) puis les deux solutions sont rassemblées. Le milieu réactionnel est placé sous agitation à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par chromatographie sur couche mince (CCM). Typiquement, la réaction n'évolue plus après 24 heures. La DMF est alors extraite du milieu réactionnel par trois lavages avec de l'eau ultrapure puis le milieu est concentré grâce à un évaporateur rotatif. Le solide obtenu est redissout dans un minimum de DCM et le milieu brut est purifié par colonne chromatographique sur silice. Le composé **(2)** est obtenu avec un rendement de 90 %.

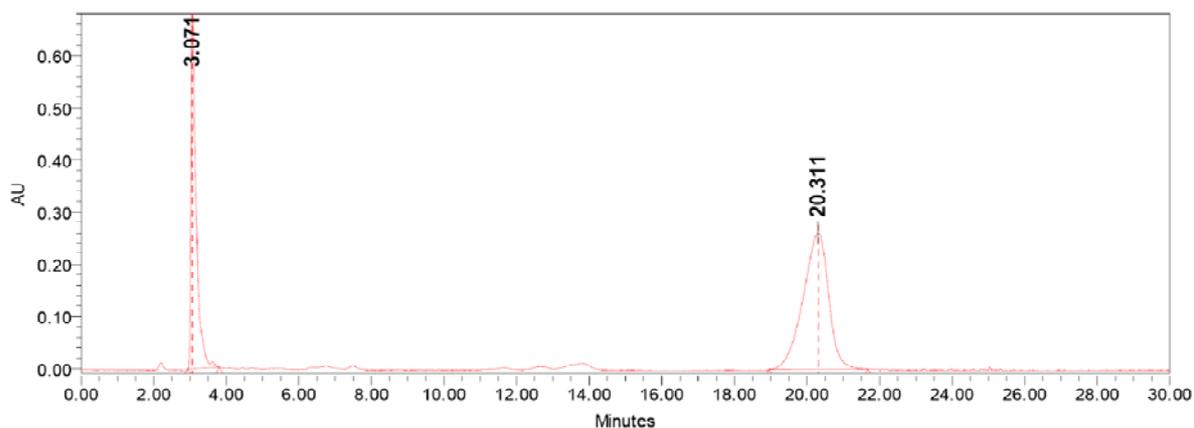
La fonction acide latérale du composé **(2)** est alors déprotégée de son groupement tBu par un traitement avec une solution de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS 92,5/2,5/5 (v/v/v) pendant une heure. Le milieu réactionnel est purifié par colonne chromatographique sur silice. Le rendement de cette étape est de 94 %. L'aspartate de cholestéryle (composé **(3)**), figure 33, est obtenu pur sous forme de poudre blanche avec un rendement global de 84 %. Il est à noter que la molécule synthétisée n'est pas un acide  $\alpha$  aminé « classique » mais un  $\beta$ -aminoacide puisque le groupement cholestéryle est introduit au niveau de la fonction acide  $\alpha$  du composé commercial **(1)**.



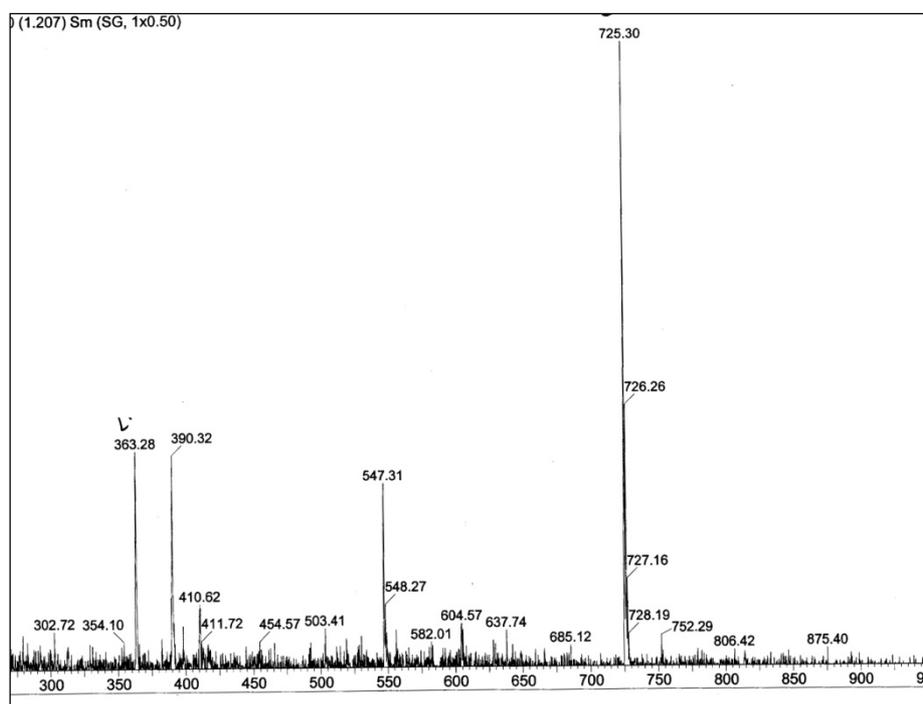
**Figure 33** : Obtention de l'aspartate de cholestéryle **(3)**.

Cet aminoacide a été caractérisé par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) (figure 34) ainsi que spectrométrie de masse MALDI-Tof (figure 35) et électrospray en injection

directe (APCI). Un seul pic ( $t_r = 20,311$  min) est visualisé par HPLC et deux signaux correspondants aux ions moléculaires protonné ( $m/z = 725,30$ ) et diprotonné ( $m/z = 363,28$ ) du composé **(3)** sont présents sur le spectre MALDI. Les deux autres ions majoritaires sur le spectre ( $m/z = 390,32$  et  $547,31$ ) correspondent aux ions de la matrice.



**Figure 34** : Chromatogramme HPLC du composé **(3)**.



**Figure 35** : Spectre MALDI du composé **(3)**.

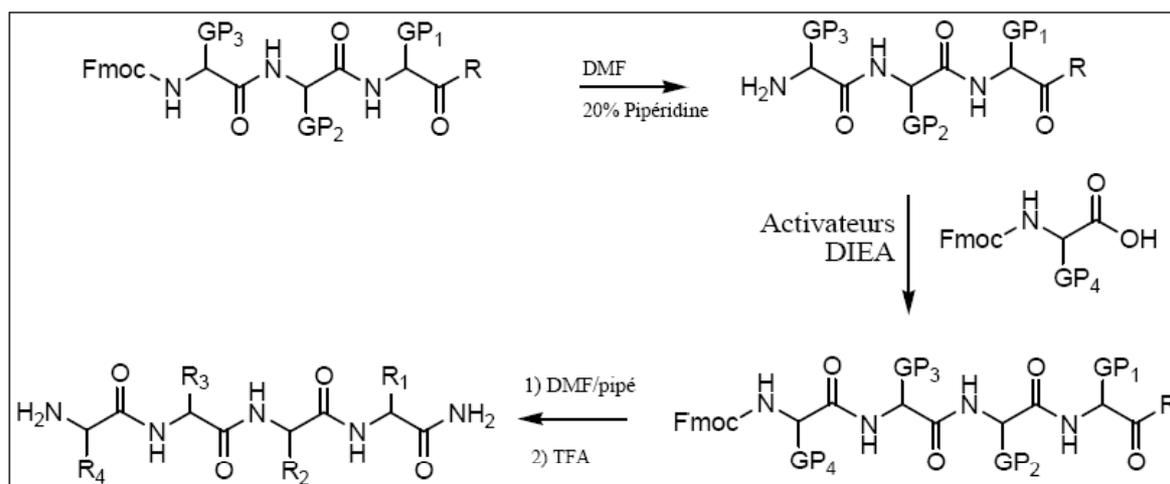
Afin de vérifier la nature du pic HPLC (20,311 min) présent à la figure 34, le composé a été récupéré « en sortie de colonne » puis analysé par MALDI. Le spectre correspond effectivement au composé **(3)**, confirmant une pureté de 100 % du synthon utilisé. Ce degré de pureté est primordial pour son utilisation ultérieure en SPPS.

## 2. Synthèse peptidique sur phase solide

### 2.1. Rappel

La synthèse peptidique sur phase solide est apparue dans les années 1960. Elle consiste en l'incorporation séquentielle des acides aminés, de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale, sur un support constitué de billes de polymères synthétiques. Ces billes sont fonctionnalisées par divers groupements chimiques qui permettent la liaison avec le premier acide aminé. Un très grand nombre de résines commerciales existe, avec des propriétés de solvations différentes ainsi que divers types de groupements chimiques. Selon la nature de ces groupements, il est possible d'obtenir après clivage de la résine un peptide protégé ou non sur les chaînes latérales et avec une extrémité C-terminale portant des groupements fonctionnels différents (acide, amide, ester méthylique, aldéhyde, etc...).

L'incorporation de chaque aminoacide se fait grâce à la formation d'une liaison amide (dans ce cas, elle porte de nom de liaison peptidique) entre la fonction acide de l'aa en solution et la fonction amine du résidu présent sur la résine. Il est alors nécessaire de protéger les fonctions chimiques non engagées, notamment l'amine  $\alpha$  et les groupements réactifs présents sur les chaînes latérales de certains résidus. Divers activateurs ont été mis au point et permettent d'éviter les réactions d'épimérisation pouvant survenir.



**Figure 36 :** Principe de la SPPS. GP : groupement protecteur ; R : résine ; Rn : chaîne latérale de l'acide aminé n.

Ainsi, comme il est représenté à la figure 36, la création de la liaison peptidique nécessite la déprotection de la fonction amine N-terminale du dernier résidu présent sur la résine (Fmoc dans cet exemple). Ceci est réalisé grâce à une solution de pipéridine dans la DMF. Puis l'acide aminé suivant est ajouté à la résine. Il possède toutes ses fonctions réactives protégées sauf la fonction amine  $\alpha$  qui va réagir avec l'acide aminé formant ainsi la nouvelle liaison. Ces deux étapes de déprotection/couplage se répètent jusqu'à l'obtention de la séquence peptidique désirée. Enfin, le peptide est clivé de son support en même temps que les groupements protecteurs des chaînes latérales des résidus. Dans notre exemple, la résine permet l'obtention d'une fonction amide en C-terminal et le clivage se réalise grâce à une solution d'acide trifluoroacétique (TFA).

L'utilisation d'un excès de réactifs permet des réactions rapides et quantitatives. Les avantages de la SPPS sont l'absence de purification entre chaque cycle grâce à l'élimination des excès par simple filtration et la possibilité d'automatisation. Deux grandes stratégies sont largement utilisées en SPPS : les stratégies Fmoc/tBu et Boc/Bzl, tirées du nom des groupements protecteurs présents sur la fonction amine  $\alpha$  et sur les chaînes latérales des résidus, respectivement. Enfin, ces deux groupements sont orthogonaux, chacun d'entre eux se clive dans des conditions différentes ce qui signifie que le clivage de l'un n'entraîne pas celui de l'autre.

## 2.2. Synthèses des peptides

Durant ces études, trois peptides différents ont été synthétisés par SPPS selon la stratégie Fmoc/tBu. Les séquences peptidiques ainsi que les acronymes des peptides sont les suivants :

Composé **(4)** GQG : YGRKKRRQRRRG (séquence native)

Composé **(5)** GDcG : YGRKKRRDcRRRG

Composé **(6)** GQDc : YGRKKRRQRRRDc

Le terme Dc correspond au synthon **(3)** une fois incorporée dans la séquence du peptide. Les acides aminés Y, R, K, Q, C sont protégés respectivement au niveau de leur chaîne latérale par les groupements tBu, Pbf, Boc et Trt pour les deux derniers résidus. Tous ces groupements sont clivables grâce à une solution de TFA à 92,5 %. La résine utilisée est une « rink amide »,

ce qui permet l'obtention d'une fonction amide en C-terminal après clivage du peptide de son support.

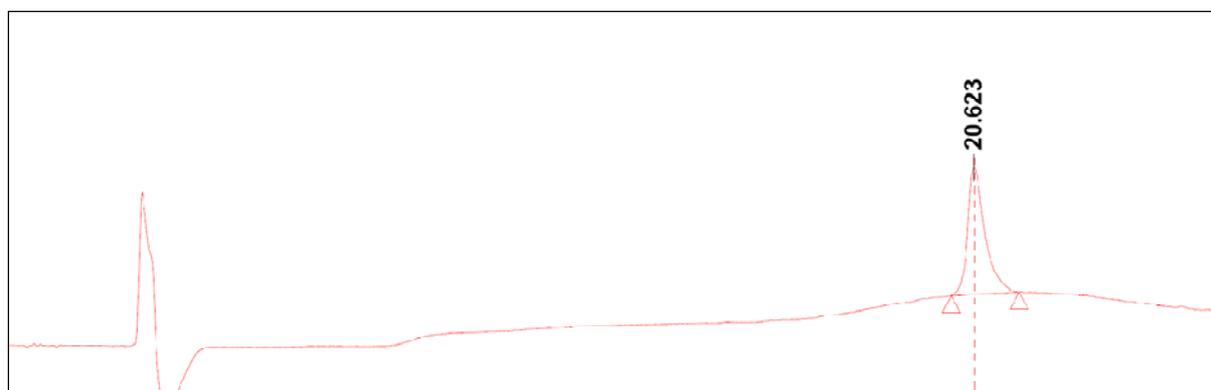
Dans une première étape, la résine, après solvataion à la DMF, est traitée avec une solution DMF/pipéridine 4/1 (v/v). Deux traitements sont effectués, un d'une minute qui est suffisant pour cliver plus de 90 % des groupements fmoc présents sur la résine, et un second traitement de 10 minutes pour amener la déprotection à complétion. Pendant cette déprotection, du dibenzofulvène est relargué dans la solution de DMF/pipéridine. Son absorbance à 301 nm permet de le doser spectrophotométriquement, et ainsi de calculer le nombre de moles d'amine N-terminale déprotégée à chaque étape. Pour chaque couplage, le taux d'incorporation peut être ainsi calculé.

Après l'obtention de la fonction amine libre sur la résine (1 eq.), le premier aminoacide (4 eq.) est incorporé sur la résine en utilisant 5 eq. de TBTU, 5 eq. d'HOBt ainsi que 8 eq. de DIEA. Le solvant lors du couplage est la DMF et son volume est calculé de sorte à obtenir une concentration en activateur de 0,5 M. Après une heure et demi de réaction, la solution de couplage est filtrée et une nouvelle solution d'aa activée est alors mise en contact de la résine pendant 30 minutes, afin de réaliser un double couplage. La complétion de la réaction est vérifiée par un test de Kaiser. Par précaution, un « capping » de la résine est effectué pendant 5 minutes grâce à une solution d'anhydride acétique (DMF/anhydride acétique/DIEA 85/10/5 v/v/v). Cela consiste à acétyler les fonctions amines encore présentes sur la résine et ainsi éviter la formation de peptides de délétion lors de l'intégration de l'aa suivant.

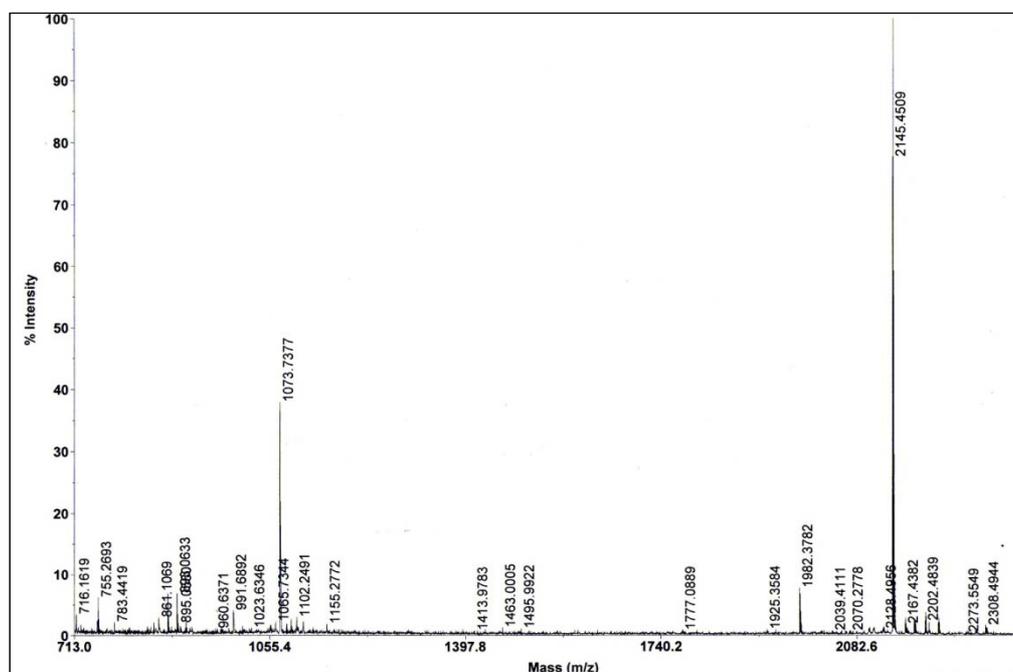
Ce protocole est répété pour chaque insertion d'un nouvel aminoacide sur la résine, sauf l'étape de « capping » sur le dernier aminoacide inséré afin de maintenir l'extrémité du peptide sous sa forme amine.

Après l'assemblage des séquences désirées, un microclivage du peptide est effectué sur quelques grains de résines. Un traitement des billes avec une solution de TFA à 92,5% pendant deux à trois heures suffit pour obtenir le peptide déprotégé. Une précipitation du peptide avec de l'éther diéthylique est effectuée. Le précipité est alors dissous dans de l'eau contenant 0,1 % de TFA et un aliquot de cette solution est analysée par HPLC. Chaque pic présent sur le chromatogramme HPLC est récupéré « en sortie de colonne » puis analysé par MALDI pour caractérisation, identification et détermination de sa proportion relative par intégration de l'aire sous les pics.

Par cette méthode, le temps de rétention de chaque peptide a été déterminé. Une fois les peptides attendus caractérisés, la totalité du peptide présent sur la résine est clivée comme décrit précédemment. Le milieu réactionnel brut est alors précipité deux fois par 20 volumes d'éther diéthylique glacé. Le précipité obtenu est redissous dans de l'eau ultrapure. Le peptide est ensuite purifié par HPLC semi-préparative puis caractérisé par HPLC, MALDI et dosages spectrophotométriques de la tyrosine et des fonctions thiols grâce au réactif d'Ellman. Un exemple du chromatogramme HPLC ainsi que du spectre MALDI correspondant au peptide GQDc est montré aux figures 37 et 38, respectivement.



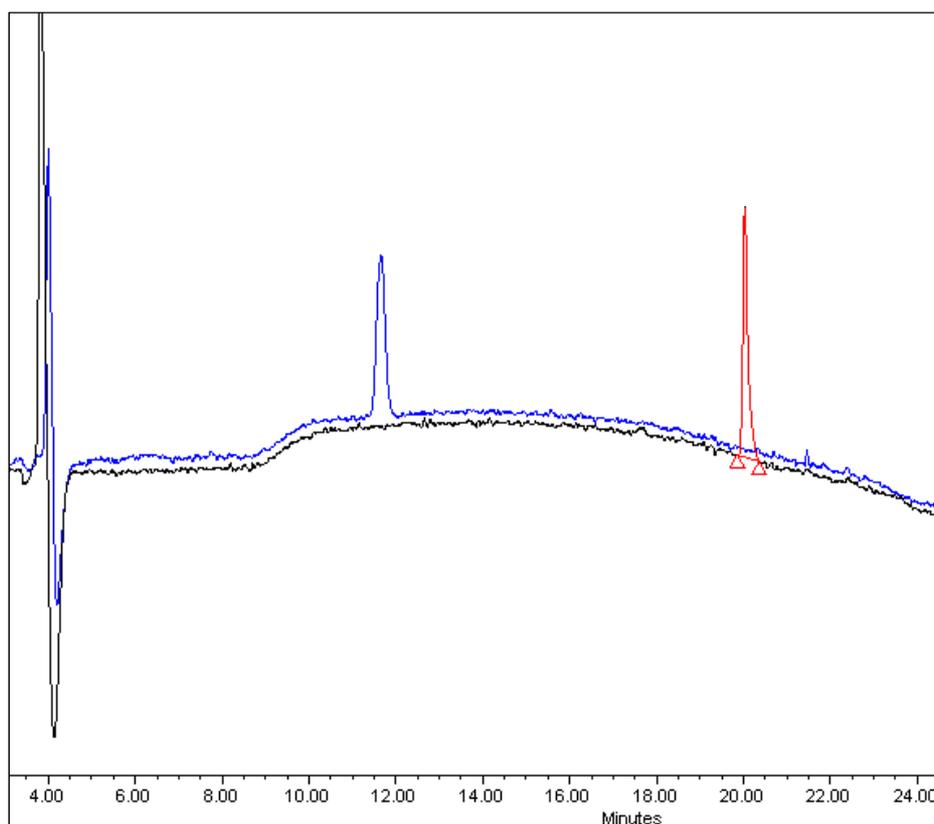
**Figure 37 :** Chromatogramme HPLC de GQDc après purification.



**Figure 38 :** Spectre MALDI de GQDc.

La figure 38 montre deux ions moléculaires monoprotonné et diprotonné correspondant au peptide GQDc. Les autres signaux correspondent au bruit de fond. Ce spectre, combiné au chromatogramme HPLC, montre que le peptide GQDc est pur à 100 %. Les peptides GQG et GDcG ont également été obtenu avec ce niveau de qualité (cf figure 39 pour les chromatogrammes HPLC).

Comme attendu, l'analyse HPLC a permis de vérifier que le greffage de cholestérol augmente substantiellement l'hydrophobicité de la séquence native de Tat (GQG). En effet, l'analyse HPLC des peptides GQG et GDcG, dans le même gradient, montre un temps de rétention supérieur de huit minutes pour GDcG, comparé à GQG (figure 39) ce qui correspond à une différence de 30 % environ en acétonitrile.



