

tion olfactive. Lors de plusieurs études menées au cours des années 2000, on a appris aux abeilles à associer une odeur à une récompense sucrée et on a observé le rôle des corps pédonculés dans la mémorisation : lorsque cette structure cérébrale était détruite ou inhibée par des substances chimiques, les abeilles ne parvenaient plus à mémoriser les odeurs.

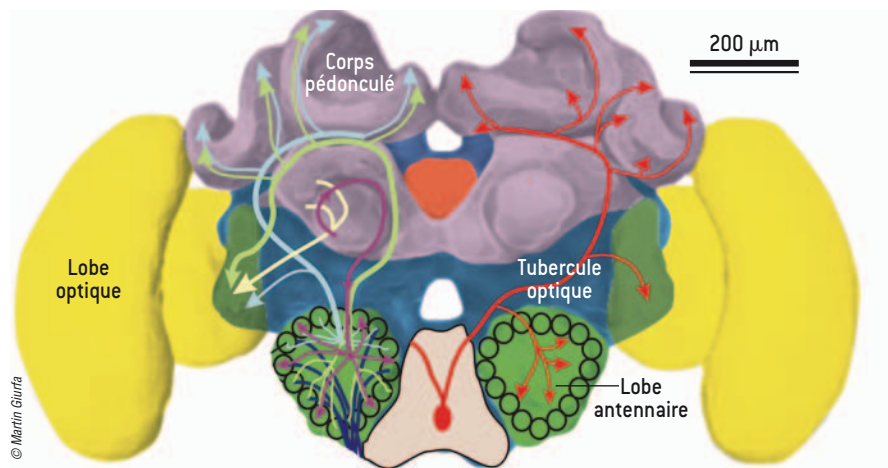
Pour trouver les bases neuronales des concepts, la première étape est donc de vérifier l'implication des corps pédonculés. Plusieurs laboratoires pensent lancer des projets en ce sens dans l'année à venir. Ils devraient obtenir des résultats au cours des deux ou trois prochaines années.

Comment observer le cerveau des abeilles en fonctionnement ? Les techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont inapplicables, car leur résolution est de l'ordre du millimètre, et le cerveau de l'abeille mesure moins d'un millimètre cube. En revanche, la robustesse de l'abeille autorise les méthodes invasives. On réalise donc de l'imagerie cérébrale en ouvrant la cuticule (la carapace) du crâne (une opération indolore, cette cuticule n'étant pas innervée), puis en injectant un colorant dans le cerveau : cette substance se colore en présence des ions calcium libérés par les neurones lorsqu'ils émettent des impulsions électriques. On observe alors le cerveau de l'abeille au microscope (voir la figure 3).

Observer le cerveau des abeilles

On utilise également l'électrophysiologie : cette technique consiste à mesurer directement l'activité de neurones et d'ensembles de neurones en implantant des électrodes dans le cerveau des insectes. La pointe de l'électrode est placée soit à la surface du neurone, soit à l'intérieur.

La seule limitation, en passe d'être résolue, est la difficulté d'étudier des apprentissages complexes sur des abeilles immobilisées en laboratoire. Cette immobilisation est nécessaire pour l'imagerie cérébrale et l'enregistrement de l'activité du cerveau. Or une abeille immobilisée peine à apprendre de simples couleurs et est incapable de mémoriser des concepts relationnels. Une solution en cours de développement serait d'utiliser des simulateurs de vol ou de marche, qui donneraient l'impression d'un mouvement libre à l'abeille immobilisée.



5. LES CORPS PÉDONCULÉS (en violet) pourraient être l'aire cérébrale responsable des concepts relationnels chez l'abeille. En effet, ils sont très développés et reçoivent des informations de multiples zones du cerveau – à l'instar du cortex préfrontal des primates, qui sous-tend les fonctions cognitives supérieures chez ces animaux.

Des dispositifs de ce type ont déjà été développés par plusieurs équipes de l'Université de Queensland, en Australie. Dans l'un d'eux, l'abeille est collée à une tige qui la maintient sur une boule tournant quand elle marche. L'analyse des mouvements de la boule, maintenue en suspension par un flux d'air, renseigne sur la direction dans laquelle l'abeille veut se diriger et sur sa vitesse. Nous voudrions utiliser un simulateur de marche de ce type, avec un écran cylindrique où serait projetée une image qui bougerait en fonction des mouvements de l'abeille. Le simulateur de marche semble suffire à autoriser des apprentissages complexes et est plus simple et moins coûteux qu'un simulateur de vol.

En parallèle, des modélisations de ces apprentissages devront être réalisées pour comprendre leurs fondements neuronaux. Dans une telle modélisation, un neurone virtuel intègre des stimulations excitatrices ou inhibitrices en provenance d'autres neurones. Quand un certain seuil d'excitation est atteint, il envoie un message excitateur ou inhibiteur à d'autres neurones.

En 2011, l'équipe de Barbara Webb, de l'Université d'Édimbourg, en Écosse, a obtenu des premiers résultats pour des apprentissages simples (la mémorisation d'odeurs) chez la drosophile, dont le cerveau est bien moins complexe que celui de l'abeille. Dans sa simulation, la perception d'une molécule odorante entraînait l'activation d'un ensemble de neurones, chacun réagissant à une caractéristique chimique particulière. Lorsque cet ensemble était activé en même temps que les

neurones détectant la récompense sucrée (ce qui se produit quand les abeilles trouvent cette récompense en même temps qu'elles perçoivent l'odeur), les synapses connectant les neurones en jeu étaient potentialisées, c'est-à-dire qu'elles devenaient plus efficaces pour transmettre le signal. Après quelques essais virtuels, l'activation du circuit neuronal codant l'odeur suffisait à activer celui de la détection du sucre. C'est ainsi qu'un insecte réel serait attiré vers la source de l'odeur.

