

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

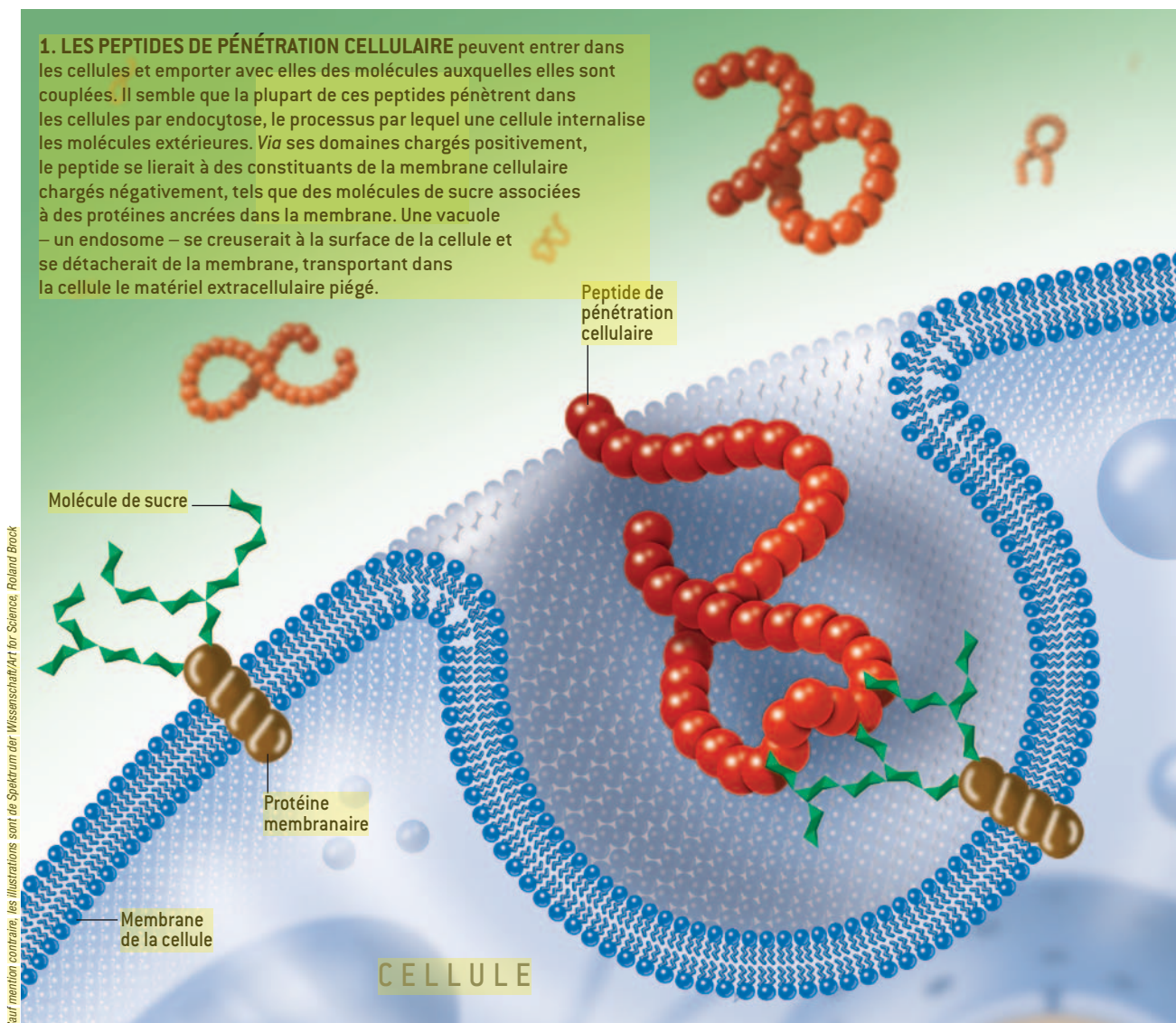
les expériences d'absorption de peptides avaient été analysées sur cellules fixées, car pour les besoins de la microscopie, les peptides étaient marqués par un colorant qui ne pouvait accéder au milieu intracellulaire qu'après fixation.