**Figure 39** : Profils HPLC superposés de GQG (bleu) et GDcG (noir avec pic rouge).

La principale difficulté lors des synthèses est l'obtention de rendement élevé. Sur les treize résidus à incorporer, il suffit qu'un seul couplage, voire deux, ne soit pas efficace pour que le rendement final soit assez faible. Généralement, le rendement final pour les peptides bruts a été de 20 à 25 %. Afin de déterminer les raisons de ce rendement limité en peptide, nous

avons mis en évidence la présence d'une sous-réaction majeure se réalisant lors de la synthèse des peptides cholestérylés (cf chapitre III de la partie Résultats et Discussion). Le contournement de cette réaction parasite pourrait nous éviter une répétition chronophage des synthèses afin de disposer des différents peptides en quantité suffisante pour les évaluer biologiquement.

### *2.3. Marquage des peptides à la fluorescéine*

La fluorescéine fonctionnalisée par un groupement maléimide (FM) est sélectivement couplée au peptide sur son unique fonction thiol par formation d'une liaison thioéther. Cette réaction spécifique se réalise à un pH de 6,5-7,5.

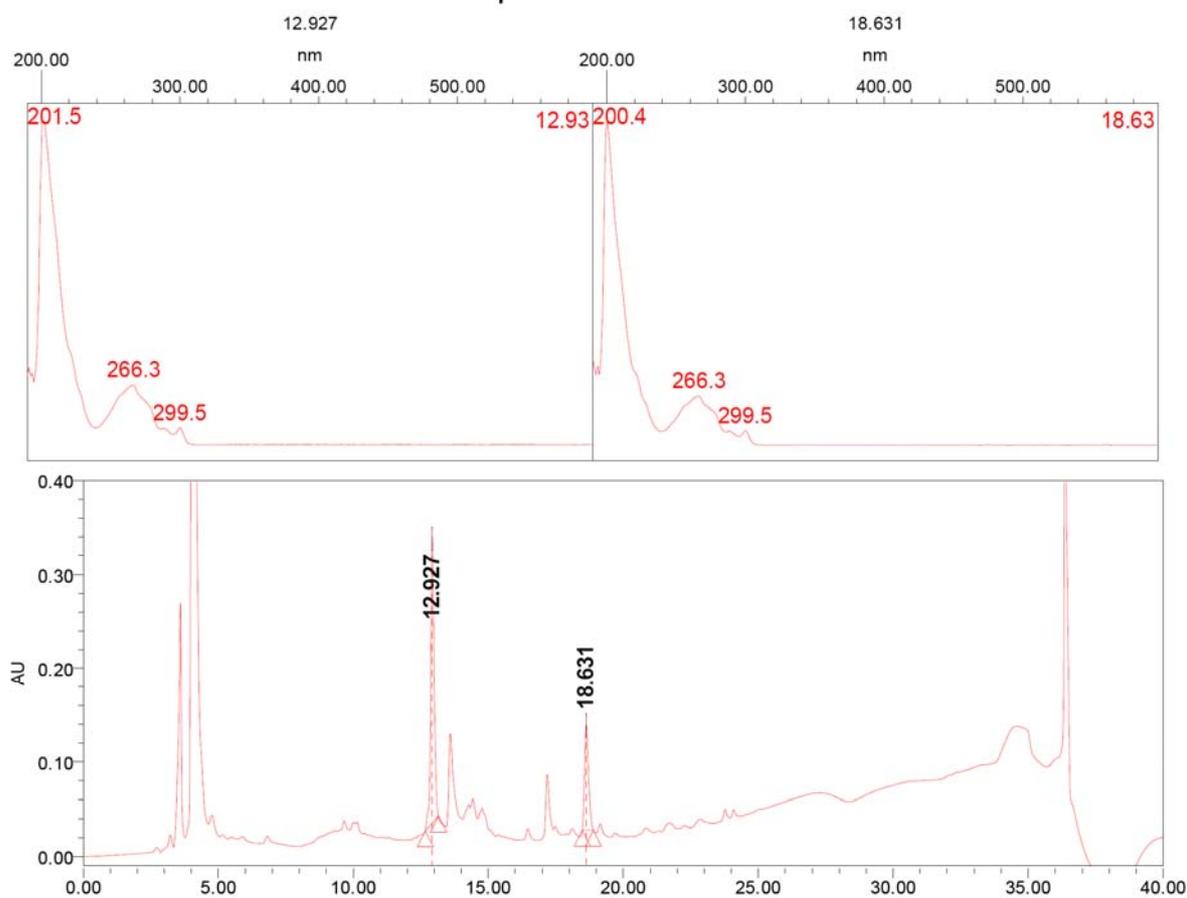
Le peptide est dissous dans du Tris-HCl 100 mM pH 7 et la fluorescéine-maléimide (FM) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Après mélange des deux solutions, la réaction, suivie par HPLC, est maintenue à température ambiante et à l'abri de la lumière. Quand il n'y a plus d'évolution, 20 volumes d'acétone glacé sont ajoutés pour précipiter le peptide marqué et extraire la FM résiduelle.<sup>269</sup> Après plusieurs précipitations, le peptide est redissous dans de l'eau contenant 0,1% de TFA puis analysé par HPLC et MALDI.

Comme précédemment, les analyses indiquent une pureté des peptides fluorescents de 100 %. Ils sont alors lyophilisés puis dissous dans un tampon PBS à la concentration de 0,5M. Les solutions sont aliquotées en fraction de 500 µL puis conservées à une température de -80°C jusqu'à leur utilisation.

### *2.4. Difficultés de synthèses*

Lorsque le peptide est assemblé sur la résine, il est judicieux de conserver lors du microclivage le groupement protecteur Fmoc présent sur l'amine N-terminale du peptide. En effet, le groupement Fmoc possède une absorbance caractéristique, ce qui permet d'identifier le peptide désiré parmi les peptides cappés éventuels. Compte tenu de l'étape de capping réalisée systématiquement après chaque couplage, le seul Fmoc présent doit être porté par le peptide correspondant à la séquence totale. Cependant, deux pics portant un groupement Fmoc sont présents sur le profil d'élution HPLC du peptide Fmoc-GDcG mettant en évidence une sous réaction majeure que nous avons identifiée comme étant la formation d'aspartimide. Ce point important sera détaillé dans le chapitre III dans cette partie « Résultats et Discussion ». Le pic à 12,927 min, majoritaire, correspond au peptide Fmoc-GDG sans

cholestérol et celui à 18,631 min au peptide cholestérylé désiré (figure 40). La formation de cette sous-réaction est encore plus importante pour les peptides portant deux cholestérols. Plusieurs synthèses et de nombreux microclivages réalisés dans des conditions de clivages variables n'ont d'ailleurs pas rendu possible l'identification par HPLC des peptides dicholestérylés envisagés dans ce programme. Il ne nous a donc pas été possible de produire les peptides doublement cholestérylés comme nous l'avons envisagé.



**Figure 40 :** Chromatogramme HPLC d'un microclivage de Fmoc-GDcG.

Dans un premier temps, seuls deux peptides cholestérylés ont été obtenus et évalués biologiquement en comparaison du peptide Tat natif. Il s'agit des peptides possédant le cholestérol en côté C-terminal (GQDc) ou en position centrale (GDcG).

## II Evaluations biologiques *in vitro* des peptides

Il est important de vérifier que le peptide vecteur, suite à son couplage avec le cholestérol qui peut modifier fortement ses propriétés physico-chimiques, n'induit pas de toxicité cellulaire. Nous avons donc d'abord testé la cytotoxicité potentielle de ces peptides sur différents types de cellules.

### 1. Choix des lignées cellulaires

Nous avons évalué biologiquement nos peptides sur deux lignées cellulaires disponibles au laboratoire : les cellules Jurkat et SKOV3-E2.

#### 1.1. Les cellules Jurkat

Ce sont des cellules non adhérentes de lymphome de lymphocytes T, ou autrement dit des cellules cancéreuses ayant pour origine des cellules du système immunitaire.

#### 1.2. Les cellules SKOV3-E2

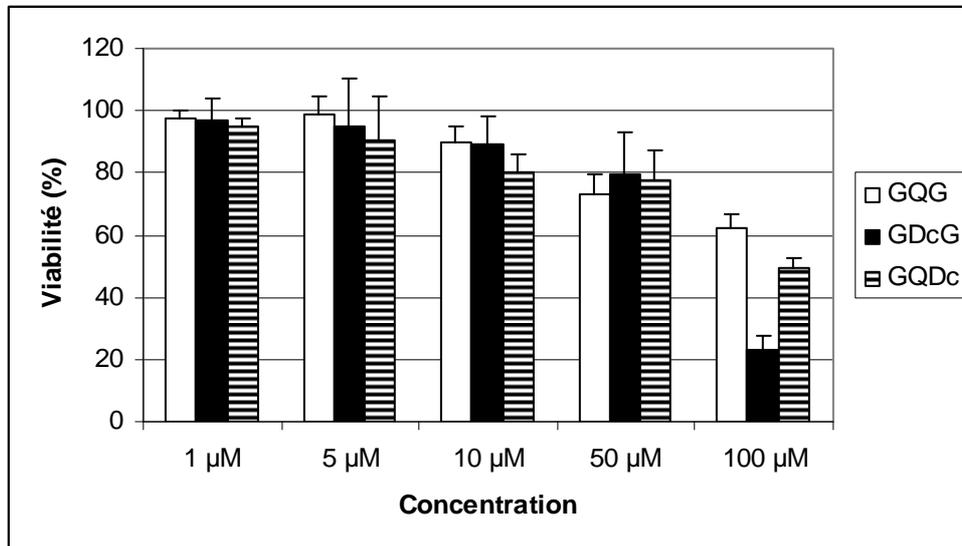
Les cellules SKOV3 sont des cellules tumorales provenant d'un carcinome ovarien humain. Ces cellules adhérentes possèdent une expression de la glycoprotéine membranaire HER2 hétérogène, qui se visualise notamment lors d'une analyse des cellules par cytométrie de flux. Grâce à un triage sélectif des cellules, les cellules SKOV3-E2 présentent une population en HER2 plus homogène. Il est à noter que ce point, utile pour expliquer la provenance des cellules, n'a pas d'intérêt dans notre étude car l'expression de ce récepteur n'influence pas nos résultats.

### 2. Evaluation de la cytotoxicité par MTS

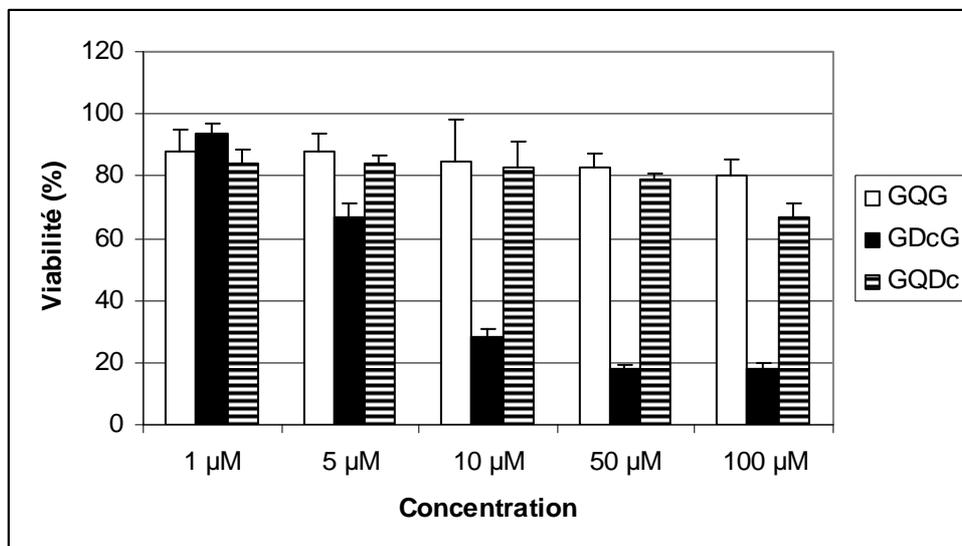
Les peptides non fluorescents ont été incubés pendant trois heures sur les deux lignées cellulaires, dans une gamme de concentration allant de 1 à 100  $\mu\text{M}$ .

Le principe de cette méthode est que le MTS est réduit biologiquement en formazan par les cellules vivantes, grâce à la déshydrogénase mitochondriale. Ce produit est soluble dans le

milieu de culture et son absorbance à 490 nm est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats sur les cellules SKOV3-E2 et Jurkat sont montrés aux figures 41 et 42, respectivement.



**Figure 41 :** Cytotoxicité des peptides sur les cellules SKOV3-E2 mesurée par MTS.

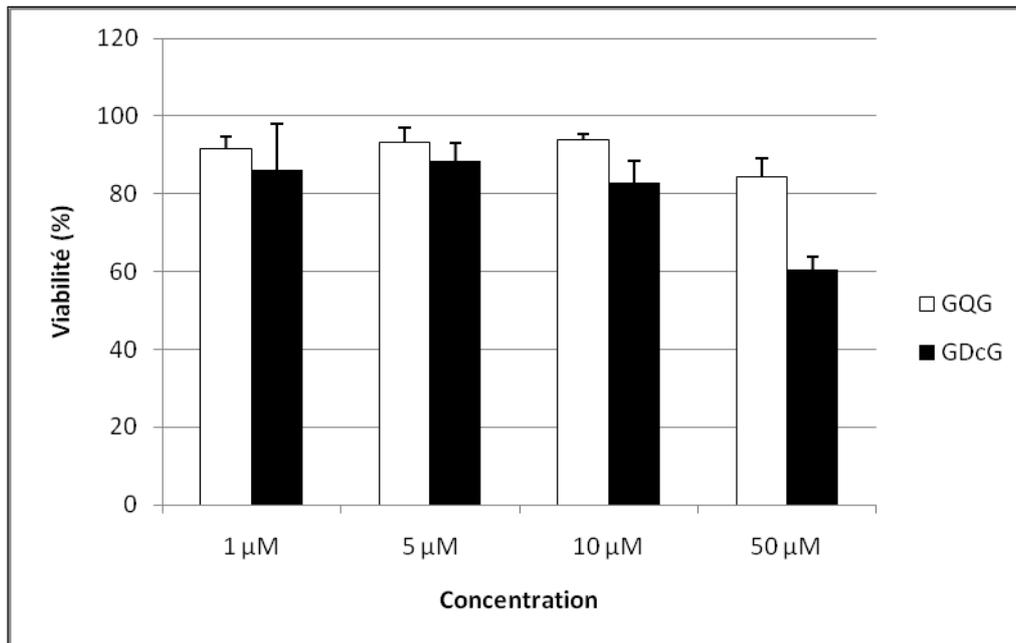


**Figure 42 :** Cytotoxicité des peptides sur les cellules Jurkat mesurée par MTS.

Tout d'abord, en comparant le peptide Tat natif GQG et GQDc sur les deux lignées cellulaires, on peut déduire que l'ajout du cholestérol côté C-terminal n'induit pas plus de cytotoxicité comparé au peptide parent, sauf à 100 μM où la viabilité est 10 à 15 % plus faible. Par contre, en comparant les résultats obtenus pour GQG et GDcG, nous pouvons remarquer

que sur la lignée SKOV3-E2, il n'y a pas de différence dans la viabilité hormis à 100  $\mu\text{M}$  où la viabilité est trois fois plus faible pour GDcG. Mais pour les cellules Jurkat, GDcG est plus toxique que GQG à faible concentration (5  $\mu\text{M}$ ). La viabilité cellulaire diminue quand la concentration de GDcG augmente, atteignant une valeur très faible (20 %) à 50  $\mu\text{M}$  (figure 42). Les données expérimentales pour Tat GQG sont pourtant en accord avec celles obtenues par Sugita et al.<sup>75</sup> (environ 85 % de viabilité à 100  $\mu\text{M}$  pour ce type de cellules). Il apparaît donc que le peptide possédant le cholestérol en position centrale soit plus toxique sur ces cellules, et plus particulièrement sur les cellules Jurkat. Cette toxicité élevée reste toutefois acceptable puisqu'il faut garder à l'esprit que des concentrations entre 50 et 100  $\mu\text{M}$  sont très élevées, voire même « extrêmes » par rapport aux concentrations utilisées dans les tests biologiques qui se situent généralement entre 1 et 10  $\mu\text{M}$ . A ces concentrations, la viabilité est globalement supérieure à 80 % sauf pour GDcG qui induit 30 % de toxicité sur les cellules Jurkat. Ces données indiquent que l'ajout d'un groupement cholestéryle à Tat n'influe que faiblement sur la cytotoxicité intrinsèque du peptide.

La toxicité potentielle de ces peptides a été confirmée par une seconde méthode afin d'évaluer la possibilité de formation transitoire de pores membranaires. L'iodure de propidium (IP) ne pénètre que dans les cellules présentant des pores au niveau de leur membrane cellulaire émettant alors une fluorescence rouge détectable par cytométrie en flux. Les peptides GQG et GDcG ont été incubés à des concentrations jusqu'à 50  $\mu\text{M}$  sur des cellules Jurkat. Après trypsinisation, lavages et resuspension des cellules, l'IP est incubé pendant 15 min. Pour GQG, la viabilité cellulaire est supérieure à 80 % jusqu'à 50  $\mu\text{M}$  (figure 43) confirmant les résultats obtenus par le test MTS. Mais pour GDcG, les valeurs obtenues sont jusqu'à trois fois plus élevées que celles déterminées précédemment. Cette différence de résultats pour GDcG sur les cellules Jurkat rend encore plus difficile l'explication de la toxicité accrue de ce peptide observée lors du test MTS.



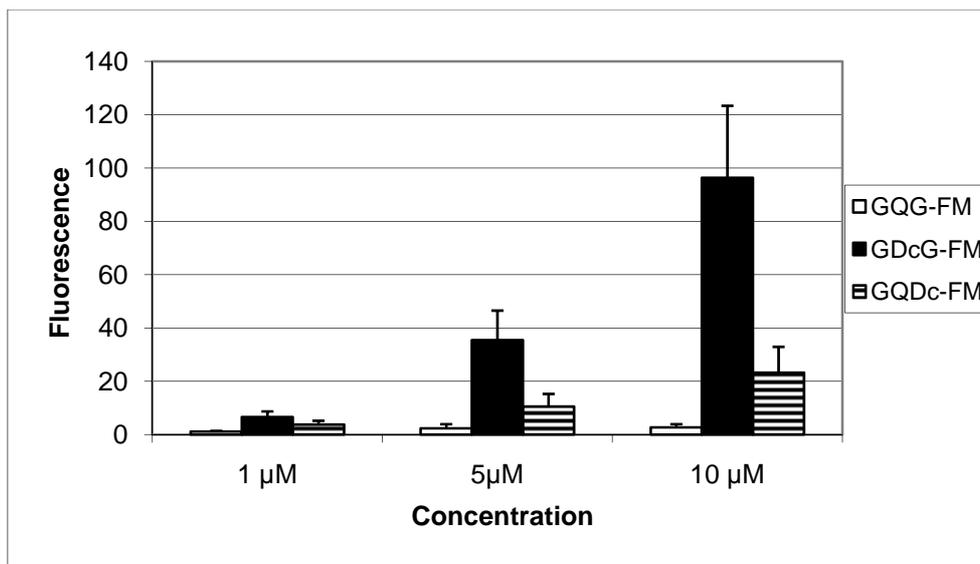
**Figure 43 :** Cytotoxicité des peptides sur les cellules Jurkat mesurée par IP.

### 3. Evaluation de l'internalisation par cytométrie de flux

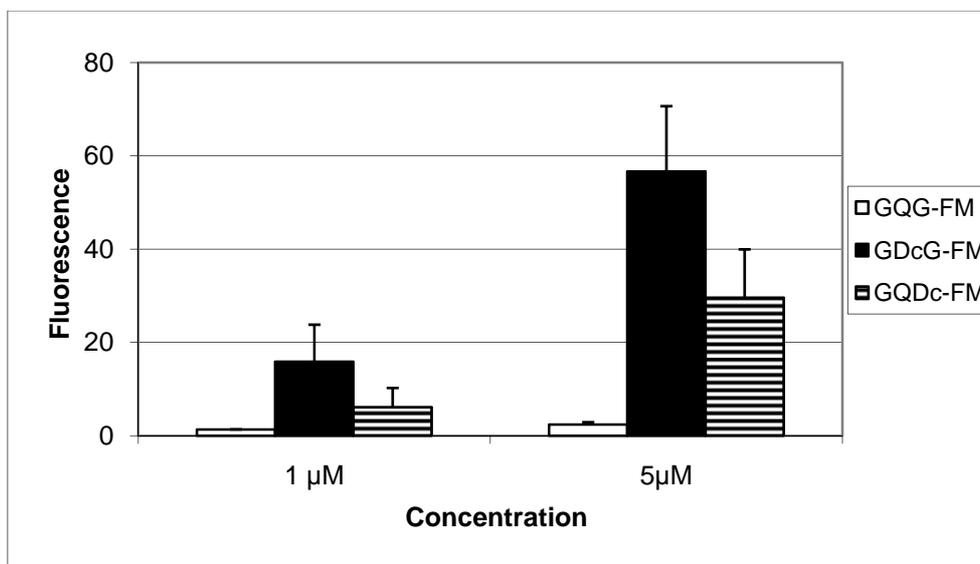
La cytométrie de flux est une technique d'analyse des cellules par un faisceau laser qui excite un fluorophore associé aux cellules. La fluorescence est enregistrée puis retranscrite sous forme d'histogrammes rendant compte de l'intensité de fluorescence de la population cellulaire analysée.

Les cellules ont été incubées pendant trois heures à 37°C avec des concentrations variables de peptides fluorescents puis trypsinées avant l'analyse, afin d'éliminer le peptide extracellulaire et de ne mesurer que la fluorescence correspondante aux peptides internalisés.<sup>62</sup> Les résultats obtenus sur les cellules SKOV3-E2 sont montrés à la figure 44, ceux obtenus sur les cellules Jurkat à la figure 45. L'axe des ordonnées correspond à la moyenne géométrique de la fluorescence des cellules (Gmean) normalisée à 1 pour les cellules seules.

Nous pouvons déjà remarquer que pour les trois peptides, l'internalisation augmente avec la concentration extracellulaire, montrant ainsi un effet dose-dépendant. La cholestérylation du peptide Tat accroît considérablement son internalisation de manière variable selon la position du cholestérol au sein de la séquence (figures 44 et 45).