B. Webb a déduit de ses travaux qu'un grand nombre de neurones n'est pas nécessaire pour mémoriser une odeur : c'est le nombre de synapses qui importe. Des projets sont en cours d'élaboration pour simuler l'encodage d'apprentissages plus complexes, tels ceux de catégories perceptives, chez les abeilles.

Le cas des abeilles montre que la manipulation de concepts relationnels n'est pas l'apanage des vertébrés. L'étude de ces facultés chez l'insecte devrait nous renseigner sur la complexité cérébrale minimale permettant d'atteindre de tels niveaux cognitifs. Enfin, elle ouvre des perspectives dans le domaine de l'intelligence artificielle et de la reconnaissance visuelle par ordinateur. La rapidité avec laquelle l'abeille apprend les concepts relationnels montre qu'elle a développé des mécanismes cérébraux efficaces pour effectuer cette tâche. Quand nous les aurons mieux compris, nous pourrions nous en inspirer pour concevoir des logiciels de reconnaissance visuelle susceptibles d'être utilisés notamment dans des robots miniatures. ■

La membrane des cellules est infranchissable pour nombre de molécules présentant un intérêt thérapeutique. De petits fragments de protéines découverts dans les années 1990 pourraient leur permettre d'accéder à l'intérieur des cellules.

Des CLÉS moléculaires pour les cellules

Ces dernières années, le nombre de nouvelles molécules ayant un intérêt thérapeutique n'a cessé de croître. Toutefois, un obstacle majeur limite le développement de nouveaux médicaments: parmi ces molécules, rares sont celles qui franchissent la membrane des cellules et en atteignent l'intérieur, où elles pourront remplir leur rôle. Couplage avec des lipides, ajout de molécules agissant sur les membranes cellulaires, perméabilisation électrique des tissus *in vivo*, diverses méthodes ont été développées pour faciliter l'entrée de ces molécules dans les cellules. Toutefois, ces méthodes perturbent les cellules ou restent peu efficaces.

Une autre voie, cependant, semble prometteuse: certains fragments de protéines – ou peptides – facilitent l'absorption, par les cellules, des molécules auxquelles ils sont liés, et ce sans perturber la membrane cellulaire. L'histoire de leur découverte a été riche en rebondissements, et la piste a même failli être abandonnée. Néanmoins, les multiples preuves de son efficacité et de son innocuité laissent penser qu'elle pourrait devenir un outil important de la recherche pharmaceutique.

L'intérêt pour ces peptides particuliers a commencé au début des années 1990, lorsque deux biologistes de l'École normale

Roland Brock et Wouter Verdurmen

L'ESSENTIEL

- La membrane des cellules ne laisse passer que peu de molécules, en général de petite taille et non chargées.
- Les biologistes cherchent un moyen de faire pénétrer de façon ciblée dans certaines cellules des molécules plus grandes à effet thérapeutique, telles que de l'ADN ou des protéines.
- Des fragments de protéines nommés peptides de pénétration cellulaire apportent une solution prometteuse, car même associés à une macromolécule, ils entrent facilement dans les cellules.

supérieure, à Paris, Alain Prochiantz et Alain Joliot, ont découvert une étonnante propriété d'une protéine impliquée dans le développement des neurones chez la drosophile et nommée antennapedia. La protéine induit la production de cellules neuronales à partir de cellules non spécialisées – un processus nommé différenciation neuronale –, et les deux biologistes cherchaient à préciser le mécanisme en jeu en reproduisant son action sur des cellules en culture.

Pour introduire la protéine dans ces cellules, ils ont rendu les membranes cellulaires légèrement perméables par addition de certaines substances, car dans des conditions normales de culture, les cellules n'absorbent pas facilement des molécules aussi grandes que des protéines. À leur grande surprise, cependant, A. Prochiantz et A. Joliot ont constaté que la protéine antennapedia pénétrait même dans les cellules intactes, non perméabilisées, où elle activait la différenciation neuronale. La protéine avait donc atteint sa cible, le noyau cellulaire, où elle jouait son rôle dans la régulation des gènes.

Peu après cette découverte, en 1994, la même équipe a montré qu'antennapedia traverse la membrane des cellules grâce à une petite région de la protéine. Et qu'un

peptide de 16 acides aminés (les constituants des protéines) synthétisé à l'image de ce domaine était aussi capable de franchir la membrane des cellules. La synthèse d'un fragment de protéine aussi court est facile et rentable. De la description de ce « peptide de pénétration cellulaire » (*cell penetrating peptide* ou CPP) nommé pénétratine par ses découvreurs à la recherche d'applications biotechnologiques, il n'y avait qu'un pas : si ce peptide, une fois couplé à d'autres molécules, assurait leur entrée dans les cellules, les perspectives seraient nombreuses. Le premier succès fut le transport d'un peptide qui inhibe une enzyme, la protéine kinase C.

Les biologistes ont aussi recherché les propriétés structurelles conférant au peptide pénétratine sa capacité de transporteur. Ils eurent rapidement la réponse. Deux ingrédients étaient nécessaires pour une absorption efficace des molécules dans les cellules : des chaînes d'acides aminés portant une charge électrique positive et quelques longues chaînes d'acides aminés hydrophobes.

Des peptides qui pénètrent dans les cellules

Dès 1988, Maurice Green et Paul Lowenstein, à l'Université de Saint Louis, dans le Missouri aux États-Unis, ainsi qu'Alan Frankel et Carl Pabo, de l'Université Johns Hopkins, à Baltimore dans le Maryland, avaient publié des observations similaires avec la protéine TAT du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) : les cellules absorbaient spontanément la protéine, qui y activait alors la transcription des gènes du virus.

L'équipe de Bernard Lebleu, de l'Institut de génétique moléculaire de Montpellier, identifia par la suite dans la protéine TAT un domaine de 11 acides aminés responsable du processus. Ce fragment a ensuite été étudié plus en détail, lui aussi en tant que peptide de pénétration cellulaire.

