

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 R. Brock, 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-