**Figure 44 :** Internalisation des peptides sur les cellules SKOV3-E2.



**Figure 45 :** Internalisation des peptides sur les cellules Jurkat.

Comparé au peptide natif GQG, le peptide GDcG avec le cholestérol en position centrale est jusqu'à 30 fois plus internalisé. Pour le peptide GQDc portant le cholestérol en position C-terminale, l'amélioration n'est que d'un facteur 10. A ce jour, seules deux publications ont mis en évidence un effet plus ou moins élevé sur l'augmentation de l'internalisation selon la position du groupement hydrophobe.

En 2007, El-Andaloussi et al.<sup>158</sup> ont étudié l'internalisation de TP10 selon que la carboxyfluorescéine soit couplée au niveau N-terminal ou sur la fonction amine latérale d'une lysine située en position 7. De façon similaire à ce que nous avons pu voir avec nos peptides, la quantité de TP10 internalisé diffère selon la position du fluorophore. Lorsque celui-ci est au

sein de la séquence, la quantité est jusqu'à quatre fois supérieure que lorsqu'il est situé en N-terminal. Une seconde étude a été réalisée en 2009 par Mizuno et al.<sup>270</sup> suite au couplage de la fluorescéine diacétate (FDA) à un octamère d'arginine sur deux positions différentes. Lorsque la FDA est couplée en position C-terminale, l'internalisation est quatre fois plus efficace que lorsque le fluorophore est couplé côté N-terminal. La conclusion des auteurs est la même que celle d'El-Andaloussi : la position du cargo (ou groupement hydrophobe) affecte l'efficacité d'internalisation.

Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus et confirment ainsi que la position du groupement hydrophobe influe sur l'efficacité d'internalisation. Dans l'étude d'El-Andaloussi, il est montré que la position du fluorophore a également une incidence sur la cytotoxicité de TP10. Lorsque la fluorescéine est couplée au milieu de la séquence, le peptide est moins toxique que lors du marquage en position N-terminale. Ces résultats sont toutefois contraires à ceux obtenus dans notre étude puisque c'est le cholestérol en position centrale qui induit plus de toxicité que lorsqu'il est en position C-terminale. Cependant, les peptides ainsi que le groupement hydrophobe de notre étude ne sont pas les mêmes que ceux utilisés par El-Andaloussi. Cela peut être la cause de cette différence.

Dans nos évaluations, l'internalisation a été mesurée avec un cargo hydrophobe, la fluorescéine-maléimide. Dans le chapitre II (paragraphe 3.2.1.) de l'introduction bibliographique, il a été montré que le cargo pouvait influencer l'efficacité d'internalisation de CPP. Selon les études et le couple CPP-cargo, l'internalisation est soit augmentée, soit diminuée. Ainsi, afin de s'affranchir de cette éventualité, nous avons quantifié l'internalisation des peptides sans cargo suite au marquage à l'iode 125 de la tyrosine intégrée en position N-terminale.

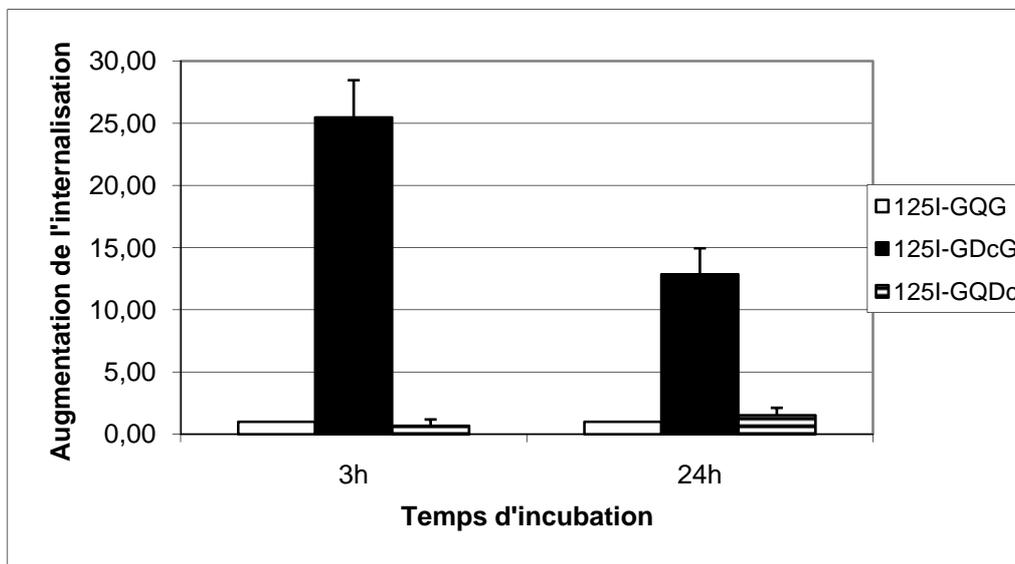
#### **4. Quantification de l'internalisation des peptides radiomarqués**

Les peptides ont été marqués à l'iode 125 par la méthode Iodo-Gen. Ce réactif va activer par oxydation les ions iodures  $I^-$  en ions iodonium  $I^+$ . Le marquage du peptide consiste en une réaction d'halogénéation spécifique de la chaîne latérale du résidu tyrosine.

Le peptide est mis en réaction avec l'iode 125 et l'Iodo-Gen pendant quatre heures à 4°C. Puis le peptide radiomarqué est séparé de l'iode libre par gel filtration sur colonne de sephadex G-10. Des fractions de 500  $\mu$ L sont récoltées. Après dilution, le nombre de coups par minutes (cpm) est mesuré pour chaque fraction et celles contenant les nombres de cpm les

plus élevés sont conservées (deux à trois fractions). L'activité de marquage (MBq) et l'activité volumique (MBq/mL) sont ensuite déterminées.

Les trois peptides ont été incubés à des activités volumiques de 0,5, 1 ou 2 MBq/mL sur les cellules SKOV3-E2 pendant 3 ou 24 heures. Après incubation, les cellules sont récupérées, puis lavées une fois au PBS, trypsinisées puis à nouveau lavées deux fois avec du PBS. La radioactivité associée au surnageant initial, aux différentes phases de lavages ainsi qu'au culot cellulaire est déterminée. Le pourcentage de peptide internalisé correspond au rapport de la radioactivité du culot cellulaire sur la somme de la radioactivité des différentes phases. L'axe des ordonnées correspond à l'augmentation de l'internalisation, le pourcentage d'internalisation de GQG est normalisé à 1 (figure 46).



**Figure 46 :** Efficacité d'internalisation des différents peptides.

Les résultats sont comparables à ceux obtenus par cytométrie de flux pour le peptide GDcG dont l'internalisation est 25 fois plus efficace que GQG après 3h d'incubation. Après 24 heures, cette amélioration est deux fois plus faible. Deux phénomènes peuvent expliquer un niveau de radioactivité plus faible dans le culot : soit le peptide est déhalogéné au niveau intracellulaire et l'iode libre est efflué de la cellule ; soit le peptide est dégradé intracellulairement et les fragments sont efflués. Cette dégradation intracellulaire a déjà été évoquée par Fischer et al.<sup>271</sup> pour le peptide Tat. Dans notre étude, l'analyse HPLC des surnageants n'a pas montré la présence d'un quelconque peptide, laissant ainsi ce point d'ombre sans réponse.

Dans ces expériences, l'internalisation du peptide GQDc n'apparaît pas plus efficace que celle obtenue avec Tat, au contraire des résultats obtenus par cytométrie en flux. Pour ces deux études, la seule différence entre les deux peptides est le groupement cholestérol. Cette contradiction pourrait donc s'expliquer par un possible effet synergique ou additif entre la fluorescéine-maléimide et le cholestérol sur l'efficacité d'internalisation de Tat.

Cette quantification a également mis en évidence que seulement un très faible pourcentage de la quantité de peptide initiale est internalisé. Au maximum, ce pourcentage atteint 3 % mais la plupart des valeurs sont bien inférieures à 1 %, rejoignant ainsi celles obtenues par les groupes de Mueller et al.<sup>88</sup> et Burlina et al.<sup>86</sup> Malgré ce faible pourcentage apparent, l'efficacité de Tat à potentialiser l'effet biologique du cargo a été démontrée à de nombreuses reprises comme le décrit le chapitre IV de l'introduction bibliographique. Mais cela signifie aussi que l'efficacité d'internalisation peut encore sans doute être augmentée afin d'atteindre des pourcentages bien plus élevés.

L'augmentation de l'internalisation observée suite au couplage d'un acide gras côté N-terminal d'un CPP pourrait être encore plus élevée si l'acide gras était couplé au milieu de la séquence peptidique, comme le démontrent nos résultats avec le cholestérol. Et pourtant, aucun groupe de recherche n'a étudié plus amplement ce phénomène car comme nous l'avons vu dans le chapitre V de l'introduction bibliographique (paragraphe 3), l'hydrophobisation est dans la plupart des cas réalisée sur la position N-terminale du CPP. Malheureusement, nos investigations concernant ces peptides cholestérylés n'ont pu être poursuivies plus en détail à cause de la difficulté d'obtenir ces peptides en quantité conséquente. En effet, lors de la SPPS, une sous réaction majeure a été identifiée et provoque la formation conséquente de peptides sans cholestérol.

### III Mise en évidence de la formation d'aspartimide

#### 1. Détermination de l'origine de la sous réaction

Cette sous-réaction a été constatée suite à un microclivage du peptide Fmoc-GDcG. L'analyse HPLC du milieu brut a montré la présence de deux pics possédant une absorbance caractéristique du groupement fmoc (figure 40). En théorie, un seul pic « fmocé » devrait être visualisé car seul le peptide ayant la séquence entière possède cette absorbance puisque celle-ci est obtenue uniquement si le dernier résidu (Fmoc-Tyr) est présent dans la séquence. Le pic possédant un tr de 18,6 min est le peptide cholestérylé (analyse MALDI du pic HPLC purifié). Le pic à 12,95 min correspond à deux peptides dont les masses moléculaires sont inférieures à 369 et 387 Da par rapport au peptide parent. Au vu du tr largement inférieur à celui du peptide cholestérylé, ces deux peptides sont moins hydrophobes. Ce ne sont pas des peptides de délétion car après chaque couplage une réaction de capping a été effectuée. D'un point de vue masse moléculaire, une différence de 369 Da pourrait correspondre à la perte du groupement cholestéryle lors d'une hydrolyse de la fonction ester du résidu aspartate, 387 Da correspondrait alors à la perte du cholestéryle et d'une molécule d'eau signifiant probablement la formation d'un composé cyclique au sein de la séquence peptidique.

Afin de limiter cette sous réaction et surtout d'en déterminer l'origine, différentes conditions de clivages avec un pourcentage en TFA plus faible (jusqu'à 50 % au lieu de 92,5 %) ont alors été testées sur un très grand nombre de peptides cholestérylés ne possédant pas la séquence entière (par exemple Fmoc-RRDcRRRGc) ainsi que sur Fmoc-GDcG et Fmoc-GQDc. Quelle que soit la séquence peptidique cholestérylé clivée, les analyses HPLC associées au MALDI montrent l'obtention en très forte proportion des sous-produits possédant des masses moléculaires inférieures à 369 et 387 Da. Des temps de clivage plus courts donnent les mêmes résultats. Pour chaque clivage, les analyses CCM des phases étherées issues de la précipitation des peptides n'ont pas mis en évidence la présence de cholestérol. Enfin, la haute stabilité de l'aspartate de cholestéryle (synthon **(3)**) au TFA combinés aux résultats précédemment décrits rejettent définitivement l'implication du TFA dans la formation de ces sous produits. Ces faits attestent que la sous réaction a lieu avant le clivage du peptide, soit pendant le couplage des aminoacides sur la résine, soit lors des traitements à la DMF/pipéridine. Il est peu probable que cette sous réaction se produise lors du capping car la solution utilisée est compatible avec des peptides très sensibles à l'acide.<sup>272</sup>

Les analyses HPLC et CCM des surnageants de couplage du synthon cholestérylé et des aminoacides insérés après n'ont pas mis en évidence la libération de cholestérol. D'ailleurs nous avons la possibilité de récupérer de façon conséquente les excès de synthon cholestérylé de la solution de couplage, prouvant ainsi la stabilité du synthon activé durant cette étape. Tous ces résultats excluent la formation de la sous-réaction pendant le couplage des aminoacides. Les sous-produits sont donc très certainement formés pendant le traitement de la résine à la pipéridine.

## 2. Mise en évidence de la sous réaction

Pour confirmer cette hypothèse, l'ensemble des phases de déprotection à la pipéridine a été analysé par CCM lors de la synthèse du peptide H-GDcG-NH<sub>2</sub> (figure 47).



Résine Cys Gly1 Arg1 Arg2 Arg3 Ref chol Dchol Arg4 Arg5 Lys1 Lys2 Arg6 Gly2 Ref Chol

**Figure 47 :** Analyse CCM des phases DMF/pipéridine lors de la synthèse de GDcG.

Cette analyse met en évidence la formation d'une molécule qu'à partir du moment où le résidu aspartate de cholestéryle (Dchol) a été introduit dans la séquence peptidique. Cette molécule possède par ailleurs un Rf (rapport frontal) équivalent à celui du cholestérol de référence. Toutes ces phases de déprotection, analysées par HPLC dans un gradient permettant d'isoler le cholestérol utilisé en référence (tr de 30 min), montrent la présence d'un pic correspondant au cholestérol après l'intégration du résidu aspartate de cholestéryle. Il est clairement établi que le composé visualisé en CCM est le cholestérol et celui-ci est relargué du peptide à chacun des traitements à la pipéridine appliqués après l'incorporation de DChol (figure 47).

L'origine de la perte de cholestérol ayant été identifiée, nous avons voulu la quantifier. Pour cela, différentes quantités de cholestérol (entre 50 et 200 nmol) ont été injectées en HPLC. Nous avons obtenu une droite de calibration pour quantifier avec exactitude ( $R^2$  supérieur à

0,994) le nombre de moles de cholestérol injecté à partir de son aire sous le pic HPLC. Les analyses HPLC effectuées à chaque étape de déprotection nous ont permis de calculer la quantité de cholestérol clivé (tableau 17). La séquence peptidique utilisée pour cette étude est **YGRKKRRDcRRRGC** et les résultats correspondent aux traitements des résidus en gras par la pipéridine dans la DMF.

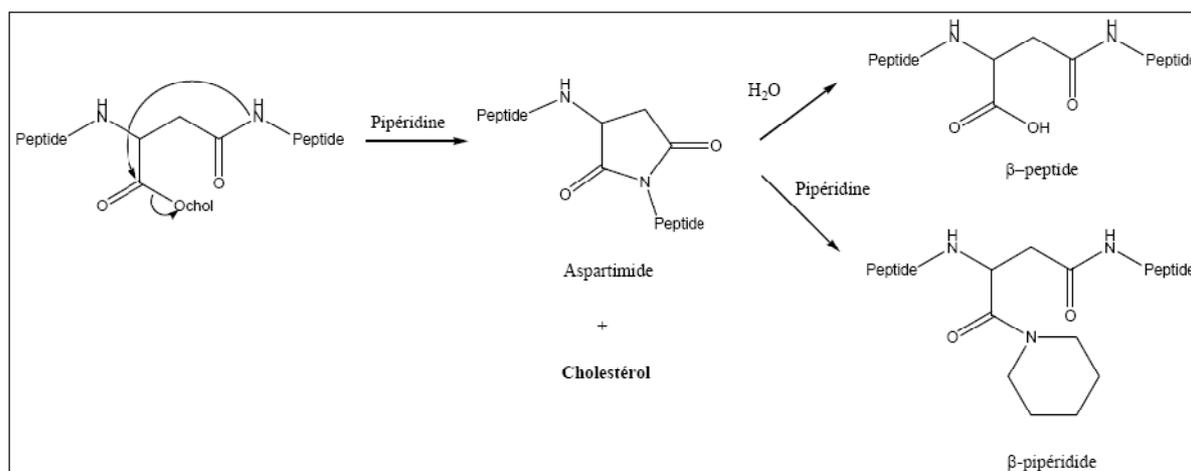
Résidu déprotégé	n cholestérol clivé (μmol)	Cumul (μmol)
Dchol	7,82	7,82
R	10,64	18,46
R	8,84	27,30
K	7,34	34,64
K	5,45	40,09
R	4,15	44,24
G	4,21	48,45
Y	2,3	50,75

**Tableau 17** : Quantification de la perte de cholestérol à chaque étape de déprotection.

Il apparaît que plus de 50 μmol de cholestérol ont été clivés lors des traitements à la pipéridine du peptide pour une quantité finale de peptide de 68 μmol, déterminée par le dosage de l'adduit dibenzofulvène lors de la déprotection du fmoc de la tyrosine N-terminale. Cela signifie que 75 % du peptide n'est plus cholestérylé. Le traitement à la pipéridine, étape évidemment indispensable dans la SPPS de nos peptides, induit donc bien la perte importante de cholestérol.

Cette sous-réaction est inhérente au résidu aspartate et porte le nom de formation d'aspartimide.<sup>273,274,275</sup> La pipéridine va déprotonner l'amine secondaire du résidu situé côté C-terminal de l'aspartate ce qui résulte en la formation d'un cycle à 5 centres, l'aspartimide. Cette cyclisation a pour conséquence le clivage du cholestérol du peptide (figure 48). Enfin, les nucléophiles présents (H<sub>2</sub>O et pipéridine), suite à une attaque nucléophile sur l'un des deux carbonyles de l'aspartamide, amènent la formation d'α et β-peptides ainsi que d'α et β-pipéridides. Pour plus de clarté, la figure 48 ne montre que la formation des molécules β. Concernant nos synthèses, les pertes de 369 et 387 Da préalablement observés correspondent à la formation des peptides (α et β) et de l'aspartimide, respectivement. Dans certains cas, les

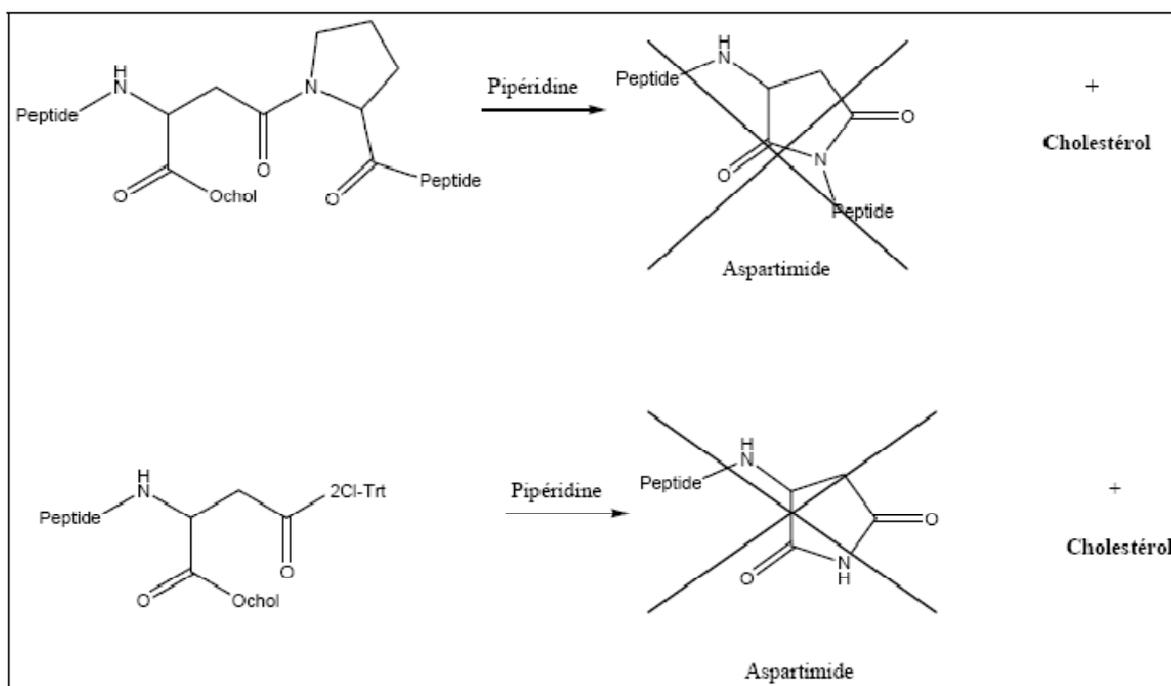
pipéridides ( $\alpha$  et  $\beta$ ) sont également détectés lors des analyses MALDI.



**Figure 48 :** Formation de l'aspartimide conduisant aux sous produits.

Cette sous réaction a été largement décrite pour des peptides contenant la séquence -Asp-Gly-<sup>276</sup> Elle a également été observée avec plusieurs autres résidus, notamment Arg et Cys,<sup>277</sup> acides aminés localisés en C-terminal de notre synthon cholestérylé. Lauer et al.<sup>278</sup> ont montré que l'utilisation d'un résidu  $\beta$ -Asp, du même type que notre synthon DChol, augmente la formation d'aspartimide d'un facteur deux comparé à un  $\alpha$ -Asp conventionnel. Ceci illustre les raisons de l'obtention en proportion élevée de la forme décholestérylé de notre peptide. La formation d'aspartimide et, en conséquence de peptide non cholestérylé (généralement entre 75 et 85 % du peptide total), a été confirmée par analyses HPLC et MALDI-Tof pour tous les peptides ainsi que par LC/MS pour certains d'entre eux (Fmoc-GDcG, Fmoc-DcQG). Des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MALDI-Tof/Tof) ont confirmé la formation d'aspartimide, de peptides ( $\alpha$  et  $\beta$ ) non cholestérylés et de pipéridides ( $\alpha$  et  $\beta$ ) pour le peptide Fmoc-R<sub>3</sub>DcholC.

Pour éviter la formation d'aspartimide, l'ajout d'une proline en C-terminal du résidu Dchol, ou le couplage direct du résidu Dchol sur une résine 2Cl-Trt sont des méthodes alternatives puisqu'aucune amine secondaire n'est présente pour former le cycle à 5 centres (figure 49). Nous avons pu vérifier dans ces conditions l'absence d'aspartimide mais nous n'avons pas eu le temps d'appliquer cette stratégie lors de nouvelles synthèses de peptides cholestérylés.