Les observations de la pénétration dans les cellules ont immédiatement suscité un grand intérêt en biotechnologie, car elles réfutaient un dogme selon lequel les grosses molécules hydrophiles (ayant une affinité pour l'eau) ne pouvaient pas accéder au milieu intérieur de la cellule, le cytoplasme, sans endommager la membrane. C'était ce qu'avaient montré notamment des essais antérieurs, réalisés avec des peptides et des polymères agissant sur la membrane. Ces molécules, qui ressemblent par certaines propriétés aux peptides de pénétration cellulaire, facilitent certes l'entrée de protéines dans les cellules, mais ce faisant, elles perturbent les membranes, parfois s'y incorporant et modifiant leurs propriétés jusqu'à les détruire.

Ainsi, Hugues Ryser et Ronald Hancock, de l'Université Harvard à Boston, avaient montré dès 1965 qu'en présence de chaînes composées de nombreux acides aminés portant une charge positive – une succession d'acides aminés lysine (ou polylysine), par exemple –, la protéine albumine pénètre plus de 50 fois mieux dans les cellules. Et la même expérience reproduite dans les années 1970 avec la polylysine couplée à des protéines et à des molécules plus petites que l'albumine a donné des résultats similaires. Toutefois, il s'est révélé que les polymères de lysine endommagent les cellules en raison de leur effet sur la membrane, à l'instar des peptides testés avant la découverte des peptides de pénétration cellulaire.

En revanche, le transport de molécules couplées à ces nouveaux peptides est bien moins perturbant pour les cellules. Ces peptides rendent le cytoplasme accessible à des molécules qui, de par leurs propriétés, ne peuvent diffuser à travers la membrane et pour lesquelles il n'existe pas non plus de canaux ou de transporteurs membranaires. Ces molécules sont par exemple de courtes séquences d'ADN ou d'ARN – des oligonucéotides –, tels les petits ARN interférants (ARNi) qui contrôlent l'activité des gènes, mais aussi des protéines, des peptides et même des nanoparticules (voir la figure 2).

■ LES AUTEURS



Roland BROCK, professeur de biochimie, dirige le Département de biochimie du Centre médical de l'Université Radboud, à Nimègue aux Pays-Bas.

Wouter VERDURMEN a soutenu sa thèse en octobre dernier au sein de l'équipe de Roland Brock. Il est actuellement postdoctorant à l'Université de Zurich, en Suisse.

■ BIBLIOGRAPHIE

P. Boisguerin *et al.*, CPP-conjugated anti-apoptotic peptides as therapeutic tools of ischemia-reperfusion injuries, *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, pp. 2970-2978, 2013.

F. Milletti, Cell-penetrating peptides : classes, origin and current landscape, *Drug Discovery Today*, vol. 17, pp. 850-860, 2012.

S. El Andaloussi *et al.*, Cell-penetrating peptides-based strategies for the delivery of splice redirecting antisense oligonucleotides, *Methods Mol. Biol.*, vol. 764, pp. 75-89, 2011.

W. P. Verdurmen *et al.*, Biological responses towards cationic peptides and drug carriers, *Trends in Pharm. Sc.*, vol. 32, pp. 116-124, 2011.

P. Jarver *et al.*, In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery, *Trends in Pharm. Sc.*, vol. 31, pp. 528-535, 2010.

Les peptides de pénétration cellulaire constituent donc une aide universelle pour importer des macromolécules à visée thérapeutique dans les cellules. La membrane cellulaire ne laisse passer que très peu de molécules. De par sa structure et ses propriétés chimiques, elle sert de barrière hautement sélective et contrôle ainsi la composition du cytoplasme. Alors que les surfaces interne et externe de la membrane portent des charges électriques et sont hydrophiles, l'intérieur de la membrane, constitué d'acides gras, est hydrophobe. C'est pourquoi seules de petites molécules non chargées et hydrophobes réussissent à traverser la membrane : les molécules chargées sont repoussées ou se collent à la surface de la membrane, tandis que les molécules hydrophiles sont repoussées par les chaînes grasses dont est formé l'intérieur de la membrane. Toutes les molécules chargées ou, plus précisément, les grandes molécules polaires (c'est-à-dire dont les charges sont réparties de façon asymétrique) nécessitent des canaux ou des molécules de transport pour franchir la membrane.

Une absorption directe ?

Or il n'existe aucun transporteur de ce type pour les macromolécules telles que les oligonucléotides, les peptides ou les protéines. Leur seul moyen d'entrer dans la cellule est l'endocytose. Au cours de ce processus, les cellules capturent des molécules et des particules du milieu qui les entoure à l'aide de récepteurs à leur surface (ou parfois sans récepteur), puis les enferment dans des vacuoles formées à partir de la membrane, nommées endosomes. Les endosomes fusionnent avec d'autres vacuoles, les lysosomes, lesquelles contiennent des enzymes qui dégradent les macromolécules telles que les protéines ou l'ADN. De ce fait, seuls les éléments constitutifs de ces macromolécules, c'est-à-dire des acides aminés ou des nucléotides, arrivent dans le cytoplasme. Cette voie d'accès est donc peu utile pour importer des molécules thérapeutiques : avant que ces dernières puissent remplir leur fonction, la plupart sont détruites.

On comprend d'autant mieux l'enthousiasme suscité par la découverte des peptides de pénétration cellulaire que les premières recherches sur leur mode d'entrée ont permis de conclure à une importation

directe de ces peptides et de leur chargement dans le cytoplasme, sans endocytose. D'après le modèle de l'époque, les peptides provoquaient une perturbation minime de la structure membranaire, suffisante pour laisser passer le peptide et son chargement à travers la membrane jusque dans le cytoplasme, mais trop faible pour perturber le fonctionnement de la cellule.