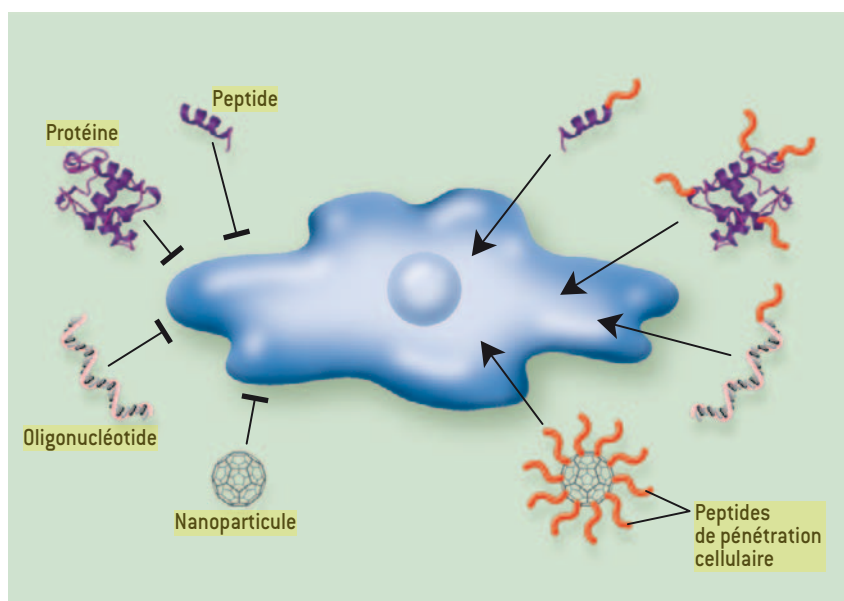
Ainsi, selon B. Lebleu et ses collègues, les preuves expérimentales d'une absorption directe reposaient en grande partie sur un effet secondaire de la fixation : ce processus endommage les membranes, ce qui permet aux peptides d'accéder au cytoplasme, qu'ils se soient trouvés à la surface de la cellule 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.





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.

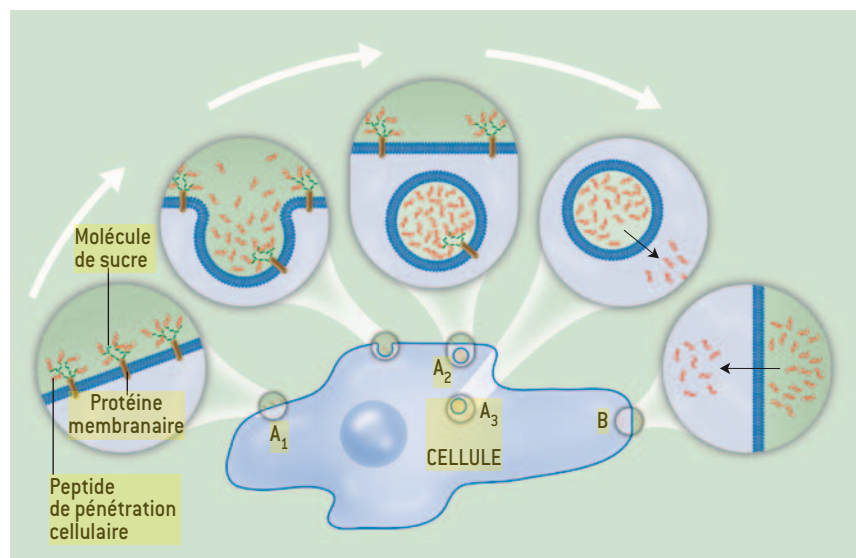
Épissage alternatif

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

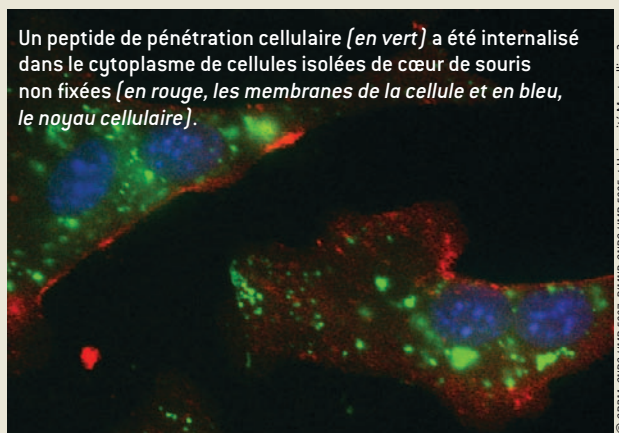
À Montpellier, deux groupes de recherche ont indépendamment débuté des travaux pionniers pour surmonter les problèmes d'internalisation de biomolécules en utilisant des peptides de pénétration cellulaire. Leurs études visent le traitement de diverses pathologies.

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. ■