**Figure 49 :** Inhibition de la formation d’aspartimide.

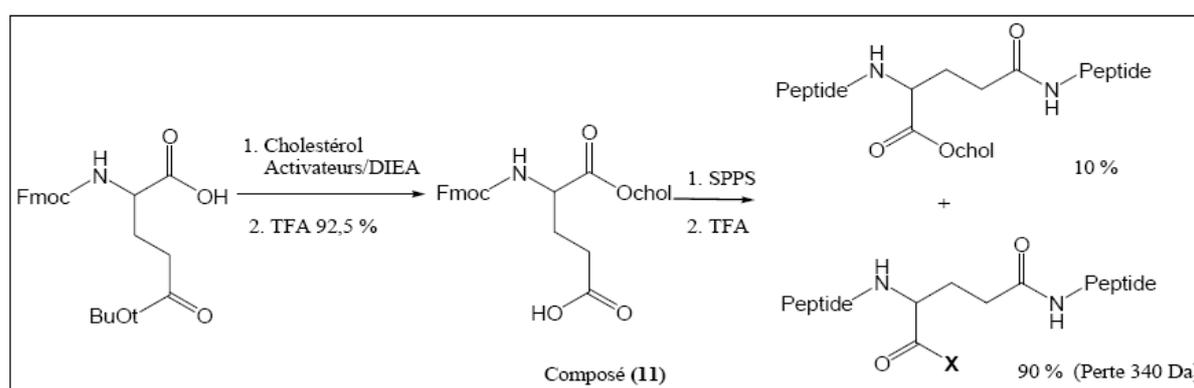
La synthèse des peptides dicholestérylés a été réalisée avec un synthétiseur automatique à microondes, ce qui permet par chauffage une augmentation des vitesses des réactions de déprotection, de couplage et conduit habituellement à un meilleur rendement de synthèse. Toutefois, l’utilisation de microondes accélère également la formation d’aspartimide.<sup>279</sup> Ceci peut expliquer pourquoi nous n’avons pu obtenir des peptides dicholestérylés lors de ces synthèses. Les aspartimides étaient vraisemblablement déjà formés avant même le clivage final du peptide. Comme nous l’avons vu précédemment, tout changement des conditions de clivage auraient conduit au même résultat. Nous n’avons donc pas obtenu les peptides doublement cholestérylés avec cette stratégie de synthèse.

### 3. Changements de stratégie de synthèse

L’identification de cette réaction parasite nous a poussé à changer de stratégie de synthèse. Pour éviter la formation de l’aspartimide et le clivage du cholestérol comme précédemment décrit, nous avons utilisé de l’acide glutamique comme l’acide aspartique lors de la synthèse du synthon (3). Nous avons réalisé l’estérification de sa fonction acide  $\alpha$  par du cholestérol suivie d’une déprotection de la fonction acide de la chaîne latérale. Le composé (11) possède

alors un méthylène de plus que le synthon (**3**), c'est un  $\gamma$ -aminoacide (figure 50), ce qui devrait défavoriser la formation d'aspartimide comme détaillé préalablement. Ce synthon, obtenu avec une pureté supérieure à 95 % pour un rendement global de 60 %, a été caractérisé par HPLC et MALDI. Deux peptides ont alors été synthétisés, le terme Ec désignant le résidu (**11**) intégré dans la séquence peptidique : Fmoc-EcR<sub>3</sub>GC-NH<sub>2</sub> et Fmoc-RREcR<sub>3</sub>GC-NH<sub>2</sub>. En cours d'assemblage, pour vérifier la stabilité du cholestérol sur les deux peptides, un premier microclivage a été effectué avec deux solutions contenant un pourcentage de TFA différent (soit 92,5 %, soit 50 %).

Les analyses HPLC, associées aux spectres MALDI, ont montré la formation d'un nouveau sous produit en proportion largement majoritaire (environ 90 %) quel que soit le pourcentage de TFA appliqué. Ce sous produit est obtenu avec les deux peptides et possède une masse moléculaire inférieure de 340 Da à celle attendue (figure 50). La spectrométrie de masse en tandem a permis de confirmer que la perte de 340 Da se situait au niveau du résidu glutamate.



**Figure 50** : Synthèse du composé (**11**) ainsi que son utilisation en SPPS.

Toutefois, le peptide Fmoc-EcR<sub>3</sub>GC-NH<sub>2</sub> n'a subi aucun traitement à la pipéridine après l'insertion du composé (**11**). La présence du sous produit permet donc d'affirmer que la pipéridine n'est pas la cause de cette perte de 340 Da. Le clivage des peptides avec deux solutions différentes de TFA génère le même degré de perte de cholestérol excluant à priori le TFA à l'origine de cette sous-réaction. Nous avons également vérifié que le composé (**11**) n'était pas dégradé par un traitement à l'acide acétique (DCM/TFE/AcOH 6/2/2 (v/v/v)) dans le cas où le peptide était assemblé sur résine chlorotriptyl (Cl-Trt) : Cependant, même dans ces conditions, les analyses HPLC et MALDI indiquent la formation d'un produit en très grande majorité de masse moléculaire inférieure de 340 Da par rapport à celle attendue. Nous pouvons donc en conclure que le clivage du peptide cholestérylé de son support n'est pas à

l'origine de cette sous-réaction. Enfin, des analyses HPLC des surnageants de couplage confirment que le synthon (**11**) n'est pas dégradé lors du couplage.

Au travers de ces résultats, nous pouvons faire un premier récapitulatif :

- le sous produit n'est pas formé lors du couplage du synthon cholestérylé (pur à plus de 95 %) sur le peptide.
- la pipéridine n'est pas impliquée puisqu'un peptide n'ayant pas subi de traitement à la pipéridine présente la même perte de 340 Da.
- le TFA n'influe pas sur la formation du sous produit car il est également obtenu avec une autre résine qui se clive avec une solution de 20 % en acide acétique, un acide 100 000 fois plus faible que le TFA.
- aucun composé cyclique n'a été détecté lors des différentes analyses par MALDI.
- le séquençage des peptides par spectrométrie de masse en tandem a mis en évidence que la délétion de 340 Da est produite au niveau du résidu glutamate.

Mais cette perte de 340 Da n'a pas uniquement été observée lors de l'utilisation du glutamate de cholestéryle (**11**). En effet, lors des nouvelles SPPS de peptides contenant la séquence Dchol-Pro (pour éviter la formation d'aspartimides), les analyses HPLC montraient à notre plus grande surprise la présence de deux composés possédant un groupement fmoc dont un affichant encore une masse de 340 Da de moins. Cette perte n'avait pourtant jamais été observée lors de la caractérisation de la formation d'aspartimides en utilisant l'Asp-Chol. Enfin, cette sous-réaction n'est pas liée au groupement cholestéryle car un peptide Tat possédant un groupement myristoylé en position centrale dans sa séquence synthétisé comme contrôle donne la même perte de masse. En effet, nous avons utilisé la même stratégie qui sera développée dans le chapitre IV en remplaçant le cholestérol par le tétradécanol, obtenant ainsi le synthon Fmoc-Cys(AcOC<sub>14</sub>)-OH. Trois peptides ont été synthétisés puis un microclivage a été effectué. Les analyses HPLC associées au MALDI ont mis en évidence la formation de peptides suivant le même type de sous-réaction et dans des proportions supérieures à 95 %. Le tableau 18 résume l'ensemble des résultats obtenus ayant rapport à cette perte du groupement hydrophobe.

Synthon de base	Séquence du peptide	Pourcentage de perte
Fmoc-Asp(OH)-OChol	Fmoc-DcholR <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	100 %
	Fmoc-RDcholR <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	100 %
	Fmoc-RRDcholR <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	93 %
	Fmoc-R <sub>3</sub> Dchol-NH <sub>2</sub>	71 %
Fmoc-Asp(OH)-OChol	Fmoc-R <sub>3</sub> DcholP-NH <sub>2</sub>	41 %
	Fmoc-DcholPR <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	95 %
	Fmoc-RDcholPR <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	95 %
	Fmoc-RRDcholPR <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	95 %
Fmoc-Glu(OH)-OChol	Fmoc-EcholR <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	90 %
	Fmoc-RREcholR <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	90 %
Fmoc-Cys(AcOC <sub>14</sub> )-OH	Fmoc-CC <sub>14</sub> R <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	95 %
	Fmoc-RC <sub>14</sub> R <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	95 %
	Fmoc-RRCC <sub>14</sub> R <sub>3</sub> GC-NH <sub>2</sub>	95 %

**Tableau 18 :** Récapitulatif des résultats concernant la perte du groupement hydrophobe.

Ce tableau montre que cette sous réaction n'est pas dépendante du synthon utilisé (Asp, Glu, Cys) ni du groupement hydrophobe qu'il contient (cholestérol ou tétradécanol). Nous pouvons toutefois remarquer que la position du synthon hydrophobe dans la séquence a une légère influence. La proportion de sous produit est moindre lorsque le groupement hydrophobe est côté C-terminal (40 et 70 % au lieu de 90-100 %). Au vu de tous ces résultats, il devient alors très compliqué de déterminer la cause exacte de cette sous réaction. Elle pourrait provenir d'un remplacement du groupement cholestéryle (ou myristoyle) par un éthyle. Mais cela reste une supposition car l'origine de cette perte n'a pas été définie. Une stratégie aurait été de synthétiser les mêmes synthons où le groupement hydrophobe aurait été remplacé par un éthyle, puis d'intégrer ces synthons aux mêmes endroits dans la séquence peptidique que les peptides représentés au tableau 18. La comparaison des analyses HPLC et MALDI (MS et MS/MS) entre les peptides éthylés et ceux présentant cette sous-réaction aurait alors pu confirmer cette supposition.

Nous avons alors adopté une stratégie de synthèse alternative inspirée des travaux d'Ingallinella et al.<sup>268</sup> sur un peptide cholestérylé pour inhiber la réplication virale de HIV-1. Après synthèse du peptide antiviral, le peptide a été hydrophobisé en solution au travers d'une

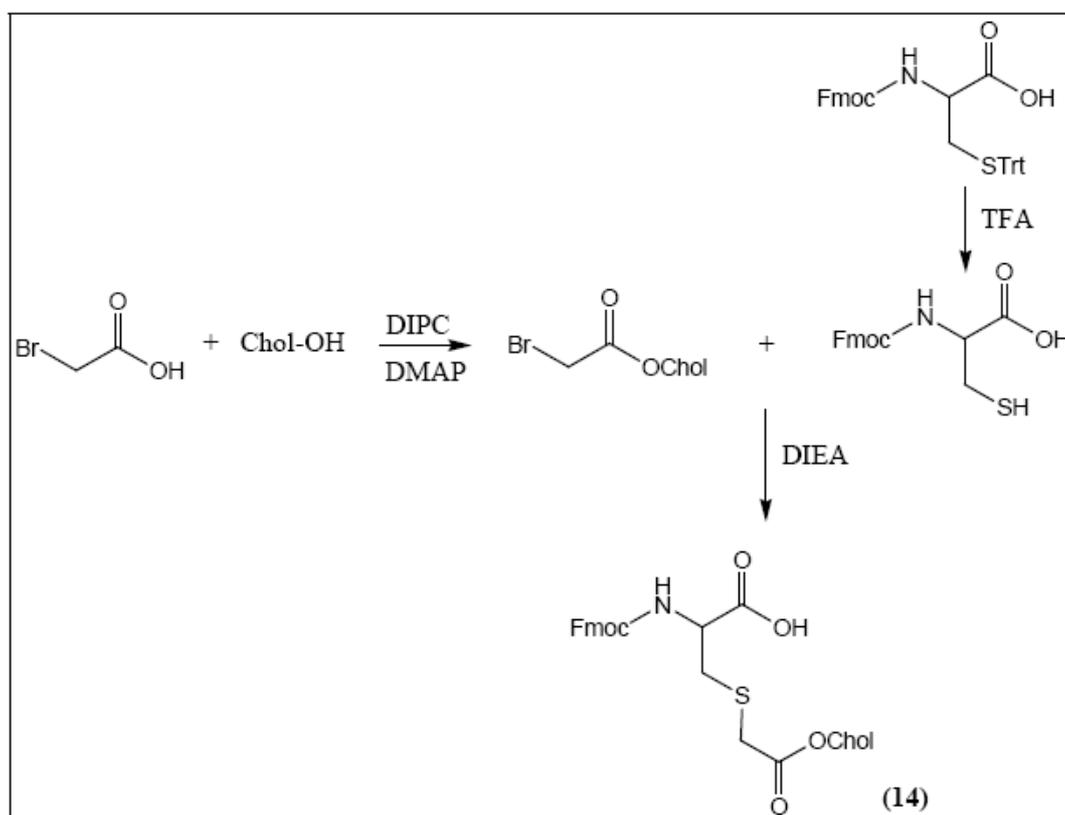
réaction spécifique entre la fonction thiol du peptide et le 2-bromoacétate de cholestéryle.

## IV Synthèse de peptides cholestérylés de seconde génération

### 1. Synthèse du synthon cholestérylé

Le cholestérol est mis en réaction avec de l'acide 2-bromoacétique pour former le 2-bromoacétate de cholestéryle et l'évolution est suivie par CCM. Après 48 heures de couplage, l'ester obtenu est purifié par colonne chromatographique sur silice avec un rendement de 83 %.

Parallèlement une cystéine protégée sur ses fonctions amine par un groupement Fmoc et thiol par un trityl (disponible commercialement) est traitée une heure au TFA afin de déprotéger sélectivement la fonction thiol (figure 51). La réaction est quantitative et le produit est purifié par précipitation dans l'eau. Cet acide aminé réagit alors avec le 2-bromoacétate de cholestéryle pour former le composé **(14)**. Une heure de couplage suffit pour obtenir la complétion de la réaction. La molécule **(14)**, obtenue avec un rendement global de 83 %, a été caractérisée par HPLC, MALDI et servira de synthon de base pour la synthèse des nouveaux peptides cholestérylés.



**Figure 51** : Schéma de synthèse du synthon **(14)**.

## 2. Synthèses des peptides cholestérylés

Tous les peptides monocholestérylés ont été assemblés manuellement par SPPS sur une résine « rink amide ». Après clivage et déprotection des différents peptides avec une solution de 92,5 % de TFA, les peptides ont été purifiés par chromatographie semi-préparative puis caractérisés par HPLC, MALDI et quantifiés par dosage spectrophotométrique (absorbance du résidu Tyr et dosage des fonctions thiols de la cystéine C-terminale). Voici les séquences et l'acronyme des peptides utilisés dans ce chapitre. Le terme Cc correspond à la cystéine cholestérylée (**14**) une fois intégrée dans la séquence peptidique.

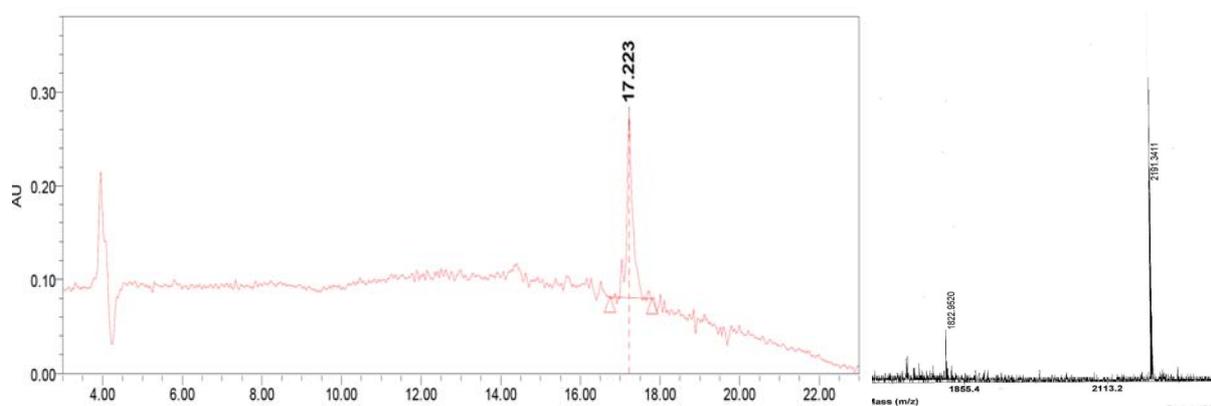
Composé (**4**) : GQG YGRKKRRQRRRG

Composé (**15**) : GQCc YGRKKRRQRRRCcC

Composé (**16**) : GCcG YGRKKRRCcRRRG

Composé (**17**) : CcQG YCcRKKRRQRRRG

Tous les peptides ont été isolés avec une pureté de 100 %. La figure 51 montre le chromatogramme HPLC et le spectre MALDI associé du peptide H-GQCc-NH<sub>2</sub>.



**Figure 52** : Caractérisation HPLC et MALDI de GQCc.

## 3. Marquage des peptides à la fluorescéine diacétate

La fluorescéine diacétate (FDA) est couramment utilisée en association avec l'iodure de propidium (IP) pour mesurer des viabilités cellulaires.<sup>280,281,282</sup> La FDA est un ester non polaire et non fluorescent qui traverse facilement la membrane plasmique des cellules, au contraire de la fluorescéine qui est une molécule polaire non internalisée. Une fois dans le

milieu intracellulaire, la FDA est hydrolysée par des estérases pour générer de la fluorescéine, réaction connue sous le terme de fluorochromasia.<sup>283</sup> La fluorescence est ainsi détectée uniquement dans des cellules vivantes. L'IP ne marque que les cellules mortes qui présentent des pores membranaires. Ainsi, par FACS ou microscopie de fluorescence, il est possible de distinguer les cellules vivantes (fluorescence verte) des cellules mortes (fluorescence rouge).<sup>284</sup>

La détection par FACS de fluorescéine uniquement dans des cellules vivantes nous permettra d'exclure la possibilité d'une internalisation plus efficace due à la formation de pores membranaires. Peu d'études sur les CPP ont été réalisées avec la FDA, Futaki et al.<sup>285</sup> avec le peptide Tat, Mizuno et al.<sup>270</sup> avec un polymère d'arginine. Mais ce fluorophore n'a jamais été utilisé avec des peptides hydrophobisés, ce qui confère une fois de plus un caractère original à notre étude.

Pour le marquage des peptides, notre choix s'est porté sur le maléimide-FDA. Mais le protocole décrit par Vivès et al.<sup>269</sup> n'a pu être appliqué avec succès. En effet, nous avons observé un clivage abiotique de la FDA dans le milieu de marquage, une solution tampon de Tris-HCl 100 mM pH 7, conduisant à la formation de fluorescéine (milieu de couplage jaune fluorescent) et au relargage d'ions acétyles dans le milieu. Suite à une recherche bibliographique spécifique, il est apparu que cette hydrolyse indésirée avait uniquement été décrite par Clarke et al.<sup>286</sup> Les analyses par MALDI ont mis en évidence que le peptide n'est pas marqué à la fluorescéine mais les acétyles générés lors du clivage abiotique de la FDA réagissent avec le peptide (jusqu'à cinq acétyles par peptide). De ce fait, le peptide ne peut être réutilisé pour un nouveau marquage à la FDA ou pour une autre application du fait de sa structure multiacétylée.

Alternativement, nous avons alors suivi le protocole décrit par Futaki et al.<sup>285</sup> 1,5 eq. de FDA dissous dans un volume de DMF et 1 eq. de peptide dissous dans deux volumes de méthanol sont mélangées. Après 24 heures de réaction à température ambiante et à l'abri de la lumière, le peptide est purifié par précipitation à l'acétone. Les peptides-FDA ont été incubés avec des extraits cellulaires bruts afin de vérifier leurs sensibilités aux estérases. Grâce à cette méthode, nous avons pu quantifier de façon exacte la quantité de peptide-FDA et déterminer les rendements de marquages, qui se situent entre 60 et 100 % selon les peptides.

#### 4. Difficultés de synthèse

Plusieurs difficultés rencontrées à certains endroits dans la synthèse ont considérablement retardé l'avancement du projet. La première est l'incorporation du résidu Fmoc-Cys(AcOChol)-OH lors de la SPPS. En effet, afin d'obtenir un rendement de couplage convenable (supérieur à 80 %), il a fallu pour la plupart des synthèses plusieurs jours de couplage, en utilisant jusqu'à 10 excès d'acide aminé et en réalisant des « quadruples couplages ». L'acide aminé cholestérylé étant difficilement soluble dans la DMF, 10 à 20 % de DCM ont alors été rajoutés. La solubilité est alors grandement augmentée mais la cinétique de couplage reste toujours inchangée. Pourtant des acides aminés commerciaux comme Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH et Fmoc-Gly-OH sont couplés quantitativement en moins de deux heures sur la même résine portant la même séquence peptidique. La seule hypothèse pour expliquer ce phénomène est peut être que l'encombrement stérique du résidu engendré par le cholestérol conduit à un mauvais couplage, même si les résidus cholestérylés à base d'acides aspartique (Dchol) et glutamique (Echol) avaient un rendement d'incorporation quantitatif lors des précédentes SPPS. Ces faibles efficacités de couplages sont une des causes expliquant le rendement final modeste de la synthèse du peptide sur la résine. Les dosages spectrophotométriques du dibenzofulvène issu de la déprotection du fmoc du résidu côté N-terminal ainsi que ceux de la tyrosine présent sur le peptide après clivage montrent qu'en moyenne, les peptides CcQG, GCcG et GQCc sont obtenus avec un rendement brut de 60, 41 et 22 %, respectivement.

Le second point est le rendement de purification des peptides monocholestérylés. Après purification sur colonne semi-préparative, les fonctions thiols de la cystéine C-terminale présentes sur le peptide purifié ont été dosées grâce au réactif d'Ellman. Le dosage spectrophotométrique du résidu Tyr a également été réalisé. Les valeurs obtenues sur ces peptides purifiés, comparées à la quantité déterminée sur les peptides bruts, nous ont permis d'évaluer que seulement 10 à 20 % de la quantité attendue est récupérée. Il est difficile d'expliquer ces faibles rendements de purification car ceux-ci étaient nettement plus élevés lors des purifications des peptides à base d'aspartate de cholestéryle (en moyenne, supérieurs à 80 %). Nous avons alors envisagé une possible rétention des peptides sur les colonnes HPLC. Lors d'analyse HPLC, la quantité de fonctions thiols de peptide est identique avant injection et après récupération en sortie de colonne, excluant une rétention sur la colonne

analytique C<sub>4</sub>. Mais ceci n'a pas été réalisé avec la colonne semi-préparative et pourrait être à l'origine de ces rendements peu élevés.