Une série de résultats étayait le modèle. Notamment, deux observations allaient à l'encontre d'un mécanisme d'endocytose par récepteur. D'une part, que le peptide de pénétration cellulaire ait été synthétisé à partir d'acides aminés dits L ou à partir de leurs images dans un miroir (acides aminés dits D), son absorption restait constante. Or un récepteur spécifique du peptide L ne peut reconnaître le peptide D correspondant. D'autre part, même à des concentrations élevées, les quantités de molécules transférées dans la cellule ne tendaient pas vers un maximum : le mécanisme d'entrée n'était jamais saturé au point de se bloquer, contrairement à l'endocytose par récepteur, limitée par le nombre de récepteurs à la surface de la cellule.

En outre, l'importation n'était pas non plus perturbée par des conditions qui bloquent l'endocytose, telles que l'augmentation de la rigidité de la membrane par refroidissement ou la suppression des molécules qui fournissent l'énergie nécessaire au processus. Ainsi, alors que l'endocytose est stoppée par une baisse de la température des cellules à 4 °C ou par une pénurie des molécules qui transportent l'énergie, l'absorption *via* des peptides de pénétration cellulaire n'était pas perturbée. Enfin, des études physicochimiques visant à déterminer les interactions des peptides avec la membrane, ainsi que des expériences réalisées sur des modèles de membrane confortaient l'hypothèse d'une absorption directe. Ainsi, à la fin des années 1990, le mécanisme d'importation des peptides de pénétration cellulaire paraissait élucidé.

La pénétration se fait par endocytose

Les choses se sont alors compliquées. Tout d'abord, en 1999, nous avons obtenu un résultat inattendu. Nous avons voulu utiliser de tels peptides pour étudier les interactions des protéines à l'intérieur des cellules, mais nos premiers travaux ont tout de suite remis en question la représenta-

tion établie, selon laquelle l'absorption par les cellules serait indépendante du chargement : dans nos expériences, les quantités importées variaient notablement lorsqu'on modifiait quelques acides aminés du peptide transporté.

Puis en 2003, une nouvelle étude de l'équipe de B. Lebleu a marqué un tournant dans la recherche sur les peptides de pénétration cellulaire. Les biologistes de Montpellier se sont aperçus que la technique qui permet de conserver les cellules entre lame et lamelle et de les observer au microscope, la fixation, influe sur la répartition des peptides dans la cellule. La fixation, qui agit par coagulation ou précipitation de certains composants cellulaires, consiste à immobiliser les cellules en les conservant dans un état le plus proche possible de leur état naturel. Or jusqu'alors, presque toutes

les expériences d'absorption de peptides avaient été analysées sur cellules fixées, car pour les besoins de la microscopie, les peptides étaient marqués par un colorant qui ne pouvait accéder au milieu intracellulaire qu'après fixation.

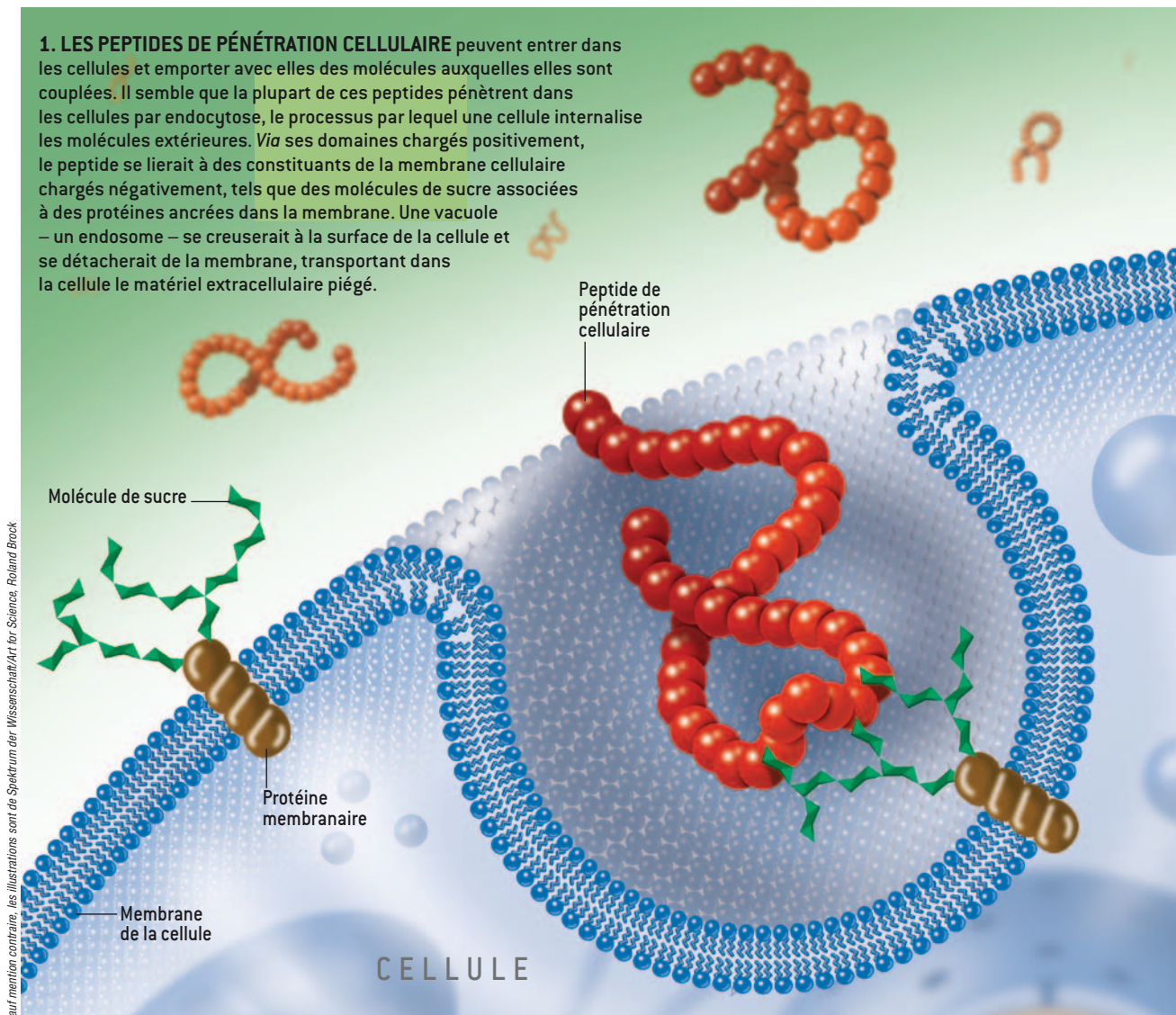
Ainsi, selon B. Lebleu et ses collègues, les preuves expérimentales d'une absorption directe reposaient en grande partie sur un effet secondaire de la fixation : ce processus endommage les membranes, ce qui permet aux peptides d'accéder au cytoplasme, qu'ils se soient trouvés à la surface de la cellule ou déjà à l'intérieur, au sein d'endosomes. Une fois dans le cytoplasme, les peptides se répartissent uniformément, puis se lient à des protéines. Ce scénario explique aussi pourquoi, dans les expériences précédentes, le froid ou le manque d'énergie n'avaient pas inhibé l'absorption : dans ces conditions,