Le troisième et dernier point provient de la stratégie de synthèse. Une nouvelle fois, une sous réaction se produit lors de la synthèse ou du clivage du peptide. Le sous produit est généré par l'hydrolyse de la liaison ester reliant le cholestérol au peptide, sans passer par la formation d'un composé cyclique comme constaté avec l'aspartate de cholestéryle puisqu'aucun signal de ce type n'a été enregistré sur les spectres MALDI. Ce sous produit obtenu n'est donc plus cholestérylé et sa proportion, comparé au peptide hydrophobe, varie selon la position du cholestérol dans la séquence. En moyenne, un ratio 50/50 est obtenu avec les peptides CcQG et GQCc. Mais pour GCcG, le sous produit est présent à hauteur de 80 %. Comme il a été décrit précédemment dans la chapitre III de cette partie, toutes les phases de couplage, de capping, de déprotection issues des différentes SPPS ainsi que les phases étherées issues des clivages des résines ont été analysées par CCM et par HPLC pour la plupart. Lors de ces analyses, aucun signal ne correspondait aux caractéristiques du cholestérol. Cependant, les analyses CCM des phases étherées montrent la présence d'un composé possédant un R<sub>f</sub> proche de celui du cholestadiène, un composé généré par hydrolyse acide du cholestérol.<sup>287</sup> Les analyses HPLC de ces phases n'ont pas mis en évidence la présence de cholestadiène. La nature moléculaire de ce sous-produit n'a donc pu être déterminée de façon non équivoque. Le traitement du peptide au TFA reste une piste privilégiée car la liaison ester est acidolabile mais ceci reste à être confirmé.

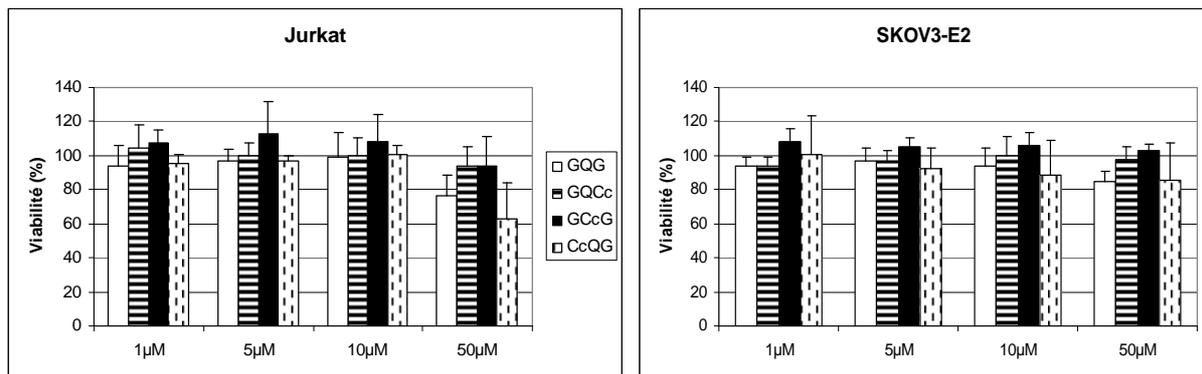
Cette formation de sous produit est également apparue lors de la synthèse des peptides dicholestérylés. Les analyses HPLC combinées au MALDI ont mis en évidence la présence de peptides sans cholestérol ou n'en possédant qu'un seul.

Ces trois points ont fait grandement chuter le rendement final en peptide cholestérylé. En moyenne, sur 70-80  $\mu\text{mol}$  de peptide attendu, seulement 2 à 4  $\mu\text{mol}$  sont obtenus. Cette stratégie doit donc encore être largement optimisée.

## V Evaluation biologiques *in vitro* des nouveaux peptides

### 1. Détermination de la cytotoxicité des peptides

De la même manière que pour les précédents peptides, nous avons évalué la cytotoxicité des « nouveaux » peptides par un test MTS. Les résultats pour les deux types cellulaires Jurkat et SKOV3-E2 sont montrés sur la figure 53.

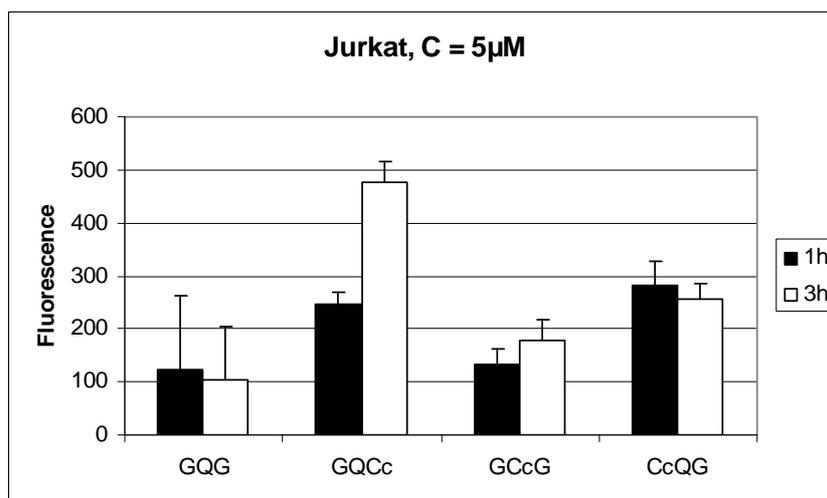


**Figure 53 :** Cytotoxicité des différents peptides sur les deux lignées cellulaires.

Les peptides GQCc et GCcG ne montrent aucune toxicité jusqu'à 50 µM, au contraire de GQG et CcQG qui induisent une diminution de la viabilité cellulaire de l'ordre de 22 et 38 % respectivement. On peut également constater que la forte diminution (baisse de 60 %) de la viabilité induite par GDcG constatée préalablement sur les cellules Jurkat ne se reproduit pas ici avec GCcG. Ceci dénote probablement que de faibles changements structuraux dans les peptides synthétisés peuvent avoir des effets relativement différents dans les mêmes conditions d'évaluation. Ces observations mériteraient d'être plus profondément étudiées dans l'avenir.

### 2. Evaluation de l'internalisation par cytométrie de flux

L'internalisation des peptides-FDA a été évaluée par cytométrie de flux. Il a été mis en évidence une nouvelle fois que l'internalisation des quatre peptides est dose-dépendante. La figure 54 montre les résultats suite à l'incubation de cellules Jurkat avec les peptides à la concentration de 5 µM pendant une ou trois heures.

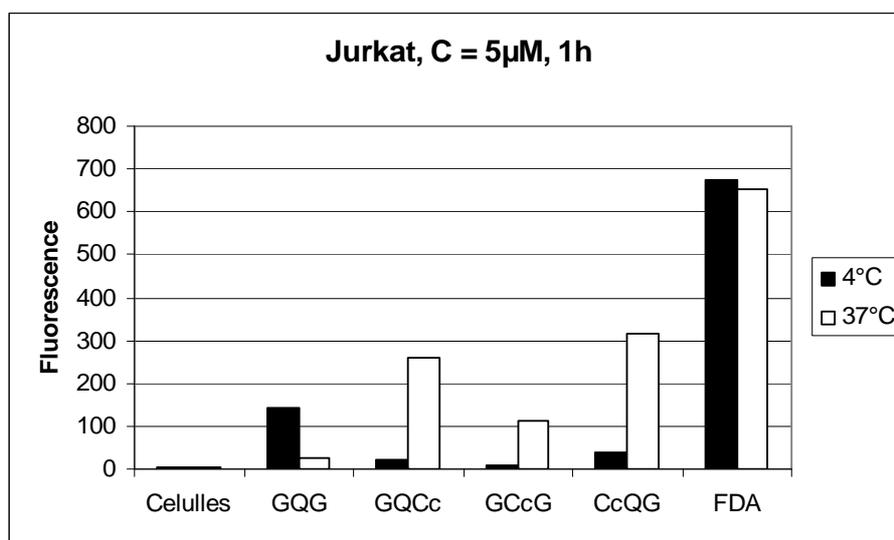


**Figure 54 :** Evaluation de l'internalisation des peptides-FDA par FACS.

Le peptide GQCc montre la même tendance que celle du peptide GQDc, à savoir que le peptide cholestérylé est plus efficace que le peptide GQG natif. Le peptide CcQG montre peu de différences avec GQCc après une heure d'incubation. Par contre après trois heures, le peptide CcQG est deux fois moins internalisé que GQCc. La position du groupement hydrophobe en N- ou C-terminal pourrait influencer sur l'efficacité ou la cinétique d'internalisation. Mais le résultat le plus surprenant concerne le peptide GCcG possédant le cholestérol au sein de la séquence. L'augmentation d'internalisation du peptide GDcG d'un facteur 30 en comparaison à Tat natif précédemment obtenue n'est cependant pas reproduite dans ces expériences. Les deux peptides GQG et GCcG donnent en effet un signal équivalent. On peut toutefois noter une variabilité dans l'internalisation de Tat GQG nettement supérieure à celles obtenues pour les trois autres peptides.

L'incubation des peptides à une concentration de 5 µM pendant une heure sur des cellules Jurkat a mis en évidence que pour les peptides cholestérylés, l'internalisation à 4°C est dix fois plus faible qu'à 37°C (figure 55). Ceci confirme un mécanisme d'internalisation énergie-dépendant des peptides. Par contre, pour le peptide natif Tat, l'internalisation à 4°C est six fois supérieure qu'à 37°C. Ceci a déjà été observé par Al-Taei et al.<sup>288</sup> L'analyse de cellules de leucémie humaine par microscopie de fluorescence a montré que, après incubation d'Alexa488-R<sub>8</sub> à 1 µM pendant 60 min, la fluorescence associée aux cellules est plus forte à 4°C qu'à 37°C. Polyakov et al.<sup>201</sup> ont montré que l'accumulation de [<sup>99m</sup>Tc]-Tat dans des cellules Jurkat est deux fois plus efficace à 4°C qu'à 37°C. La possibilité d'un mécanisme par translocation directe a seulement été évoquée par Polyakov. L'internalisation très efficace de

la FDA n'est pas affectée par la température, justifiant ainsi son utilisation comme marqueur de viabilité cellulaire. Toutefois, ces résultats acquis en fin de thèse restent à être vérifiés et reproduits sur un plus grand nombre d'expérience. De plus, cette unique étude montre une internalisation du peptide GCcG environ trois fois supérieure à celle de Tat GQG à 37°C, au contraire des résultats précédemment décrits pour ces deux peptides.



**Figure 55 :** Effet de la température sur l'internalisation des peptides-FDA.

Concernant la non reproductibilité de l'effet bénéfique induit par la position centrale du cholestérol dans la séquence, elle est très certainement dûe à la différence de structure entre les peptides de première et de seconde générations. En effet, le synthon cholestérylé utilisé est différent par rapport à celui utilisé lors des premiers tests biologiques (Fmoc-Asp(OH)-Chol ou Fmoc-Cys(AcOChol)-OH), ainsi que le fluorophore (Fluorescéine ou FDA). Pourtant, une internalisation supérieure de **GQDc-FM** comparé au peptide Tat est également obtenue avec **GQCc-FDA**, ce qui laisse présager que les différences entre les deux synthons et les deux fluorophores n'ont pas réellement d'effets sur l'efficacité de l'internalisation. D'autres investigations doivent être menées dans ce sens afin de comprendre pourquoi le peptide GCcG n'est pas plus efficace. Afin de répondre à cette question, un marquage des peptides à la fluorescéine maléimide ainsi qu'un radiomarquage à l'iode 125 ont été entrepris, sans succès et sans avoir pu être reproduit. La nécessité d'obtenir ces différents peptides est cruciale pour la suite du projet. GCcG-FM possédera alors le même fluorophore que GDcG-FM utilisé lors des premiers tests biologiques, excluant ainsi un effet de la FDA sur cette diminution de l'internalisation. Puis l'internalisation de I<sup>125</sup>-GCcG sera quantifiée de manière

précise grâce à la mesure de la radioactivité du culot cellulaire. Grâce à ces deux techniques, il sera alors possible de confirmer si l'ajout de cholestérol en position centrale engendre la meilleure augmentation de l'internalisation du peptide Tat.

## Conclusions et Perspectives

Les résultats obtenus avec les peptides de première génération montrent que la position relative du cholestérol est cruciale. L'ajout de cholestérol en position latérale, côté C-terminale, n'améliore pas l'efficacité d'internalisation. Par contre, l'ajout en position centrale permet d'augmenter l'efficacité d'internalisation d'un facteur 30. Des résultats identiques ont été obtenus avec les deux lignées de cellules testées (SKOV-3 et Jurkat). Ces premiers résultats très encourageants démontrent clairement que le cholestérol permet d'augmenter l'efficacité d'internalisation de Tat, ceci en proportion non négligeable. Mais le point essentiel de cette première étude est que les meilleurs résultats sont obtenus avec le cholestérol en position centrale. Pour rappel, cette position n'a jamais été évaluée avec Tat.

De plus, les tests de cytotoxicité ont montré que les peptides hydrophobisés, et ce pour des concentrations allant jusqu'à 20  $\mu\text{M}$ , ne sont pas plus toxiques que le peptide Tat natif. Ceci est valable pour les deux types de cellules précédemment utilisés : SKOV-3 et Jurkat.

Ainsi, ces évaluations de l'internalisation du peptide contenant un cholestéryle en position centrale (position novatrice) montrent des résultats vraiment très prometteurs. Mais lors de la synthèse des peptides sur phase solide, une sous réaction majeure a été identifiée et celle-ci diminue fortement la production en grande quantité de peptides cholestérylés. Cette sous réaction est la formation d'un sous-produit cyclique (aspartimide) lors de la SPPS. Après chaque incorporation d'un acide aminé, il faut déprotéger sélectivement la fonction amine afin de coupler l'acide aminé suivant. Pour se faire, une solution de pipéridine est utilisée. La répétition de cette étape indispensable de déprotection favorise la production de ce sous-produit conduisant à la perte du groupement cholestéryle précédemment introduit dans la séquence du peptide, et ceci en forte proportion (jusqu'à 85%).

Pour contourner ce problème, un nouvel acide aminé a été développé. La base de cette nouvelle molécule est la cystéine. Un groupement acétate (Ac) a également été introduit entre le cholestérol et la fonction thiol de la chaîne latérale de la cystéine, afin d'éviter la cyclisation conduisant à la perte du groupement cholestéryle. Il est intéressant de noter que ce deuxième synthon, comme pour le premier, n'a jamais été synthétisé et a été conçu pour être intégré à n'importe quelle position dans une séquence peptidique.

Tous les peptides monocholestérylés, de seconde génération, ont été synthétisés et entièrement caractérisés (HPLC, MALDI-Tof et dosages spectrophotométriques). Les premiers résultats concernant ces peptides ont montré qu'ils ne sont pas cytotoxiques envers les cellules SKOV-3 et Jurkat, à des concentrations allant jusqu'à 50  $\mu$ M. Les études d'internalisation par cytométrie en flux ont une nouvelle fois montré un effet bénéfique du cholestérol sur Tat, sans toutefois reproduire le résultat obtenu avec le peptide de première génération possédant le cholestérol en position centrale. Au vu du caractère peu commun du fluorophore utilisé (nécessité d'une hydrolyse enzymatique intracellulaire pour obtenir une fluorescence du peptide), ces résultats doivent être confirmés avec un fluorophore plus conventionnel comme la fluorescéine-maléimide. Une quantification absolue de l'internalisation des différents peptides radiomarqués serait bénéfique pour cette démonstration.

De plus, l'incorporation d'un groupement myristoylé au sein de la séquence de Tat a été envisagée. Ces peptides myristoylés serviront de contrôle afin de démontrer de manière non équivoque l'efficacité supérieure du cholestérol comparé au groupement myristoylé. Cela prouvera alors que l'utilisation du cholestérol est préférable à un acide gras linéaire « classique ».

La validation ultime de l'efficacité de ces nouveaux CPPs sera apportée par leur couplage à une molécule comme la doxorubicine permettant d'obtenir une réponse biologique sur plusieurs lignées de cellules tumorales, y compris sur des lignées doxorubicine-résistantes. Pour ce faire, l'effet thérapeutique des différents CPPs couplés à la doxorubicine pourra être évalué *in vivo*. La réponse biologique issue de l'action de la doxorubicine sur les cellules tumorales pourra être corrélée avec l'efficacité d'internalisation supérieure de ces nouveaux CPPs. De plus, l'aspécificité cellulaire de Tat envers la tumeur n'est pas un facteur limitant. L'incorporation de doxorubicine couplée aux différents CPPs dans des nanoparticules fissibles par ultrason est envisageable afin d'obtenir une délivrance spécifique du complexe Dox-CPP au niveau tumorale. Les ultrasons permettent également d'augmenter l'effet biologique de la drogue au niveau de la tumeur (membrane plasmique tumorale altérée).

Enfin, la principale difficulté rencontrée lors de ces travaux a été de surmonter les problèmes liés à la perte de cholestérol lors de la synthèse des peptides. La formation d'aspartimide a bien été décrite pour les premiers peptides, mais pour ceux de seconde génération, la perte de

cholestérol a clairement été définie mais l'étape où se produit cette perte n'a pu être identifiée. Trouver une stratégie de synthèse permettant d'abolir ces problèmes amènerait très certainement à l'obtention des peptides en plus grande quantité et permettrait également l'obtention de peptides multicholestérylés. Le couplage en solution du bromoacétate de cholestéryle sur le peptide Tat préalablement purifié pourrait être la solution à tous ces problèmes de synthèse.

# Matériels et Méthodes

## Synthèses des synthons cholestérylés

### *Synthèse de l'aspartate de cholestéryle*

2 mmoles (1 eq.) de Fmoc-Asp(OtBu)-OH sont dissous dans 4 mL de DMF puis 2,4 mmoles (1,2 eq.) de HOBt et TBTU sont ajoutés ainsi que 5 mmoles (2,5 eq.) de DIEA. D'un autre côté, 5 mmoles (2,5 eq.) de cholestérol sont dissous dans 14 mL de DCM puis les deux solutions sont rassemblées. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v ; révélateur acide phosphomolybdique). Typiquement, la réaction n'évolue plus après 24 heures. La DMF est alors extraite du milieu réactionnel par trois lavages avec 10 mL d'eau ultrapure puis le milieu est concentré grâce à un évaporateur rotatif. Le solide obtenu est redissous dans un minimum de DCM (5 à 7 mL) et le milieu brut est purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v). Chaque fraction est analysée par CCM et celles contenant Fmoc-Asp(OtBu)-Chol sont rassemblées puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le composé pur est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

La fonction acide latérale est alors déprotégée du groupement tBu par un traitement avec une solution de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS 92,5/2,5/5 (v/v/v) pendant une heure (10 mL par gramme d'acide). Le milieu réactionnel est ensuite purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant cyclohexane/AcOEt 1/9 v/v). Chaque fraction est analysée par CCM et celles contenant Fmoc-Asp(OH)-Chol sont rassemblées puis concentrées à l'évaporateur rotatif. L'aspartate de cholestéryle est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Cet acide a ensuite été caractérisé par HPLC et MALDI.

### *Synthèse du glutamate de cholestéryle*

2 mmoles (1 eq.) de Fmoc-Glu(OtBu)-OH sont dissous dans 4 mL de DMF puis 2,4 mmoles (1,2 eq.) de HOBt et TBTU sont ajoutés ainsi que 5 mmoles (2,5 eq.) de DIEA. D'un autre côté, 5 mmoles (2,5 eq.) de cholestérol sont dissous dans 14 mL de DCM puis les deux solutions sont rassemblées. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant cyclohexane/AcOEt 8/2

v/v ; révélateur acide phosphomolybdique). Typiquement, la réaction n'évolue plus après 24 heures. La DMF est alors extraite du milieu réactionnel par trois lavages avec 10 mL d'eau ultrapure puis le milieu est concentré grâce à un évaporateur rotatif. Le solide obtenu est redissous dans un minimum de DCM (5 à 7 mL) et le milieu brut est purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant cyclohexane/AcOEt 8/2 v/v). Chaque fraction est analysée par CCM et celles contenant Fmoc-Glu(OtBu)-Chol sont rassemblées puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le composé pur est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

La fonction acide latérale est alors déprotégée du groupement tBu par un traitement avec une solution de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS 92,5/2,5/5 (v/v/v) pendant une heure (10 mL par gramme d'acide). Le milieu réactionnel est ensuite purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant cyclohexane/AcOEt 1/9 v/v). Chaque fraction est analysée par CCM et celles contenant Fmoc-Glu(OH)-Chol sont rassemblées puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le glutamate de cholestéryle est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Cet acide a ensuite été caractérisé par HPLC et MALDI.

#### *Synthèse du dérivé « cystéine cholestéryle »*

2 mmol (1 eq.) de cholestérol et 2,2 mmol (1,1 eq.) d'acide bromoacétique sont dissous dans 10 mL de DCM. Puis 2,2 mmol (1,1 eq.) de DIPC et 0,1 mmole (0,05 eq.) de DMAP sont ajoutés. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (éluant cyclohexane/DCM 7/3 v/v ; révélateur acide phosphomolybdique). Typiquement, la réaction n'évolue plus après 48 heures. Le milieu est concentré grâce à un évaporateur rotatif. Le solide obtenu est redissous dans un minimum de DCM (5 mL) et le milieu brut est purifié par colonne chromatographique sur gel de silice (éluant cyclohexane/DCM 7/3 v/v). Chaque fraction est analysée par CCM et celles contenant le bromoacétate de cholestéryle sont rassemblées puis concentrées à l'évaporateur rotatif. Le composé pur est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

Parallèlement, 2 g de Fmoc-Cys(Trt)-OH sont ajoutés à 20 mL d'une solution de TFA/TIPS 95/5 (v/v). Après une heure de réaction, l'acide Fmoc-Cys(SH)-OH est obtenu par précipitation, en ajoutant 400 mL d'eau ultrapure glacée à la solution de TFA. Après filtration, le résidu Fmoc-Cys(SH)-OH est obtenu sous forme d'une poudre blanche.

2,2 mmol (1,1 eq.) de bromoacétate de cholestéryle sont alors dissous dans 100 mL de DMSO puis 2 mmol (1 eq.) de Fmoc-Cys(SH)-OH sont ajoutés, ainsi que 1 mL de DIEA (1 % en volume). L'avancement de la réaction est suivi par HPLC et elle est quantitative en une heure.

Après concentration du milieu à l'aide d'un évaporateur rotatif, l'acide aminé « cystéine cholestéryle » est obtenu sous la forme d'une huile incolore. Cet acide aminé a ensuite été caractérisé par HPLC et MALDI

## Synthèse Peptidique sur Phase Solide et analyse des peptides

L'assemblage des peptides est réalisé en stratégie fmoc, manuellement dans une seringue possédant un filtre.

### *Réaction de couplage*

Par rapport à la charge de la résine, 4 équivalents d'acide aminé et 5 équivalents d'HOBt et TBTU sont dissous dans du DMF de telle sorte que la concentration en activateur soit égale à 0,5 M. Puis 8 équivalents de DIEA sont ajoutés. L'avancement de la réaction de couplage est contrôlé grâce à un test de Kaiser. Quand le couplage est terminé, la résine est lavée trois fois pendant 2 minutes avec du DMF.

### *Réaction de capping*

Une solution de DMF/Ac<sub>2</sub>O/DIEA 85/10/5 (v/v/v) est ajoutée à la résine puis le milieu est laissé sous agitation pendant 5 minutes. La résine est ensuite lavée quatre fois pendant trois minutes au DMF.

### *Réaction de déprotection*

Une solution de DMF/pipéridine 4/1 (v/v) est ajoutée à la résine puis le milieu est laissé sous agitation pendant 1 minute. La solution est alors filtrée puis une nouvelle solution est ajoutée à la résine puis le milieu est laissé sous agitation pendant 10 minutes. La résine est ensuite lavée avec du DMF cinq fois pendant une minute.

Durant cette étape, toutes les solutions sont rassemblées et le dibenzofulvène est dosé par spectrophotométrie. A 301 nm,  $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

### *Test de Kaiser*

Ce test, également appelé test ninhydrine, fait intervenir trois solutions :

- solution A : 500 mg de ninhydrine dissous dans 10 mL d'éthanol
- solution B : 20 mL d'éthanol contenant 80 g de phénol
- solution C : 2 mL de KCN aqueux à 1 mM qsp 100 mL de pyridine

Une goutte de solution A, deux de solution B puis une de solution C sont ajoutées dans cet ordre à quelques billes de résines, préalablement lavées à l'éthanol. Le mélange est chauffé plusieurs minutes à 100°C. La présence d'amines libres amène à une coloration bleue de la

solution (test positif) alors que le maintien d'une coloration jaune de la solution signifie une absence d'amines libres et donc une réaction de couplage totale.

#### *Clivage des peptides*

La synthèse peptidique terminée, la résine est lavée quatre fois trois minutes au DMF, puis au MeOH et à l'Et<sub>2</sub>O. La résine est alors séchée à l'aide d'un lyophilisateur. La résine est considérée comme totalement sèche quand deux pesées successives donnent une masse de résine identique. Une solution de TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS 92,5/2,5/5 v/v/v est ajoutée à la résine à raison de 10 mL par gramme de résine. Après trois heures d'agitation, la solution est filtrée de la seringue dans 20 volumes d'éther diéthylique glacé. La résine est ensuite rincée avec 1 mL de TFA. Après précipitation des peptides, le mélange est centrifugé à 13 000 rpm pendant 5 minutes. Le culot est redissous dans un minimum de TFA et une seconde précipitation est réalisée en ajoutant 20 volumes d'Et<sub>2</sub>O glacé. Après précipitation et une seconde centrifugation, le culot est redissous dans un minimum d'eau contenant 0,1 % de TFA puis le milieu brut est analysé par HPLC.

#### *Analyses HPLC*

Les analyses sont réalisées sur un équipement Waters comprenant un module de séparations Waters 2695 et un détecteur UV-visible Waters 2996. Deux colonnes analytiques ont été utilisées : une Kromasil 120Å 3 µm C<sub>18</sub> particules, 250 x 4,6 mm ainsi qu'une Jupiter 300Å 5 µm C<sub>4</sub> particules, 250 x 4,6 mm équipée d'une cartouche de garde KJO-4282. Pour les colonnes analytiques, le débit de phases mobiles est de 1 mL/min. Les purifications se font grâce à une colonne semi-préparative Kromasil 300Å 15 µm C<sub>18</sub> particules, 250 x 4,6 mm avec un débit de phases mobiles de 3 mL/min. La détection se fait grâce à la mesure de l'absorbance UV à 214 nm. Le solvant A est constitué d'eau contenant 0,1 % de TFA et le solvant B est constitué d'acétonitrile contenant 0,08 % de TFA. Un gradient de solvant est utilisé pour chaque analyse et qui peut être différent selon le peptide étudié.

#### *Analyses MALDI*

L'acquisition des spectres MALDI est réalisée par un spectrophotomètre 4800 Plus MALDI-Tof/Tof Proteomics Analyser d'Applied Biosystems. La matrice utilisée est l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique dissoute dans un mélange H<sub>2</sub>O/ACN-0,1% TFA à une concentration de 5 mg/mL. Le dépôt est de type goutte sèche. Concrètement, 1 µL de l'analyte est mélangé

avec 9  $\mu\text{L}$  de la solution de matrice, puis 0,8  $\mu\text{L}$  du mélange sont déposés sur la plaque MALDI.

#### *Analyses LC/MS*

Les spectres de masse sont enregistrés avec un spectromètre Micromass Platform II équipé d'une source électrospray. Les analyses LC/MS sont effectuées en ajoutant une cartouche XTerra MS C18

#### *Dosages spectrophotométriques*

Voici les coefficients d'extinctions molaires ainsi que les longueurs d'onde utilisés :

- Dosage de la tyrosine présent sur un peptide, à 274 nm,  $\epsilon = 1450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Dosage de la fluorescéine, à 495 nm,  $\epsilon = 80\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Dosage du dibenzofulvène, à 301 nm,  $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Dosage des thiols par le réactif d'Ellman, à 412 nm,  $\epsilon = 13\,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Le dosage des fonctions thiols est réalisé de la manière suivante :

4 nmol théorique de molécules contenant les fonctions SH à doser sont ajoutés à 600  $\mu\text{L}$  de réactif A (Tris HCl 0,1 M, urée 6 M, pH 8). Puis 75  $\mu\text{l}$  de réactif B sont ajoutés (acide dithiobisnitrobenzoïque à  $10^{-2}$  M dans le réactif A). La réaction est immédiate et la solution prend une coloration jaune clair. Enfin, la densité optique (do) mesurée doit être préférentiellement inférieure à 1 afin de rester dans le domaine de linéarité.

## **Couplages de la fluoréscéine-maléimide ou de la FDA-maléimide aux peptides**

### *Couplage de la fluorescéine maléimide (FM)*

500 nmol de peptide sont dissous dans 500  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 100mM pH 7. 10  $\mu\text{mol}$  (20 eq.) de FM sont dissous dans 20  $\mu\text{L}$  DMSO. Les deux solutions sont rassemblées. Si un précipité orange apparaît, celui-ci est dissous avec 200  $\mu\text{L}$  d'EtOH. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante à l'abri de la lumière. L'avancement réactionnel est suivi par HPLC. Quand la réaction n'évolue plus (maximum 24 heures), 10 mL (20 volumes) d'acétone glacé sont rajoutés au milieu réactionnel. Le peptide précipite et le reste de fluorescéine-maléimide se trouve dans le surnageant. Après centrifugation (5 min à 13 000 rpm), le culot est dissous dans 200  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O-0,1 % TFA puis à nouveau 20 volumes d'acétone glacé sont ajoutés. Après centrifugation (5 min à 13 000 rpm), le culot est dissous dans 200  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O-0,1 % TFA puis la solution est analysée par HPLC. Le milieu brut est lyophilisé et le peptide-FM est obtenu sous forme de poudre jaune.

### *Couplage de la fluorescéine diacétate-maléimide*

500 nmol de peptide sont dissous dans 200  $\mu\text{L}$  de MeOH. 750 nmol (1,5 eq.) de FDA-maléimide sont dissous dans 400  $\mu\text{L}$  DMSO. Les deux solutions sont rassemblées. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante à l'abri de la lumière. L'avancement réactionnel est suivi par HPLC. Après 24 heures de réaction, 12 mL (20 volumes) d'acétone glacé sont rajoutés au milieu réactionnel. Le peptide précipite et le reste de FDA-maléimide se trouve dans le surnageant. Après centrifugation (5 min à 13 000 rpm), le culot est dissous dans 200  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O-0,1 % TFA puis à nouveau 20 volumes d'acétone glacé sont ajoutés. Après centrifugation (5 min à 13 000 rpm), le culot est dissous dans 200  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O-0,1 % TFA puis la solution est analysée par HPLC. Le milieu brut est lyophilisé et le peptide-FDA est obtenu sous forme de poudre blanche.

## Marquage des peptides à l'iode 125

500 nmol de peptides sont dissous dans 150  $\mu\text{L}$  de tampon de marquage. La solution est ensuite transférée dans un tube d'Iodo-Gen. Après solubilisation de l'Iodo-Gen, 2mCi d' $^{125}\text{I}$  (20 $\mu\text{L}$  stock) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est placé à 4°C pendant 4 heures. Pour stopper la réaction, 50 $\mu\text{L}$  de PBS-AA sont ajoutés.

Le milieu réactionnel brut est alors élué avec du PBS-5%SVF à travers une colonne de Sephadex G10 préalablement équilibrée avec 15 mL de PBS-5%SVF. Des fractions de 500  $\mu\text{L}$  sont collectées (12 fractions environ).

5  $\mu\text{L}$  de chaque fraction sont récupérés et ajoutés à 500  $\mu\text{L}$  de PBS. Puis 5  $\mu\text{L}$  de ce mélange sont dispensés dans 500  $\mu\text{L}$  de PBS. On a donc une dilution de 10 000 (100 x 100). La radioactivité est déterminée par comptage au compteur bêta. Le nombre de coup obtenu (cpm) est multiplié par 10 000 pour obtenir le nombre de cpm de la solution mère. Les fractions contenant le plus grand nombre de cpm (2 à 3 fractions) sont alors rassemblées. Une nouvelle dilution par 10 000 est alors effectuée pour un nouveau comptage de la solution stock.

Puis l'activité volumique est déterminée (en MBq/mL)

Pour les conversions, 1  $\mu\text{Ci}$  = 1 900 00 cpm = 37 000 Bq

## **Protocoles de culture cellulaire**

### *Cellules SKOV3-E2*

Ce sont des cellules de carcinomes ovariens humains dont l'expression de la glycoprotéine membranaire HER2 est plus homogène. Ces cellules sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 1 % de sérum de veau fœtal ainsi que des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les cellules sont maintenues à 37°C sous 5 % de dioxyde de carbone. Seules les cellules comprenant moins de sept passages sont utilisées pour les tests *in vitro*.

### *Cellules Jurkat*

Ce sont des lymphomes de lymphocytes T. Ces cellules sont cultivées dans un milieu RPMI contenant 1 % de sérum de veau fœtal ainsi que des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Les cellules sont maintenues à 37°C sous 5 % de dioxyde de carbone. Seules les cellules comprenant moins de sept passages sont utilisées pour les tests *in vitro*.

## Détermination de la viabilité cellulaire

### *Test MTS*

Dans une plaque 96 puits, 30 000 cellules par puits sont incubés dans 200 µL de milieu. Le lendemain, le peptide est incubé sur les cellules pendant trois heures à 37°C dans 100 µL d'une solution milieu/PBS 95/5 (v/v), à une concentration finale de 1, 5, 10, 50 et 100 µM. Chaque point est réalisé en triplicat. Trois puits ne contenant pas le peptide mais subissant les mêmes conditions sont également préparés. Ce sont les cellules seules (blanc).

Puis 20 µL d'une solution PMS/MTS 1/20 (v/v) sont ajoutés dans chaque puits puis les cellules sont incubées pendant deux heures à 37°C. 100 µL de chaque puits sont transvasés dans une nouvelle plaque est la densité optique est mesuré à 490 nm.

La viabilité cellulaire est déterminée ainsi :

Viabilité cellulaire (%) = (do échantillon / do blanc) x 100

Les solutions stocks de MTS et PMS sont ainsi préparées :

MTS : 2 mg/mL pH 6.5 dissous dans du PBS

PMS : 0,92 mg/mL dissous dans du PBS

MTS : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium

PMS : phénazine méthosulfate

### *Marquage à l'iodure de propidium*

Dans une plaque 24 puits, 40 000 cellules par puits sont incubées dans 300 µL de milieu. Le lendemain, le peptide est incubé sur les cellules à 37°C pendant trois heures dans 300 µL milieu/PBS 95/5 (v/v). La concentration du peptide est de 1, 5, 10 ou 50 µM. Puis les cellules sont lavées au PBS, trypsinées pendant 10 min et deux nouvelles fois lavées au PBS. Les cellules sont resuspendues dans 700 µL de PBS puis 100 µL d'IP (1 µg/mL) sont rajoutés. Après 15 min, la réaction est stoppée en plaçant les solutions à 4°C puis les cellules analysées au cytomètre.

## **Evaluation de l'internalisation par cytométrie de flux**

Dans une plaque 24 puits, 100 000 cellules par puits sont incubées dans un volume de 500  $\mu\text{L}$ . Le lendemain, le peptide est incubé sur les cellules pendant une ou trois heures, à 1, 5 ou 10  $\mu\text{M}$  dans 500  $\mu\text{L}$  de milieu/PBS 95/5 (v/v). Chaque point est réalisé en double. Puis les cellules sont lavées une fois avec 1 mL de PBS, 500  $\mu\text{L}$  de trypine sont ajoutées dans chaque puits. La plaque est incubée 5 à 10 min à 37°C. Puis 1 mL de PBS est ajouté dans chaque puits, la solution est transférée dans un eppendorf puis est centrifugée (5 min, 3000 rpm). Puis le culot cellulaire est de nouveau lavé au PBS (2 fois) puis est resuspendu dans 800  $\mu\text{L}$  de PBS glacé. Le mélange est alors analysé au cytomètre.

## **Quantification de l'internalisation des peptides radiomarqués**

30 000 cellules par puits sont incubées la veille dans une plaque 96 puits à fond rond dans 100  $\mu\text{L}$  de milieu. Le lendemain, après centrifugation, le milieu est renouvelé lors de l'incubation à 37°C des peptides radiomarqués qui se trouvent dans un mélange milieu /PBS 80/20 (v/v) (200  $\mu\text{L}$  par puits).

Pour chaque peptide, il faut :

- 4 puits sans cellules (deux pour 3 heures et deux pour 24 heures d'incubation)

Pour chaque type cellulaire, il faut :

- 4 puits sans peptides (deux pour 3 heures et deux pour 24 heures d'incubation)

Pour chaque peptide et chaque type de cellules, il faut :

- 4 puits à 0,5 MBq/mL (deux pour 3 heures et deux pour 24 heures d'incubation)
- 4 puits à 1 MBq/mL (deux pour 3 heures et deux pour 24 heures d'incubation)
- 4 puits à 2 MBq/mL (deux pour 3 heures et deux pour 24 heures d'incubation)

Après incubation des peptides, pour chaque puits :

- Récupération du surnageant d'incubation dans un tube et comptage de la radioactivité (SN1)

- Lavage du culot cellulaire avec 200  $\mu$ L de tampon PBS/SVF 2%. Après 3 min, récupération du surnagent et comptage de la radioactivité (SN2)
- Ajout de 50 $\mu$ L de trypsine dans les puits. Incubation 10-15 min à 37°C. Neutralisation de la trypsine avec 150 $\mu$ L de tampon PBS/SVF 10%. Transférer dans un eppendorf de 1,5 mL. Après centrifugation (4000 rpm, 6 min, +4°C), récupération du surnagent dans un tube et comptage de la radioactivité (SN3)
- Lavage du culot cellulaire avec 200  $\mu$ L de tampon PBS/SVF 2%. Centrifugation et récupération du surnagent dans un tube et comptage de la radioactivité (SN4)
- Le culot cellulaire reste dans l'eppendorf, sans surnagent. Déposer l'eppendorf dans un tube puis comptage de la radioactivité (C1)

Le pourcentage d'internalisation est le ratio de C1 sur la somme des quatre SN plus C1

### Tableau récapitulatif des composés synthétisés et caractérisés

Le composé (1), Fmoc-Asp(OtBu)-OH, n'est pas représenté dans ce tableau car c'est un acide aminé commercial.

Composé	Formule	Rdt	tr HPLC (min)	Gradient HPLC	Col	MS
(2)	Fmoc-Asp(OtBu)-Chol	90 %	N.D.	/	/	N.D.
(3)	Fmoc-Asp(OH)-Chol	84 %	20,31	100 % B	C <sub>18</sub>	c : 724,0 t : 724,3
(4)	H-GQG-NH <sub>2</sub>	10 %	17,80	00-30 % B en 20 min	C <sub>18</sub>	c : 1717,7 t : 1717,9
(5)	H-GDcG-NH <sub>2</sub>	5 %	17,60	30-70 % B en 20 min	C <sub>18</sub>	c : 2073,1 t : 2073,3
(6)	H-GQDc-NH <sub>2</sub>	5 %	20,62	10-100 % B en 20 min	C <sub>18</sub>	c : 2144,2 t : 2144,5
(7)	H-GQG(FM)-NH <sub>2</sub>	80 %	11,90	10-100 % B en 20 min	C <sub>18</sub>	c : 2145,1 t : 2145,1
(8)	H-GDcG(FM)-NH <sub>2</sub>	68 %	18,40	10-100 % B en 20 min	C <sub>18</sub>	c : 2500,5 t : 2500,2
(9)	H-GQDc(FM)-NH <sub>2</sub>	75 %	17,0	10-100 % B en 20 min	C <sub>18</sub>	c : 2571,6 t : 2571,1
(10)	Fmoc-Glu(OtBu)-Chol	60 %	N.D.	/	/	N.D.
(11)	Fmoc-Glu(OH)-Chol	60 %	17,2	10-100 % B en 25 min	C <sub>4</sub>	c : 738,0 t : 738,4
(12)	Br-AcOChol	83 %	N.D.	/	/	N.D.
(13)	Fmoc-Cys(SH)-OH	100 %	14,3	10-100 % B en 25 min	C <sub>4</sub>	c : 343,1 t : 343,1
(14)	Fmoc-Cys(AcOChol)-OH	83 %	17,3	10-100 % B en 25 min	C <sub>4</sub>	c : 792,5 <sup>(a)</sup> t : 792,5 <sup>(a)</sup>
(15)	H-GQCc-NH <sub>2</sub>	3 %	17,2	00-100 % B en 15 min	C <sub>4</sub>	c : 2190,1 t : 2190,4

(16)	H-GCcG-NH <sub>2</sub>	6 %	16,3	00-100 % B en 15 min	C <sub>4</sub>	c : 2119,2 t : 2119,2
(17)	H-CcQG-NH <sub>2</sub>	5 %	16,8	00-100 % B en 15 min	C <sub>4</sub>	c : 2190,1 t : 2190,7
(18)	H-GQG(FDA)-NH <sub>2</sub>	100 %	14,3	10-100 % B en 20 min	C <sub>4</sub>	c : 2230,0 t : 2230,1
(19)	H-GQCc(FDA)-NH <sub>2</sub>	64 %	12,9	40-100 % B en 20 min	C <sub>4</sub>	c : 2702,7 t : 2702,5
(20)	H-GCcG(FDA)-NH <sub>2</sub>	80 %	11,3	40-100 % B en 20 min	C <sub>4</sub>	c : 2631,5 t : 2631,3
(21)	H-CcQG(FDA)-NH <sub>2</sub>	100 %	11,7	40-100 % B en 20 min	C <sub>4</sub>	c : 2702,7 t : 2702,8

(a) : m/z correspondant à [M+Na]<sup>+</sup>

Col : Colonne analytique utilisée lors de l'analyse HPLC

MS : spectrométrie de masse ; c : masse calculée ; t : masse trouvée

N.D. : non déterminé

Rdt : Rendement global du composé

tr : temps de rétention du composé lors de l'analyse HPLC

**Tableau récapitulatif des composés caractérisés par CCM**

<b>Composé</b>	<b>Rapport frontal</b>	<b>Système d'éluant</b>
Fmoc-Asp(OtBu)-Chol	0,65	Cyclohexane/AcOEt 8/2 (v/v)
Fmoc-Asp(OH)-Chol	0,24	Cyclohexane/AcOEt 8/2 (v/v)
Fmoc-Glu(OtBu)-Chol	0,7	Cyclohexane/AcOEt 8/2 (v/v)
Fmoc-Glu(OH)-Chol	0,25	Cyclohexane/AcOEt 8/2 (v/v)
Br-AcOChol	0,7	Cyclohexane/AcOEt 95/5 (v/v)
Fmoc-Cys(AcOchol)-OH	0,6	Cyclohexane/AcOEt 85/15 (v/v)
Cholestérol	0,45	Cyclohexane/AcOEt 8/2 (v/v)
Cholestadiène	0,95	Cyclohexane/AcOEt 95/5 (v/v)