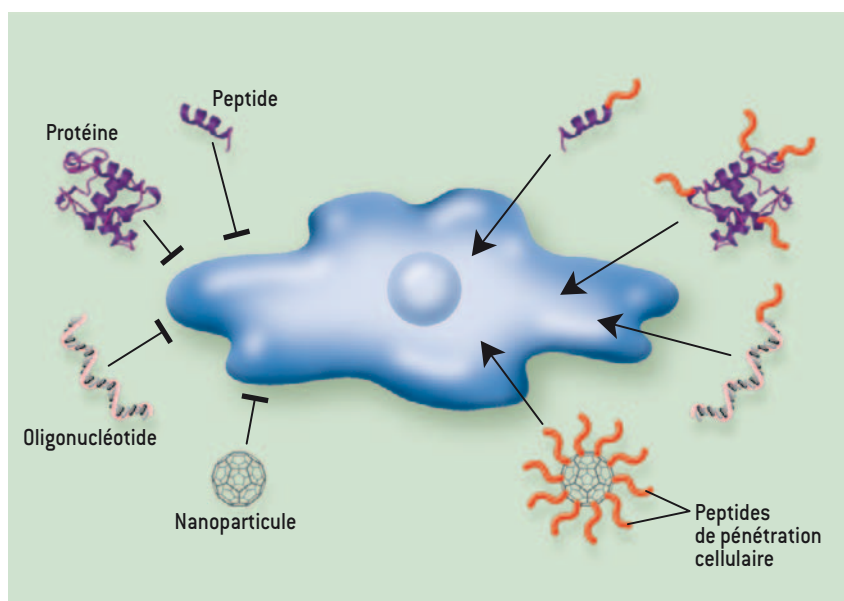
les peptides se fixaient à la face externe des cellules et accédaient ensuite à l'intérieur de la cellule grâce à la fixation.

En revanche, lorsque les biologistes ont reproduit l'expérience dans des cellules en culture, non fixées, avec des peptides couplés à une molécule fluorescente, ils ont observé au microscope des points lumineux révélant des vacuoles intracellulaires qui n'étaient autres que... des endosomes. Et lorsqu'ils bloquaient l'endocytose, par exemple par le froid, la coloration des endosomes était plus faible.

Cela signifie que les peptides pénètrent dans la cellule non pas en traversant directement la membrane, mais essentiellement par un mécanisme d'endocytose sans récepteur. En revanche, l'absorption de la protéine antennapedia semble bien directe, comme décrite dans les années 1990.

1. LES PEPTIDES DE PÉNÉTRATION CELLULAIRE peuvent entrer dans les cellules et emporter avec elles des molécules auxquelles elles sont couplées. Il semble que la plupart de ces peptides pénètrent dans les cellules par endocytose, le processus par lequel une cellule internalise les molécules extérieures. Via ses domaines chargés positivement, le peptide se lierait à des constituants de la membrane cellulaire chargés négativement, tels que des molécules de sucre associées à des protéines ancrées dans la membrane. Une vacuole – un endosome – se creuserait à la surface de la cellule et se détacherait de la membrane, transportant dans la cellule le matériel extracellulaire piégé.





2. DES MOLÉCULES HABITUELLEMENT INCAPABLES DE TRAVERSER la membrane cellulaire – peptides, protéines, oligonucléotides, et même nanoparticules – y parviennent à l'aide de peptides de pénétration cellulaire. Ce mécanisme élargit la recherche de nouveaux médicaments à toutes ces classes de molécules, alors qu'elle était cantonnée auparavant aux petites molécules, seules capables de traverser la membrane cellulaire.

D'autres recherches avaient indiqué l'existence d'une absorption par endocytose, mais ce fut cette étude-là qui réorienta profondément les recherches sur les peptides de pénétration cellulaire. Jusqu'alors, ces peptides étaient considérés avant tout comme des outils moléculaires d'utilisation simple. Et voilà qu'ils devenaient des éléments absorbés par endocytose, un processus complexe qui aboutit le plus souvent à une destruction, dans les lysosomes, des molécules absorbées avec eux. En outre, plusieurs expériences menées sur de tels peptides n'ont pas donné les résultats espérés, ce qui a renforcé les doutes concernant la méthode.

Ces revers auraient pu sonner la fin des recherches menées sur les peptides de pénétration cellulaire. Au lieu de cela, les scientifiques ont redoublé d'efforts dans des directions très diverses. La recherche sur ces peptides devint interdisciplinaire et inclut la chimie, la pharmacologie et la biologie cellulaire. Plusieurs facteurs ont contribué à ce développement surprenant.

D'une part, l'existence d'une absorption efficace par endocytose sans récepteur était en soi une découverte importante. D'autre part, des peptides de pénétration cellulaire avaient déjà fait leurs preuves. Il semblait donc que cela fonctionnait malgré tout. Le défi consistait désormais

à comprendre les causes du succès et à les transposer à d'autres situations. De plus, entre-temps avaient été mises au point des techniques pour libérer le contenu des endosomes dans le cytoplasme avant que les molécules internalisées ne soient dégradées dans les lysosomes. Il suffisait d'adapter ces stratégies aux conditions expérimentales des peptides de pénétration cellulaire.

Par ailleurs, le besoin d'un outil permettant de faire entrer des macromolécules dans les cellules se faisait de plus en plus pressant en pharmacologie. Notamment, des oligonucléotides permettant d'inactiver des gènes – en l'occurrence avant tout les ARN interférants évoqués plus haut – s'étaient révélés particulièrement prometteurs dans le traitement de certaines maladies, et on espérait les amener au contact de leur cible à l'aide de peptides de pénétration cellulaire. Plus que jamais, l'objectif était de s'affranchir des limites fixées par l'utilisation de petites molécules, afin de lancer le développement de nouveaux médicaments à base de macromolécules.

Près de 100 peptides identifiés

Depuis, un nombre croissant d'équipes, principalement en Europe, aux États-Unis et au Japon, ont identifié près de 100 peptides de pénétration cellulaire et des variantes de certains peptides déjà connus. Plusieurs mécanismes d'absorption ont été mis en évidence, qui dépendent du peptide, de son chargement et de la concentration utilisée. Par exemple, couplées à des peptides de pénétration cellulaire, des petites molécules peu hydrophiles, telles que les substances actives anticancéreuses, sont directement absorbées à travers la membrane. En revanche, dans le cas de macromolécules telles que des protéines, l'internalisation a lieu par endocytose. Par ailleurs, pour une raison encore inconnue, l'efficacité d'un peptide varie selon le type cellulaire. Mais un peptide bien choisi permettrait de cibler une population de cellules particulière, par exemple des cellules cancéreuses, ce qui diminuerait le risque d'effets indésirables.

Les processus moléculaires de l'absorption d'un peptide de pénétration cellulaire ne sont pas encore entièrement expliqués. Le peptide se fixe d'abord sur la membrane cellulaire, étape au cours de

Glossaire

Membrane cellulaire

Membrane qui entoure la cellule, composée d'une double couche de lipides dans laquelle s'insèrent diverses protéines (récepteurs, canaux, etc.).

Cytoplasme

Ensemble du matériel (hors noyau) que contient la cellule.

Peptide

Courte chaîne d'acides aminés, les constituants des protéines.

Oligonucléotide

Court fragment d'ADN ou d'ARN.

laquelle la liaison de domaines du peptide chargés positivement à des charges négatives présentes sur la membrane joue un rôle important. Ces charges négatives se trouvent par exemple sur des molécules de sucre, associées aux éléments constitutifs de la membrane (voir la figure 1). La façon exacte dont la fixation du peptide à la surface externe de la membrane entraîne ensuite l'absorption reste à découvrir. On sait seulement que certains peptides provoquent une réorganisation du squelette de la cellule, ou cytosquelette, un ensemble de filaments qui sous-tendent la membrane de la cellule et lui confèrent sa forme.

À l'intérieur des endosomes, une grande partie des molécules couplées aux peptides de pénétration cellulaire sont dégradées et peu arrivent intactes dans le cytoplasme. Leur quantité dépend du peptide utilisé (ce qui détermine de façon décisive la qualité du peptide en tant que facteur d'importation). C'est pourquoi les chercheurs ont développé des stratégies pour faciliter la libération du contenu des endosomes.

Deux stratégies sont utilisées. D'une part, des modifications structurales du peptide suffisent parfois à libérer les macromolécules associées dans le cytoplasme avant qu'elles n'atteignent les lysosomes. Elles consistent à ajouter au peptide des groupes chimiques qui réagissent à l'acidité, le contenu des endosomes étant plus acide (pH égal à 5) que le cytoplasme (pH égal à 7). D'autre part, on peut associer aux peptides de pénétration cellulaire des molécules qui déstabilisent la membrane des endosomes. Cette seconde stratégie a pris exemple sur le virus de la grippe, dont le matériel génétique, après endocytose, se libère très efficacement dans le cytoplasme, grâce à certains domaines protéiques qui déstabilisent les membranes.

Traverser la barrière hémato-encéphalique ?

La perspective de pouvoir introduire dans les cellules, grâce à ces peptides, des molécules jusqu'ici non utilisables en thérapeutique a permis aux chercheurs de procéder aussitôt aux premiers essais chez la souris. Lors d'une expérience clé de ce domaine de recherche, l'équipe de Steven Dowdy, qui travaillait alors à l'Institut médical Howard Hughes et à l'Université de Washington, aux États-Unis, a réussi à introduire dans les cellules de souris

Endocytose

Mécanisme par lequel la cellule internalise des molécules extérieures : des vacuoles remplies de liquide extracellulaire, les endosomes, se creusent à sa surface, se détachent et migrent dans la cellule.

Lysosome

Vacuole dans laquelle des protéines et des nucléotides sont dégradés en leurs constituants.