AcOEt : acétate d'éthyle

## Bibliographie

1. Zhi, D. et al. Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery. *Bioconjug Chem* **21**, 563-577 (2010).
2. Radchatawedchakoon, W., Watanapokasin, R., Krajarng, A. & Yingyongnarongkul, B. Solid phase synthesis of novel asymmetric hydrophilic head cholesterol-based cationic lipids with potential DNA delivery. *Bioorg. Med. Chem* **18**, 330-342 (2010).
3. Islam, R.U., Hean, J., van Otterlo, W.A.L., de Koning, C.B. & Arbuthnot, P. Efficient nucleic acid transduction with lipoplexes containing novel piperazine- and polyamine-conjugated cholesterol derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **19**, 100-103 (2009).
4. Medvedeva, D.A. et al. Novel cholesterol-based cationic lipids for gene delivery. *J. Med. Chem* **52**, 6558-6568 (2009).
5. Kim, B. et al. Synthesis of novel cholesterol-based cationic lipids for gene delivery. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **19**, 2986-2989 (2009).
6. Huang, Z., Li, W., MacKay, J.A. & Szoka, F.C. Thiocholesterol-based lipids for ordered assembly of bioresponsive gene carriers. *Mol. Ther* **11**, 409-417 (2005).
7. Martin, M. Peptide-guided Gene Delivery. *The AAPS Journal* (2007).
8. Männistö, M. et al. Structure-activity relationships of poly(L-lysines): effects of pegylation and molecular shape on physicochemical and biological properties in gene delivery. *J Control Release* **83**, 169-182 (2002).
9. Wu, G.Y. & Wu, C.H. Evidence for targeted gene delivery to Hep G2 hepatoma cells in vitro. *Biochemistry* **27**, 887-892 (1988).
10. Leonetti, J.P. et al. Antiviral activity of conjugates between poly(L-lysine) and synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Gene* **72**, 323-332 (1988).
11. El-Aneed, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* **94**, 1-14 (2004).
12. Klotz, I.M., Royer, G.P. & Sloniewsky, A.R. Macromolecule--small molecule interactions. Strong binding and cooperativity in a model synthetic polymer. *Biochemistry* **8**, 4752-4756 (1969).
13. Boussif, O. et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**, 7297-7301 (1995).
14. Abdallah, B. et al. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum. Gene Ther* **7**, 1947-1954 (1996).
15. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. & Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev* **46**, 3-26 (2001).
16. Gao, Z., Fain, H.D. & Rapoport, N. Controlled and targeted tumor chemotherapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound. *J Control Release* **102**, 203-222 (2005).
17. Torchilin, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 145-160 (2005).
18. Murriel, C.L. & Dowdy, S.F. Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules. *Expert Opin Drug Deliv* **3**, 739-746 (2006).
19. Frankel, A.D. & Pabo, C.O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189-1193 (1988).
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. 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).
  22. 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).
  23. Vivès, 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).
  24. 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).
  25. 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).
  26. Wender, P.A. et al. 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).
  27. Futaki, S. Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int J Pharm* **245**, 1-7 (2002).
  28. Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. & Dowdy, S.F. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-1572 (1999).
  29. Jain, M. et al. Penetratin improves tumor retention of single-chain antibodies: a novel step toward optimization of radioimmunotherapy of solid tumors. *Cancer Res* **65**, 7840-7846 (2005).
  30. Bertrand, J. et al. Synthesis and studies on cell-penetrating peptides. *Bioconjug. Chem* **20**, 1307-1314 (2009).
  31. Dietz, G.P.H. & Bähr, M. Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol. Cell. Neurosci* **27**, 85-131 (2004).
  32. Langel, U., Pooga, M., Kairane, C., Zilmer, M. & Bartfai, T. A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and reverses its inhibition by ouabain. *Regul. Pept* **62**, 47-52 (1996).
  33. Zorko, M., Pooga, M., Saar, K., Rezaei, K. & Langel, U. Differential regulation of GTPase activity by mastoparan and galparan. *Arch. Biochem. Biophys* **349**, 321-328 (1998).
  34. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. & Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J* **12**, 67-77 (1998).
  35. Soomets, U. et al. Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 165-176 (2000).
  36. Ishihara, T. et al. Intracellular delivery of siRNA by cell-penetrating peptides modified with cationic oligopeptides. *Drug Deliv* **16**, 153-159 (2009).
  37. Pooga, M. et al. Cellular translocation of proteins by transportan. *FASEB J* **15**, 1451-1453 (2001).
  38. Howl, J., Jones, S. & Farquhar, M. Intracellular delivery of bioactive peptides to RBL-2H3 cells induces beta-hexosaminidase secretion and phospholipase D activation. *Chembiochem* **4**, 1312-1316 (2003).
  39. 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).

40. Dubikovskaya, E.A., Thorne, S.H., Pillow, T.H., Contag, C.H. & Wender, P.A. Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 12128-12133 (2008).
41. Watkins, C.L. et al. Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. *J Control Release* **140**, 237-244 (2009).
42. Guo, Y. et al. Intercellular imaging by a polyarginine derived cell penetrating peptide labeled magnetic resonance contrast agent, diethylenetriamine pentaacetic acid gadolinium. *Chin. Med. J* **120**, 50-55 (2007).
43. Crombez, L. et al. Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth. *Nucleic Acids Res* **37**, 4559-4569 (2009).
44. Deshayes, S., Morris, M., Heitz, F. & Divita, G. Delivery of proteins and nucleic acids using a non-covalent peptide-based strategy. *Adv. Drug Deliv. Rev* **60**, 537-547 (2008).
45. Muñoz-Morris, M.A., Heitz, F., Divita, G. & Morris, M.C. The peptide carrier Pep-1 forms biologically efficient nanoparticle complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **355**, 877-882 (2007).
46. Nielsen, P.E. & Egholm, M. An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol* **1**, 89-104 (1999).
47. Morris, M.C. et al. Combination of a new generation of PNAs with a peptide-based carrier enables efficient targeting of cell cycle progression. *Gene Ther* **11**, 757-764 (2004).
48. Morris, M.C. et al. A non-covalent peptide-based carrier for in vivo delivery of DNA mimics. *Nucleic Acids Res* **35**, e49 (2007).
49. Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G. & Heitz, F. Interactions of amphipathic carrier peptides with membrane components in relation with their ability to deliver therapeutics. *J. Pept. Sci* **12**, 758-765 (2006).
50. Simeoni, F., Morris, M.C., Heitz, F. & Divita, G. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **31**, 2717-2724 (2003).
51. Rittner, K. et al. New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol. Ther* **5**, 104-114 (2002).
52. Crombez, L. et al. A New Potent Secondary Amphipathic Cell-penetrating Peptide for siRNA Delivery Into Mammalian Cells. *Mol Ther* **17**, 95-103 (2008).
53. Maeda, H., Sawa, T. & Konno, T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *J Control Release* **74**, 47-61 (2001).
54. Eiríksdóttir, E., Konate, K., Langel, U., Divita, G. & Deshayes, S. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim Biophys Acta* (2010).doi:10.1016/j.bbamem.2010.03.005
55. Abes, S. et al. Efficient splicing correction by PNA conjugation to an R6-Penetratin delivery peptide. *Nucleic Acids Res* **35**, 4495-4502 (2007).
56. Koppelhus, U., Shiraishi, T., Zachar, V., Pankratova, S. & Nielsen, P.E. Improved cellular activity of antisense peptide nucleic acids by conjugation to a cationic peptide-lipid (CatLip) domain. *Bioconjug. Chem* **19**, 1526-1534 (2008).
57. Meade, B.R. & Dowdy, S.F. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev* **59**, 134-140 (2007).
58. Abes, R. et al. Delivery of steric block morpholino oligomers by (R-X-R)<sub>4</sub> peptides: structure-activity studies. *Nucleic Acids Res* **36**, 6343-6354 (2008).
59. Snyder, E.L. & Dowdy, S.F. Recent advances in the use of protein transduction domains

- for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert Opin Drug Deliv* **2**, 43-51 (2005).
60. Kim, C., Lee, Y., Kim, J.S., Jeong, J.H. & Park, T.G. Thermally Triggered Cellular Uptake of Quantum Dots Immobilized with Poly(N-isopropylacrylamide) and Cell Penetrating Peptide. *Langmuir* **26**, 14965-14969 (2010).
  61. Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sütlü, T., Johansson, H. & Langel, U. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J* **21**, 2664-2671 (2007).
  62. Richard, J.P. et al. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem* **278**, 585-590 (2003).
  63. 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).
  64. Richard, J.P. et al. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem* **280**, 15300-15306 (2005).
  65. Brodsky, F.M., Chen, C.Y., Knuehl, C., Towler, M.C. & Wakeham, D.E. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **17**, 517-568 (2001).
  66. Benmerah Endocytose, chaque voie compte ! *M/S* **18**, 1126-36 (2002).
  67. Singh, R.D. et al. Selective caveolin-1-dependent endocytosis of glycosphingolipids. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3254-3265 (2003).
  68. Nichols, B.J. & Lippincott-Schwartz, J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* **11**, 406-412 (2001).
  69. Nabi, I.R. & Le, P.U. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J. Cell Biol* **161**, 673-677 (2003).
  70. Watts, C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol* **15**, 821-850 (1997).
  71. 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).
  72. Jiao, C. et al. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J. Biol. Chem* **284**, 33957-33965 (2009).
  73. Lamaze, C. & Schmid, S.L. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol* **7**, 573-580 (1995).
  74. Vercauteren, D. et al. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol. Ther* **18**, 561-569 (2010).
  75. Sugita, T. et al. Comparative study on transduction and toxicity of protein transduction domains. *Br. J. Pharmacol* **153**, 1143-1152 (2008).
  76. Räägel, H., Säälük, P. & Pooga, M. Peptide-mediated protein delivery-Which pathways are penetrable? *Biochim Biophys Acta* (2010).doi:10.1016/j.bbamem.2010.02.013
  77. Vivès, E., Schmidt, J. & Pèlegri, A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **1786**, 126-138 (2008).
  78. 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).
  79. Fonseca, S.B., Pereira, M.P. & Kelley, S.O. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv. Drug Deliv. Rev* **61**, 953-964 (2009).
  80. Berg, K. et al. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of

- macromolecules into cytosol. *Cancer Res* **59**, 1180-1183 (1999).
81. Matsushita, M. et al. Photo-acceleration of protein release from endosome in the protein transduction system. *FEBS Lett* **572**, 221-226 (2004).
  82. Han, X., Bushweller, J.H., Cafiso, D.S. & Tamm, L.K. Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat. Struct. Biol* **8**, 715-720 (2001).
  83. Joliot, A. & Prochiantz, A. [Transduction peptides, the useful face of a new signaling mechanism]. *Med Sci (Paris)* **21**, 309-314 (2005).
  84. Jones, S.W. et al. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol* **145**, 1093-1102 (2005).
  85. Maiolo, J.R., Ferrer, M. & Ottinger, E.A. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1712**, 161-172 (2005).
  86. 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).
  87. Aussedat, B., Sagan, S., Chassaing, G., Bolbach, G. & Burlina, F. Quantification of the efficiency of cargo delivery by peptidic and pseudo-peptidic Trojan carriers using MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 375-383 (2006).
  88. Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R. & Boisguerin, P. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug. Chem* **19**, 2363-2374 (2008).
  89. Cardozo, A.K. et al. Cell-permeable peptides induce dose- and length-dependent cytotoxic effects. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2222-2234 (2007).
  90. Zorko, M. & Langel, U. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev* **57**, 529-545 (2005).
  91. Hällbrink, M., Oehlke, J., Papsdorf, G. & Bienert, M. Uptake of cell-penetrating peptides is dependent on peptide-to-cell ratio rather than on peptide concentration. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, 222-228 (2004).
  92. Marty, C., Meylan, C., Schott, H., Ballmer-Hofer, K. & Schwendener, R.A. Enhanced heparan sulfate proteoglycan-mediated uptake of cell-penetrating peptide-modified liposomes. *Cell. Mol. Life Sci* **61**, 1785-1794 (2004).
  93. Tseng, Y., Liu, J. & Hong, R. Translocation of liposomes into cancer cells by cell-penetrating peptides penetratin and tat: a kinetic and efficacy study. *Mol. Pharmacol* **62**, 864-872 (2002).
  94. Aubry, S. et al. Cell-surface thiols affect cell entry of disulfide-conjugated peptides. *FASEB J* **23**, 2956-2967 (2009).
  95. Tréhin, R. et al. Cellular internalization of human calcitonin derived peptides in MDCK monolayers: a comparative study with Tat(47-57) and penetratin(43-58). *Pharm. Res* **21**, 33-42 (2004).
  96. Palm, C., Jayamanne, M., Kjellander, M. & Hällbrink, M. Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1768**, 1769-1776 (2007).
  97. Grunwald, J., Rejtar, T., Sawant, R., Wang, Z. & Torchilin, V.P. TAT Peptide and Its Conjugates: Proteolytic Stability. *Bioconjug. Chem* (2009).doi:10.1021/bc900081e
  98. Ziegler, A. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv. Drug Deliv. Rev* **60**, 580-597 (2008).
  99. Hansen, M., Kilk, K. & Langel, Ü. Predicting cell-penetrating peptides. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 572-579 (2008).
  100. Sandberg, M., Eriksson, L., Jonsson, J., Sjöström, M. & Wold, S. New chemical descriptors relevant for the design of biologically active peptides. A multivariate

- characterization of 87 amino acids. *J. Med. Chem* **41**, 2481-2491 (1998).
101. Heitz, F., Morris, M.C. & Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol* **157**, 195-206 (2009).
  102. 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).
  103. Said Hassane, F., Saleh, A., Abes, R., Gait, M. & Lebleu, B. Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**, 715-726 (2010).
  104. Johnson, L.N., Cashman, S.M. & Kumar-Singh, R. Cell-penetrating peptide for enhanced delivery of nucleic acids and drugs to ocular tissues including retina and cornea. *Mol. Ther* **16**, 107-114 (2008).
  105. Rothbard, J.B. et al. Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat. Med* **6**, 1253-1257 (2000).
  106. Kamei, N., Morishita, M., Ehara, J. & Takayama, K. Permeation characteristics of oligoarginine through intestinal epithelium and its usefulness for intestinal peptide drug delivery. *J Control Release* **131**, 94-99 (2008).
  107. Morishita, M., Kamei, N., Ehara, J., Isowa, K. & Takayama, K. A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin. *J Control Release* **118**, 177-184 (2007).
  108. Kamei, N. et al. Molecular imaging analysis of intestinal insulin absorption boosted by cell-penetrating peptides by using positron emission tomography. *J Control Release* **146**, 16-22 (2010).
  109. Jiang, T. et al. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 17867-17872 (2004).
  110. Nguyen, Q.T. et al. Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 4317-4322 (2010).
  111. Taylor, B.N. et al. Noncationic peptides obtained from azurin preferentially enter cancer cells. *Cancer Res* **69**, 537-546 (2009).
  112. Strebel, K. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS* **17 Suppl 4**, S25-34 (2003).
  113. Bennasser, Y. & Bahraoui, E. HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-betaII and -delta. *FASEB J* **16**, 546-554 (2002).
  114. Vasilescu, A. et al. Genomic analysis of Th1-Th2 cytokine genes in an AIDS cohort: identification of IL4 and IL10 haplotypes associated with the disease progression. *Genes Immun* **4**, 441-449 (2003).
  115. Bartz, S.R. & Emerman, M. Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8. *J. Virol* **73**, 1956-1963 (1999).
  116. Xiao, H. et al. Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 11466-11471 (2000).
  117. Jeang HIV-1 Tat : Structure and Function.
  118. Kuppuswamy, M., Subramanian, T., Srinivasan, A. & Chinnadurai, G. Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* **17**, 3551-3561 (1989).
  119. Péloponèse, J.M. et al. Full peptide synthesis, purification, and characterization of six Tat variants. Differences observed between HIV-1 isolates from Africa and other continents. *J. Biol. Chem* **274**, 11473-11478 (1999).

120. Peng, J., Zhu, Y., Milton, J.T. & Price, D.H. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* **12**, 755-762 (1998).
121. Nagahara, H. et al. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* **4**, 1449-1452 (1998).
122. Jones, K.A. & Peterlin, B.M. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu. Rev. Biochem* **63**, 717-743 (1994).
123. Viglianti, G.A. & Mullins, J.I. Functional comparison of transactivation by simian immunodeficiency virus from rhesus macaques and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol* **62**, 4523-4532 (1988).
124. Tong-Starksen, S.E., Baur, A., Lu, X.B., Peck, E. & Peterlin, B.M. Second exon of Tat of HIV-2 is required for optimal trans-activation of HIV-1 and HIV-2 LTRs. *Virology* **195**, 826-830 (1993).
125. Xiao, H., Neuveut, C., Benkirane, M. & Jeang, K.T. Interaction of the second coding exon of Tat with human EF-1 delta delineates a mechanism for HIV-1-mediated shut-off of host mRNA translation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **244**, 384-389 (1998).
126. Liang, C. & Wainberg, M.A. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev* **4**, 41-49 (2002).
127. Gutheil, W.G. et al. Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): a possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 6594-6598 (1994).
128. Vendeville, A. et al. HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2347-2360 (2004).
129. Mann, D.A. & Frankel, A.D. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J* **10**, 1733-1739 (1991).
130. Fawell, S. et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**, 664-668 (1994).
131. Vivès, E., Granier, C. & Lebleu, B. Structure-activity relationship study of the plasma membrane translocating potential of a short peptide from HIV-1 Tat protein. *Letters in Peptide Science* **8**, 429-436 (1997).
132. 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).
133. Brooks, H., Lebleu, B. & Vivès, E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv. Drug Deliv. Rev* **57**, 559-577 (2005).
134. 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).
135. Kida, S. et al. Design and synthesis of a Tat-related gene transporter: a tool for carrying the adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **16**, 743-745 (2006).
136. Zelphati, O. & Szoka, F.C. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 11493-11498 (1996).
137. Kjellén, L. & Lindahl, U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem* **60**, 443-475 (1991).
138. Tumova, S. & Bame, K.J. The interaction between basic fibroblast growth factor and heparan sulfate can prevent the in vitro degradation of the glycosaminoglycan by Chinese hamster ovary cell heparanases. *J. Biol. Chem* **272**, 9078-9085 (1997).
139. Mahley, R.W. & Ji, Z.S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J. Lipid Res* **40**, 1-16 (1999).

140. Shukla, D. et al. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**, 13-22 (1999).
141. Sandgren, S., Cheng, F. & Belting, M. Nuclear targeting of macromolecular polyanions by an HIV-Tat derived peptide. Role for cell-surface proteoglycans. *J. Biol. Chem* **277**, 38877-38883 (2002).
142. Rusnati, M. et al. Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. *J. Biol. Chem* **272**, 11313-11320 (1997).
143. Console, S., Marty, C., García-Echeverría, C., Schwendener, R. & Ballmer-Hofer, K. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem* **278**, 35109-35114 (2003).
144. Ziegler, A. & Seelig, J. High affinity of the cell-penetrating peptide HIV-1 Tat-PTD for DNA. *Biochemistry* **46**, 8138-8145 (2007).
145. Astriab-Fisher, A., Sergueev, D., Fisher, M., Shaw, B.R. & Juliano, R.L. Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm. Res* **19**, 744-754 (2002).
146. Drin, G. et al. Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. Role of lipid-binding affinity. *Eur. J. Biochem* **268**, 1304-1314 (2001).
147. Lindgren, M.E., Hällbrink, M.M., Elmquist, A.M. & Langel, U. Passage of cell-penetrating peptides across a human epithelial cell layer in vitro. *Biochem. J* **377**, 69-76 (2004).
148. Rinne, J. et al. Internalization of novel non-viral vector TAT-streptavidin into human cells. *BMC Biotechnol* **7**, 1 (2007).
149. Gump, J.M., June, R.K. & Dowdy, S.F. Revised Role of Glycosaminoglycans in TAT Protein Transduction Domain-mediated Cellular Transduction. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1500-1507 (2010).
150. Potocky, T.B., Menon, A.K. & Gellman, S.H. Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J. Biol. Chem* **278**, 50188-50194 (2003).
151. Ferrari, A. et al. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol. Ther* **8**, 284-294 (2003).
152. Fittipaldi, A. & Giacca, M. Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1. *Adv. Drug Deliv. Rev* **57**, 597-608 (2005).
153. Zhang, X. et al. Endocytosis and membrane potential are required for HeLa cell uptake of R.I.-CKTat9, a retro-inverso Tat cell penetrating peptide. *Mol. Pharm* **6**, 836-848 (2009).
154. Skehel, J.J., Cross, K., Steinhauer, D. & Wiley, D.C. Influenza fusion peptides. *Biochem. Soc. Trans* **29**, 623-626 (2001).
155. Seglen, P.O., Grinde, B. & Solheim, A.E. Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur. J. Biochem* **95**, 215-225 (1979).
156. Yang, S. et al. Cellular uptake of self-assembled cationic peptide-DNA complexes: multifunctional role of the enhancer chloroquine. *J Control Release* **135**, 159-165 (2009).
157. Dennison, S.R., Baker, R.D., Nicholl, I.D. & Phoenix, D.A. Interactions of cell penetrating peptide Tat with model membranes: a biophysical study. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **363**, 178-182 (2007).
158. El-Andaloussi, S., Järver, P., Johansson, H.J. & Langel, U. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochem. J* **407**,