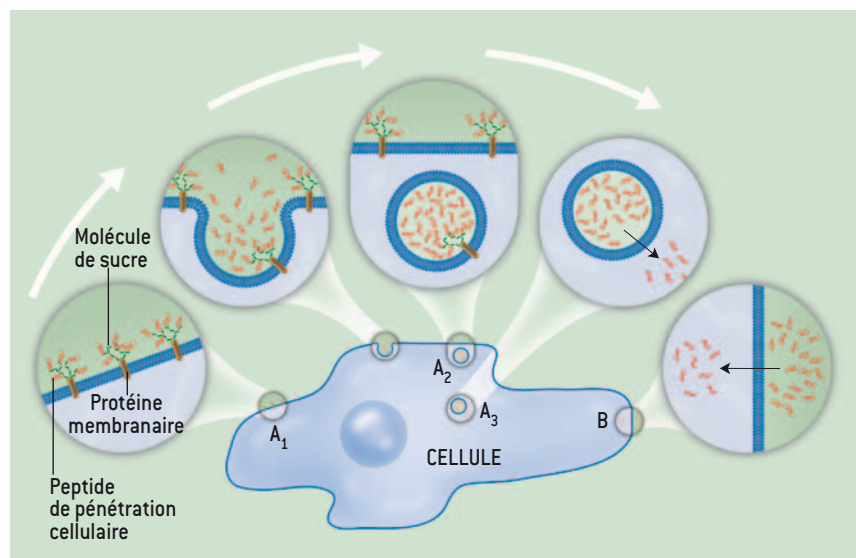
Épissage alternatif

Processus par lequel, après transcription d'un gène, l'intermédiaire – un ARN messager mature – est obtenu par excision de certains segments d'ARN. Une mutation du gène peut perturber son déroulement, de sorte que l'ARN messager produit ne permette pas la synthèse d'une protéine fonctionnelle.

une enzyme couplée au peptide TAT. Après avoir injecté l'enzyme à l'animal, les scientifiques l'ont détectée dans tous les tissus, y compris le cerveau. Cette étude suggère que l'enzyme, non seulement avait pénétré dans les cellules de tous les tissus, mais avait aussi franchi la barrière physiologique qui sépare le système nerveux central de la circulation sanguine – la barrière hémato-encéphalique, filtre particulièrement sélectif qui protège le cerveau des agents pathogènes. Ce résultat reste toutefois à confirmer.

Encouragés par ces premiers résultats, diverses équipes universitaires et entreprises de biotechnologie ont entrepris des études chez la souris et chez l'homme. La société américaine *Psorban* a été la première à tester un peptide hepta-arginine couplé à l'immunosuppresseur cyclosporine (cette molécule bloque la réponse immunitaire), pour une utilisation sur la peau en cas de psoriasis, une maladie auto-immune. Mais les résultats ont été décevants.

L'utilisation de nucléotides couplés à un peptide de pénétration cellulaire dans le traitement de la myodystrophie de Duchenne semble en revanche plus prometteuse. Cette maladie génétique entraîne une faiblesse musculaire à issue fatale, en particulier chez les garçons. L'objectif est de corriger un défaut d'épissage alternatif (le mécanisme qui permet de produire



3. LES PEPTIDES DE PÉNÉTRATION CELLULAIRE accèdent à l'intérieur de la cellule par différents mécanismes. Le principal est l'endocytose (A1 à A3). Des molécules présentant des charges positives se lient à la surface de la cellule grâce à la présence de sucres portant des charges négatives, localisés sur des protéines de la membrane (A1). Après endocytose (A2), les peptides et leur éventuel chargement accèdent au cytoplasme (A3). Un autre mécanisme, plus rare, est le passage direct à travers la membrane (B).

Vers des applications thérapeutiques

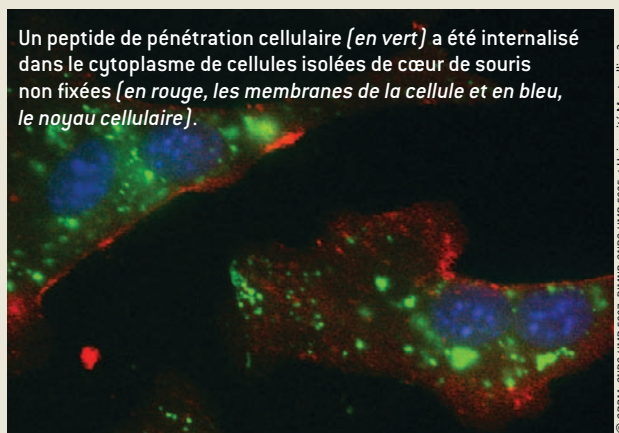
A Montpellier, deux groupes de recherche ont indépendamment débuté des travaux pionniers pour surmonter les problèmes d'internalisation de biomolécules en utilisant des peptides de pénétration cellulaire. Leurs études visent le traitement de diverses pathologies.

L'équipe de Bernard Lebleu a développé le peptide TAT (48-60) issu du virus de l'immunodéficience humaine, qui reste aujourd'hui l'un des peptides de pénétration cellulaire les plus étudiés. Cette équipe a aussi contribué à la caractérisation *in vitro* et *in vivo* de nouveaux peptides riches en acide aminé arginine, en collaboration avec l'équipe de Michael Gait, de l'Université de Cambridge. Ces peptides internalisés par endocytose sont associés à des molécules actives *via* une stratégie dite covalente mettant en jeu la formation d'une liaison chimique entre le peptide vecteur et la molécule à transférer dans les cellules. Deux exemples, en particulier, ont donné des résultats encourageants : des oligonucléotides construits pour empêcher la traduction anormale de séquences ARN dans le traitement de la

myopathie de Duchenne, et des peptides cardioprotecteurs pour le traitement des lésions du myocarde à la suite d'un infarctus. Dans les deux cas, des résultats prometteurs ont été obtenus après injection dans des modèles animaux, avec d'intéressantes perspectives d'applications cliniques.

De son côté, l'équipe de Gilles Divita a été la première à utiliser des vecteurs peptidiques pour le transport de biomolécules dans les cellules *via* une stratégie non covalente. Les peptides utilisés, dits amphipathiques, présentent à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe. Courts, ils sont capables de former des nanostructures non covalentes stables avec les molécules biologiques. Ces peptides permettent le transport de biomolécules dans de nombreux types cellulaires sans altérer leur fonction biologique, selon un mécanisme indépendant de l'endocytose, contrôlé par le potentiel électrique de la membrane et sa fluidité. Ces peptides vecteurs ont été utilisés avec succès *ex vivo* et *in vivo* pour transporter différents types de biomolécules actives (peptides, protéines, acides nucléiques, ARN interférants).

Un peptide de pénétration cellulaire (en vert) a été internalisé dans le cytoplasme de cellules isolées de cœur de souris non fixées (en rouge, les membranes de la cellule et en bleu, le noyau cellulaire).



© CRBM, CNRS UMR 5237, DIMNP, CNRS UMR 5235 et Université Montpellier 2

Aujourd'hui, ces deux équipes ont fusionné pour réunir leurs savoir-faire dans le développement de vecteurs peptidiques comme système de transport de biomolécules prometteuses sur le plan pharmacologique. L'une des principales difficultés restant à surmonter est le manque de spécificité tissulaire des peptides de pénétration cellulaire, c'est-à-dire l'absence de distinction entre les tissus sains et malades. Une piste envisagée est de les combiner avec des peptides conçus spécifiquement pour cibler une des-

termination cellulaire, en particulier les tissus cancéreux (*homing peptides*). L'adressage spécifique de l'ensemble peptide vecteur-molécule active dans certains types cellulaires est la seule façon d'assurer une répartition optimale des entités thérapeutiques dans les cellules malades tout en limitant leurs effets indésirables.

**Prisca Boisguerin,
Sébastien Deshayes,
Gilles Divita et Bernard Lebleu**
CRBM, CNRS UMR 5237,
DIMNP, CNRS UMR 5235
et Université Montpellier 2

plusieurs protéines à partir d'un même gène) intervenant dans la traduction d'un certain gène. Dans ce cas, des études pré-cliniques ont permis d'obtenir quelques succès. De plus, ni chez la souris ni chez l'homme, les peptides de pénétration cellulaire n'ont entraîné jusqu'ici d'effets indésirables, ce que confirme la très faible toxicité observée dans les expériences réalisées sur des cellules en culture.

Des peptides optimisés

La recherche sur les peptides de pénétration cellulaire est aujourd'hui active. Près de 20 ans après la première description des peptides et avec un nombre croissant d'études cliniques à l'appui, les efforts commencent à porter leurs fruits. On comprend mieux les mécanismes d'absorption, et les études cliniques permettent d'optimiser les peptides pour une éventuelle utilisation thérapeutique.

En particulier, des absorptions très efficaces de peptides couplés à des nucléotides

ont été obtenues, d'une part en modifiant de façon ciblée la séquence des acides aminés des peptides, d'autre part en greffant des groupes moléculaires supplémentaires sur leur séquence. C'est ainsi que l'équipe d'Ülo Langel, de l'Université de Stockholm, l'un des pionniers de la recherche sur les peptides de pénétration cellulaire, a amélioré considérablement l'importation de nucléotides en fixant des groupes de molécules de type chloroquine à de tels peptides. La chloroquine, un antipaludique, facilite la libération des molécules contenues dans les endosomes.

Malgré tous ces progrès, la route sera encore longue. La connaissance des mécanismes moléculaires de l'absorption des peptides de pénétration cellulaire reste insuffisante. Le développement de ces peptides s'effectue toujours par une succession d'essais, d'erreurs et d'ajustements, car le processus d'importation demeure trop complexe pour être directement exploitable dans les protocoles expérimentaux. La principale difficulté provient du fait

que plusieurs facteurs doivent s'articuler correctement : la fixation à la membrane, l'absorption, la libération des molécules par les endosomes, ainsi que leur protection contre la dégradation. Enfin, pour une utilisation clinique, il s'agit de mettre en balance les coûts et les bénéfices thérapeutiques. Les peptides de pénétration cellulaire constituent avant tout une stratégie d'absorption pour les macromolécules. Or la production de ces macromolécules est souvent plus coûteuse que celle des substances actives usuelles, constituées de molécules plus petites.

Mais l'enjeu de ces peptides est plus vaste. En déchiffrant leurs mécanismes d'entrée dans les cellules, on comprendra mieux l'absorption des macromolécules en général. Des similitudes existent dans la façon dont ces peptides et certains virus accèdent à l'intérieur des cellules. Les peptides de pénétration cellulaire constitueraient donc un système modèle simplifié de choix pour comprendre des processus biologiques fondamentaux. ■

L'information scientifique de référence maintenant sur tablette et smartphone !



Téléchargez gratuitement
l'application sur App Store et Google Play.
Le 1^{er} numéro de *Pour la Science* est offert !



Disponible sur
App Store

DISPONIBLE SUR
Google play



Flashez ce QR code
avec votre mobile
ou votre tablette
pour télécharger
immédiatement
l'application.

Avec l'application « Pour la Science », retrouvez dès leur sortie
le mensuel *Pour la Science* à 5,49 € et son hors-série trimestriel
Dossier Pour la Science à 5,99 € en version numérique
optimisée pour tablette : lecture intuitive, sommaire interactif,
contenus enrichis, feuilletage hors connexion, etc.



Découvrez aussi l'application « Cerveau & Psycho » pour retrouver
le magazine *Cerveau & Psycho* et son hors-série *L'Essentiel Cerveau & Psycho*

Métaux étranges et théorie des cordes

Subir Sachdev

Certains états de la matière récemment identifiés ont pour origine des phénomènes quantiques que les théoriciens ont du mal à étudier avec les outils usuels. Un domaine inattendu vient à leur rescousse : la théorie des cordes.



CET AIMANT est mis en lévitation par un supraconducteur, dans lequel sa myriade d'électrons forme un vaste état quantique cohérent. Pour certains matériaux et certaines situations, il existe un lien mathématique entre l'état quantique des électrons et la description des trous noirs par la théorie des cordes.