- 285-292 (2007).
159. Lee, E.S. et al. Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH(e) specific TAT exposure and multidrug resistance. *J Control Release* **129**, 228-236 (2008).
  160. Saleh, A.F. et al. Improved Tat-mediated plasmid DNA transfer by fusion to LK15 peptide. *J Control Release* (2010).doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.025
  161. Sethuraman, V.A. & Bae, Y.H. TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors. *J Control Release* **118**, 216-224 (2007).
  162. Tünnemann, G. et al. Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J* **20**, 1775-1784 (2006).
  163. Thorén, P.E.G. et al. Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **307**, 100-107 (2003).
  164. Fretz, M.M. et al. Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. *Biochem. J* **403**, 335-342 (2007).
  165. Ziegler, A., Blatter, X.L., Seelig, A. & Seelig, J. Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis. *Biochemistry* **42**, 9185-9194 (2003).
  166. Mishra, A., Gordon, V.D., Yang, L., Coridan, R. & Wong, G.C.L. HIV TAT forms pores in membranes by inducing saddle-splay curvature: potential role of bidentate hydrogen bonding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* **47**, 2986-2989 (2008).
  167. Su, Y., Waring, A.J., Ruchala, P. & Hong, M. Membrane-Bound Dynamic Structure of an Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptide, the Protein Transduction Domain of HIV TAT, from Solid-State NMR. *Biochemistry* **49**, 6009-6020 (2010).
  168. Ciobanasi, C., Harms, E., Tünnemann, G., Cardoso, M.C. & Kubitscheck, U. Cell-penetrating HIV1 TAT peptides float on model lipid bilayers. *Biochemistry* **48**, 4728-4737 (2009).
  169. Ciobanasi, C., Siebrasse, J.P. & Kubitscheck, U. Cell-penetrating HIV1 TAT peptides can generate pores in model membranes. *Biophys. J* **99**, 153-162 (2010).
  170. Sarko, D. et al. The Pharmacokinetics of Cell-Penetrating Peptides. *Mol Pharm* (2010).doi:10.1021/mp100223d
  171. Simon, M.J., Kang, W.H., Gao, S., Banta, S. & Morrison, B. Increased delivery of TAT across an endothelial monolayer following ischemic injury. *Neurosci. Lett* **486**, 1-4 (2010).
  172. Kilic, E., Dietz, G.P.H., Hermann, D.M. & Bähr, M. Intravenous TAT-Bcl-Xl is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Ann. Neurol* **52**, 617-622 (2002).
  173. Kilic, U., Kilic, E., Dietz, G.P.H. & Bähr, M. Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* **34**, 1304-1310 (2003).
  174. Sawicka, M., Kalinowska, M., Skierski, J. & Lewandowski, W. A review of selected anti-tumour therapeutic agents and reasons for multidrug resistance occurrence. *J. Pharm. Pharmacol* **56**, 1067-1081 (2004).
  175. Rousselle, C. et al. Enhanced delivery of doxorubicin into the brain via a peptide-vector-mediated strategy: saturation kinetics and specificity. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **296**, 124-131 (2001).
  176. Mazel, M. et al. Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance. *Anticancer Drugs* **12**, 107-116 (2001).
  177. Liang, J.F. & Yang, V.C. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **15**, 5071-5075 (2005).
  178. Aroui, S., Brahim, S., Waard, M.D. & Kenani, A. Cytotoxicity, intracellular distribution

- and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: a comparative study. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **391**, 419-425 (2010).
179. Zheng, Z., Aojula, H. & Clarke, D. Reduction of doxorubicin resistance in P-glycoprotein overexpressing cells by hybrid cell-penetrating and drug-binding peptide. *J Drug Target* **18**, 477-487 (2010).
  180. Sherr, C.J. & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103-112 (2002).
  181. Vousden, K.H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 594-604 (2002).
  182. Harbour, J.W., Worley, L., Ma, D. & Cohen, M. Transducible peptide therapy for uveal melanoma and retinoblastoma. *Arch. Ophthalmol* **120**, 1341-1346 (2002).
  183. Datta, K., Sundberg, C., Karumanchi, S.A. & Mukhopadhyay, D. The 104-123 amino acid sequence of the beta-domain of von Hippel-Lindau gene product is sufficient to inhibit renal tumor growth and invasion. *Cancer Res* **61**, 1768-1775 (2001).
  184. Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304 (1997).
  185. Fulda, S., Wick, W., Weller, M. & Debatin, K. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat. Med* **8**, 808-815 (2002).
  186. Zhong, H. et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* **59**, 5830-5835 (1999).
  187. Harada, H., Kizaka-Kondoh, S. & Hiraoka, M. Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment. *Breast Cancer* **13**, 16-26 (2006).
  188. Anderson, D.C. et al. Tumor cell retention of antibody Fab fragments is enhanced by an attached HIV TAT protein-derived peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **194**, 876-884 (1993).
  189. Hu, M., Wang, J., Chen, P. & Reilly, R.M. HIV-1 Tat peptide immunoconjugates differentially sensitize breast cancer cells to selected antiproliferative agents that induce the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF-1/CIP-1. *Bioconjug. Chem* **17**, 1280-1287 (2006).
  190. Niesner, U. et al. Quantitation of the Tumor-Targeting Properties of Antibody Fragments Conjugated to Cell-Permeating HIV-1 TAT Peptides. *Bioconjugate Chemistry* **13**, 729-736 (2002).
  191. Yagi, N., Yano, Y., Hatanaka, K., Yokoyama, Y. & Okuno, H. Synthesis and evaluation of a novel lipid-peptide conjugate for functionalized liposome. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **17**, 2590-2593 (2007).
  192. Torchilin, V.P. et al. Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 1972-1977 (2003).
  193. Smith, C.M. et al. The effect of static magnetic fields and tat peptides on cellular and nuclear uptake of magnetic nanoparticles. *Biomaterials* **31**, 4392-4400 (2010).
  194. Bakker, W.H. et al. [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life Sci* **49**, 1583-1591 (1991).
  195. Shen, D., Liang, K., Ye, Y., Tetteh, E. & Achilefu, S. Modulation of nuclear internalization of Tat peptides by fluorescent dyes and receptor-avid peptides. *FEBS Lett* **581**, 1793-1799 (2007).
  196. Danen-Van Oorschot, A.A. et al. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 5843-5847

- (1997).
197. Guelen, L. et al. TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells. *Oncogene* **23**, 1153-1165 (2004).
  198. Bidwell, G.L., Fokt, I., Priebe, W. & Raucher, D. Development of elastin-like polypeptide for thermally targeted delivery of doxorubicin. *Biochem. Pharmacol* **73**, 620-631 (2007).
  199. Sturzu, A. et al. Cellular uptake of cationic gadolinium-DOTA peptide conjugates with and without N-terminal myristoylation. *Amino Acids* **37**, 249-255 (2009).
  200. Zhao, M., Kircher, M.F., Josephson, L. & Weissleder, R. Differential conjugation of tat peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on cellular uptake. *Bioconjug. Chem* **13**, 840-844 (2002).
  201. Polyakov, V. et al. Novel Tat-peptide chelates for direct transduction of technetium-99m and rhenium into human cells for imaging and radiotherapy. *Bioconjug. Chem* **11**, 762-771 (2000).
  202. Zhang, X., Dinh, A., Cronin, J., Li, S. & Reiser, J. Cellular uptake and lysosomal delivery of galactocerebrosidase tagged with the HIV Tat protein transduction domain. *J. Neurochem* **104**, 1055-1064 (2008).
  203. Rapoport, N., Gao, Z. & Kennedy, A. Multifunctional nanoparticles for combining ultrasonic tumor imaging and targeted chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst* **99**, 1095-1106 (2007).
  204. Aarts, M. et al. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. *Science* **298**, 846-850 (2002).
  205. Cao, G. et al. In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J. Neurosci* **22**, 5423-5431 (2002).
  206. Begley, R., Liron, T., Baryza, J. & Mochly-Rosen, D. Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **318**, 949-954 (2004).
  207. Bright, R. et al. Protein kinase C delta mediates cerebral reperfusion injury in vivo. *J. Neurosci* **24**, 6880-6888 (2004).
  208. Myou, S. et al. Activation of group IV cytosolic phospholipase A2 in human eosinophils by phosphoinositide 3-kinase through a mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J. Immunol* **171**, 4399-4405 (2003).
  209. McCusker, C.T. et al. Inhibition of experimental allergic airways disease by local application of a cell-penetrating dominant-negative STAT-6 peptide. *J. Immunol* **179**, 2556-2564 (2007).
  210. Yeh, H., Yates, M.V., Mulchandani, A. & Chen, W. Visualizing the dynamics of viral replication in living cells via Tat peptide delivery of nuclease-resistant molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 17522-17525 (2008).
  211. Barry, M. & Bleackley, R.C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat. Rev. Immunol* **2**, 401-409 (2002).
  212. Tinega, A.N. et al. Fusion of a cell penetrating peptide from HIV-1 TAT to the Theileria parva antigen Tp2 enhances the stimulation of bovine CD8+ T cell responses. *Vet. Immunol. Immunopathol* **130**, 107-113 (2009).
  213. Kim, D.T. et al. Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J. Immunol* **159**, 1666-1668 (1997).
  214. Chen, X. et al. The delivery of HBcAg via Tat-PTD enhances specific immune response and inhibits Hepatitis B virus replication in transgenic mice. *Vaccine* **28**, 3913-3919 (2010).
  215. Faruque, O.M. et al. Cell-permeable peptide-based disruption of endogenous PKA-

- AKAP complexes: a tool for studying the molecular roles of AKAP-mediated PKA subcellular anchoring. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* **296**, C306-316 (2009).
216. Saar, K., Saar, H., Hansen, M., Langel, Ü. & Pooga, M. Distribution of CPP-Protein Complexes in Freshly Resected Human Tissue Material. *Pharmaceuticals* **3**, 621-635 (2010).
  217. Rudolph, C. et al. Oligomers of the arginine-rich motif of the HIV-1 TAT protein are capable of transferring plasmid DNA into cells. *J. Biol. Chem* **278**, 11411-11418 (2003).
  218. Rudolph, C. et al. Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharm. Res* **21**, 1662-1669 (2004).
  219. Manceur, A.P., Driscoll, B.D., Sun, W. & Audet, J. Selective enhancement of the uptake and bioactivity of a TAT-conjugated peptide inhibitor of glycogen synthase kinase-3. *Mol. Ther* **17**, 500-507 (2009).
  220. Liu, Z., Li, M., Cui, D. & Fei, J. Macro-branched cell-penetrating peptide design for gene delivery. *J Control Release* **102**, 699-710 (2005).
  221. Sakai Anion hopping of (and on) functional oligoarginines : from chloroform to cells. *Soft Matter* **2**, 636-641 (2006).
  222. Takeuchi, T. et al. Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem. Biol* **1**, 299-303 (2006).
  223. Guterstam, P. et al. Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1788**, 2509-2517 (2009).
  224. Li, L. et al. Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer. *Reprod. Fertil. Dev* **18**, 689-695 (2006).
  225. Shen, W. et al. Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method. *Mol. Reprod. Dev* **73**, 589-594 (2006).
  226. Wang, H., Zhong, C., Wu, J., Huang, Y. & Liu, C. Enhancement of TAT cell membrane penetration efficiency by dimethyl sulphoxide. *J Control Release* **143**, 64-70 (2010).
  227. Lee, S.H. et al. Enhancement of HIV-1 Tat fusion protein transduction efficiency by bog blueberry anthocyanins. *BMB Rep* **43**, 561-566 (2010).
  228. Yasuda, Y. et al. Characterization of new fluorogenic substrates for the rapid and sensitive assay of cathepsin E and cathepsin D. *J. Biochem* **125**, 1137-1143 (1999).
  229. Takayama, K. et al. Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas). *J Control Release* **138**, 128-133 (2009).
  230. Wollack, J.W. et al. Multifunctional prenylated peptides for live cell analysis. *J. Am. Chem. Soc* **131**, 7293-7303 (2009).
  231. Wollack, J.W. et al. Investigation of the sequence and length dependence for cell-penetrating prenylated peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **20**, 161-163 (2010).
  232. Ochocki, J.D., Igbavboa, U., Gibson Wood, W., Wattenberg, E.V. & Distefano, M.D. Enlarging the scope of cell-penetrating prenylated peptides to include farnesylated 'CAAX' box sequences and diverse cell types. *Chem Biol Drug Des* **76**, 107-115 (2010).
  233. Rothbard, J.B. et al. Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake. *J. Med. Chem* **45**, 3612-3618 (2002).
  234. Moulton, H.M., Nelson, M.H., Hatlevig, S.A., Reddy, M.T. & Iversen, P.L. Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides. *Bioconjug. Chem* **15**, 290-299 (2004).

235. McClorey, G., Moulton, H.M., Iversen, P.L., Fletcher, S. & Wilton, S.D. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther* **13**, 1373-1381 (2006).
236. Foged, C. et al. Cellular uptake and membrane-destabilising properties of alpha-peptide/beta-peptoid chimeras: lessons for the design of new cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 2487-2495 (2008).
237. Katayama, S., Hirose, H., Takayama, K., Nakase, I. & Futaki, S. Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *Journal of Controlled Release* **In Press, Corrected Proof**,
238. Missirlis, D., Khant, H. & Tirrell, M. Mechanisms of peptide amphiphile internalization by SJS-A-1 cells in vitro. *Biochemistry* **48**, 3304-3314 (2009).
239. Pham, W., Kircher, M.F., Weissleder, R. & Tung, C. Enhancing membrane permeability by fatty acylation of oligoarginine peptides. *Chembiochem* **5**, 1148-1151 (2004).
240. Pham, W. et al. Crossing the blood-brain barrier: a potential application of myristoylated polyarginine for in vivo neuroimaging. *Neuroimage* **28**, 287-292 (2005).
241. Ifediba, M.A., Medarova, Z., Ng, S., Yang, J. & Moore, A. siRNA delivery to CNS cells using a membrane translocation peptide. *Bioconjug. Chem* **21**, 803-806 (2010).
242. Fernández-Carneado, J. et al. Fatty acyl moieties: improving Pro-rich peptide uptake inside HeLa cells. *J. Pept. Res* **65**, 580-590 (2005).
243. Aussedat, B. et al. Modifications in the chemical structure of Trojan carriers: impact on cargo delivery. *Chem. Commun. (Camb.)* 1398-1400 (2008).doi:10.1039/b800433a
244. Nelson, A.R., Borland, L., Allbritton, N.L. & Sims, C.E. Myristoyl-based transport of peptides into living cells. *Biochemistry* **46**, 14771-14781 (2007).
245. Incani, V. et al. Palmitic acid substitution on cationic polymers for effective delivery of plasmid DNA to bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* **81**, 493-504 (2007).
246. Abbasi, M. et al. Palmitic acid-modified poly-L-lysine for non-viral delivery of plasmid DNA to skin fibroblasts. *Biomacromolecules* **8**, 1059-1063 (2007).
247. Abbasi, M., Uludag, H., Incani, V., Hsu, C.Y.M. & Jeffery, A. Further investigation of lipid-substituted poly(L-Lysine) polymers for transfection of human skin fibroblasts. *Biomacromolecules* **9**, 1618-1630 (2008).
248. Yuan, L., Wang, J. & Shen, W. Lipidization of human interferon-alpha: a new approach toward improving the delivery of protein drugs. *J Control Release* **129**, 11-17 (2008).
249. Delehanty, J.B. et al. Delivering quantum dot-peptide bioconjugates to the cellular cytosol: escaping from the endolysosomal system. *Integr Biol (Camb)* **2**, 265-277 (2010).
250. Khalil, I.A. et al. Mechanism of improved gene transfer by the N-terminal stearylization of octaarginine: enhanced cellular association by hydrophobic core formation. *Gene Ther* **11**, 636-644 (2004).
251. Tönges, L. et al. Stearylized octaarginine and artificial virus-like particles for transfection of siRNA into primary rat neurons. *RNA* **12**, 1431-1438 (2006).
252. Mäe, M. et al. A stearylized CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *Journal of Controlled Release* **134**, 221-227 (2009).
253. Lehto, T. et al. Delivery of nucleic acids with a stearylized (RxR)<sub>4</sub> peptide using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release* **141**, 42-51 (2010).
254. Niidome, T. et al. Influence of lipophilic groups in cationic alpha-helical peptides on their abilities to bind with DNA and deliver genes into cells. *J. Pept. Res* **54**, 361-367 (1999).
255. Futaki, S. et al. Stearylized arginine-rich peptides: a new class of transfection systems. *Bioconjug. Chem* **12**, 1005-1011 (2001).

256. Prata, C.A.H. et al. Lipophilic Peptides for Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry* **19**, 418-420 (2008).
257. Bijsterbosch, M.K. et al. Delivery of cholesteryl-conjugated phosphorothioate oligodeoxynucleotides to Kupffer cells by lactosylated low-density lipoprotein. *Biochem. Pharmacol* **62**, 627-633 (2001).
258. Bijsterbosch, M.K. et al. bis-Cholesteryl-conjugated phosphorothioate oligodeoxynucleotides are highly selectively taken up by the liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **302**, 619-626 (2002).
259. Wolfrum, C. et al. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat. Biotechnol* **25**, 1149-1157 (2007).
260. Brigui, I., Djavanbakht-Samani, T., Jollès, B., Pigaglio, S. & Laigle, A. Minimally modified phosphodiester antisense oligodeoxyribonucleotide directed against the multidrug resistance gene *mdr1*. *Biochem. Pharmacol* **65**, 747-754 (2003).
261. Jeong, H.S. et al. Cholesterol-linked pyrene excimer molecular beacon with enhanced cell permeability. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 351-352 (2008).
262. Joshi, R., Mishra, R., Pohmann, R. & Engelmann, J. MR contrast agent composed of cholesterol and peptide nucleic acids: Design, synthesis and cellular uptake. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 2238-2241 (2010).
263. Furgeson, D.Y., Chan, W.S., Yockman, J.W. & Kim, S.W. Modified linear polyethylenimine-cholesterol conjugates for DNA complexation. *Bioconjug. Chem* **14**, 840-847 (2003).
264. Lee, M., Rentz, J., Han, S., Bull, D.A. & Kim, S.W. Water-soluble lipopolymer as an efficient carrier for gene delivery to myocardium. *Gene Ther* **10**, 585-593 (2003).
265. Yockman, J.W., Maheshwari, A., Han, S. & Kim, S.W. Tumor regression by repeated intratumoral delivery of water soluble lipopolymers/p2CMVmIL-12 complexes. *J Control Release* **87**, 177-186 (2003).
266. Guo, X.D. et al. Cationic micelles self-assembled from cholesterol-conjugated oligopeptides as an efficient gene delivery vector. *Biomaterials* **29**, 4838-4846 (2008).
267. Ayame, H., Morimoto, N. & Akiyoshi, K. Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery. *Bioconjug. Chem* **19**, 882-890 (2008).
268. Ingallinella, P. et al. Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **106**, 5801-5806 (2009).
269. Vivès, E. & Lebleu, B. One-pot labeling and purification of peptides and proteins with fluorescein maleimide. *Tetrahedron Letters* **44**, 5389-5391 (2003).
270. Mizuno, T., Miyashita, M. & Miyagawa, H. Cellular internalization of arginine-rich peptides into tobacco suspension cells: a structure-activity relationship study. *J. Pept. Sci* **15**, 259-263 (2009).
271. Fischer, R., Köhler, K., Fotin-Mleczek, M. & Brock, R. A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J. Biol. Chem* **279**, 12625-12635 (2004).
272. Amblard, M., Fehrentz, J., Martinez, J. & Subra, G. Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol. Biotechnol* **33**, 239-254 (2006).
273. Zahariev, P. Synthesis of 'difficult' peptides free of aspartimide and related products, using peptoid methodology. 4121-4124 (2006).
274. Stathopoulos, P., Papas, S., Kostidis, S. & Tsikaris, V. Alpha- and beta- aspartyl peptide ester formation via aspartimide ring opening. *J. Pept. Sci* **11**, 658-664 (2005).
275. Ruczyński, J., Lewandowska, B., Mucha, P. & Rekowski, P. Problem of aspartimide formation in Fmoc-based solid-phase peptide synthesis using Dmab group to protect side chain of aspartic acid. *J. Pept. Sci* **14**, 335-341 (2008).

276. Mergler, M., Dick, F., Sax, B., Weiler, P. & Vorherr, T. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part I. *J. Pept. Sci* **9**, 36-46 (2003).
277. Mergler, M., Dick, F., Sax, B., Stähelin, C. & Vorherr, T. The aspartimide problem in Fmoc-based SPPS. Part II. *J. Pept. Sci* **9**, 518-526 (2003).
278. Lauer Sequence dependance of aspartimide formation during 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis.
279. Palasek, S.A., Cox, Z.J. & Collins, J.M. Limiting racemization and aspartimide formation in microwave-enhanced Fmoc solid phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci* **13**, 143-148 (2007).
280. Afrimzon, E. et al. Intracellular esterase activity in living cells may distinguish between metastatic and tumor-free lymph nodes. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 213-224 (2008).
281. Jones, K.H. & Senft, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem* **33**, 77-79 (1985).
282. Peak, E., Chalmers, I.W. & Hoffmann, K.F. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e759 (2010).
283. Rotman, B. & Papermaster, B.W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **55**, 134-141 (1966).
284. Ross, D.D. et al. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res* **49**, 3776-3782 (1989).
285. Futaki, S. et al. 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).
286. Clarke, J.M., Gillings, M.R., Altavilla, N. & Beattie, A.J. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing natural products for antimicrobial activity. *J. Microbiol. Methods* **46**, 261-267 (2001).
287. Burke Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. **20**, 794-801 (1974).
288. Al-Taei, S. et al. Intracellular traffic and fate of protein transduction domains HIV-1 TAT peptide and octaarginine. Implications for their utilization as drug delivery vectors. *Bioconjug. Chem* **17**, 90-100 (2006).

Le peptide Tat est un des "cell penetrating peptides" (CPP) les plus utilisés pour l'internalisation cellulaire de diverses molécules cargos. La molécule chimérique (Tat-cargo) induit une réponse biologique plus efficace comparée au cargo seul. Cependant, en marquant le peptide Tat à l'iode 125, il a été déterminé que seulement moins de 1 % de la quantité initiale de peptide est internalisé. Il y a donc une opportunité d'augmenter l'efficacité de cette internalisation. L'étape cruciale du processus d'internalisation est le passage transmembranaire. Cette thèse présente l'évaluation de l'impact d'un groupement hydrophobe intégré en différentes positions au peptide Tat, afin de favoriser son interaction avec la membrane. Un acide aminé modifié chimiquement comportant un groupement cholestéryle a été développé dans ce sens. Cet aminoacide peut être intégré en toute position du peptide Tat. Différentes positions au sein du peptide Tat ont été cholestérylées et l'effet sur le taux d'internalisation a été étudié par cytométrie en flux et par comptage suite au radiomarquage des peptides à l'iode 125.

L'ajout de cholestérol en position centrale du peptide Tat induit une efficacité d'internalisation supérieure d'un facteur 30 alors qu'une augmentation moindre est observée suite à l'ajout du groupement hydrophobe en positions latérales, N- ou C-terminale.

Discipline : Chimie – Biologie

Mots-clés : Cell Penetrating Peptide, TAT, Hydrophobisation, Cholestérol

Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Parc Euromédecine, rue des Apothicaires 34298 Montpellier.

Equipe : Immunociblage et Radiobiologie en Oncologie