**Journal de la Société de Biologie,** 200 (3), 209-212 (2006)

# La transduction protéique, de la technologie à la physiologie

**par Alain Prochiantz**

*CNRS UMR 8542, École normale supérieure, 46, rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France.*
*E-mail : Alain.Prochiantz@ens.fr*

*Reçu le 2 novembre 2006*

## RÉSUMÉ

**Au début des années 1990, nous avons observé que le domaine de fixation à l'ADN (homéodomaine) d'Antennapedia, un facteur de transcription de la classe des homéoprotéines, était internalisé par des cellules vivantes et adressé à leur cytoplasme et noyau. Il apparut rapidement que cette internalisation était due à la troisième hélice de l'homéodomaine, longue de 16 acides aminés. Ce court peptide, baptisé Pénétratine, est le premier d'une longue série de peptides transducteurs, largement utilisés pour l'internalisation de cargos variés, *in vitro* et *in vivo*. Même si les peptides de transduction sont développés dans cette optique d'applications pratiques, la conséquence la plus remarquable de l'observation initiale fut la découverte que des homéoprotéines entières peuvent passer entre cellules et exercer des activités transcriptionnelles et traductionnelles paracrines. Ce mécanisme requiert que les homéoprotéines soient internalisées et sécrétées. La sécrétion est indépendante du Golgi et repose sur une petite séquence, aussi présente dans l'homéodomaine, mais distincte de la Pénétratine. Les conséquences de ce nouveau mode de transduction du signal sont brièvement discutées.**

## SUMMARY Protein transduction, from technology to physiology

**In the early 90s, we found that the DNA-binding domain (homeodomain) of Antennapedia, a homeoprotein transcription factor, was internalized by live cells gaining access to their cytoplasm and nuclei. It was soon revealed that internalization is due to the third helix of the homeodomain, composed of sixteen amino acids. This short peptide baptized Penetratin is the first of a large series of transduction peptides widely used for the internalization of all sorts of cargoes *in vitro* and *in vivo*. Although transduction peptides are being developed with the latter practical goal, the most intriguing outcome of our initial observation is that full-length homeoproteins are transferred between cells and have non-cell autonomous transcriptional and translational activities. This new signaling mechanism requires that homeoproteins be internalized and secreted. Secretion is Golgi independent and requires a small sequence also present in the homeodomain but distinct from the Penetratin sequence. The consequences of this novel signaling mechanism are briefly discussed.**

En 1988, Frankel et Pabo rapportent que le facteur de transcription TAT, du Virus de l'Immunodéficience Humaine, est capturé par des cellules vivantes et envoyé à leur noyau (Frankel *et al*., 1988). Cette observation, même si elle n'était pas accompagnée de la preuve d'une activité ou même d'une analyse de la taille de la protéine internalisée, est à l'origine de l'idée selon laquelle le transport intercellulaire de facteurs de transcription pourrait être à la base d'un mode jusque là insoupçonné de signalisation cellulaire.

Deux années plus tard, notre laboratoire publiait le premier rapport démontrant que l'homéodomaine d'Antennapedia, un facteur de transcription de la classe des homéoprotéines, caractérisé chez la Drosophile, était capturé par les cellules nerveuses, mais aussi par d'autres types cellulaires et que cette internalisation se faisait dans des conditions interdisant l'endocytose (Joliot *et al*., 1991). Cette observation a conduit à l'identification d'un peptide de 16 acides aminés, baptisé « Pénétratine », capable de traverser les membranes plasmiques et de transporter à travers ces membranes nombre de cargos hydrophiles (Derossi *et al*., 1996 ; Derossi *et al*., 1994).

Depuis, de nombreux peptides de transduction ont été décrits et ce domaine de recherche s'est développé très rapidement, fournissant ainsi des outils nouveaux et performants pour la recherche, tant fondamentale qu'appliquée (Joliot & Prochiantz, 2004 ; Lindgren *et al*., 2000 ; Snyder & Dowdy, 2004). Ces peptides ont donné naissance à une littérature abondante et il est clair que d'autres seront découverts dans les années à venir, ainsi

Article available at http://www.biologie-journal.org or http://dx.doi.org/10.1051/jbio:2006023

que des substances non peptidiques douées des mêmes propriétés de transduction. Malgré cette floraison de vecteurs potentiels donnant accès au cytoplasme, au noyau et peut-être à d'autres organelles intracellulaires, il est honnête de rappeler que les mécanismes d'internalisation sont encore mal compris. Un aspect important de ce dernier *caveat* est que tous les peptides n'utilisent pas forcément les mêmes voies de transduction.

Par exemple, il a été proposé que le peptide dérivé de TAT, riche en arginines, soit d'abord capturé par endocytose et n'atteigne le cytoplasme qu'après rupture de l'endosome (Snyder & Dowdy, 2004). Ce mécanisme diffère de celui proposé pour la Pénétratine qui traverse la membrane plasmique en l'absence d'endocytose, possiblement à l'intérieur de micelles inverses dont la formation est induite par le tryptophane en position 48 de l'homéodomaine (Berlose *et al*., 1996 ; Joliot & Prochiantz, 2004). Rappelons que ce tryptophane est indispensable à l'internalisation de la Pénétratine et absent de la séquence de TAT, ce qui renforce l'idée de l'existence de mécanismes d'entrée distincts pour ces deux peptides.

L'étude de l'internalisation des peptides de transduction est donc toujours ouverte à la recherche. Nous pensons que le succès d'un programme qui s'intitulerait « comment traverser une membrane biologique ? » tirerait profit d'une approche plus rationnelle et plus systématique. On trouvera là un bon argument pour l'établissement de relations fortes entre biologistes souvent satisfaits par un pragmatique « ça marche » et les chimistes et physiciens mieux à même de comprendre les mécanismes, en particulier les interactions entre peptides et lipides, nécessaires à la traversée des bicouches, naturelles ou artificielles. C'est un espoir partagé par tous dans le domaine que, sur la base d'une meilleure compréhension des mécanismes d'internalisation de différents peptides de transduction, il deviendra possible de produire de nouveaux composés, pas forcément des peptides, efficaces et sûrs.

Il est évident que l'adressage direct de protéines, peptides et cargos à des compartiment intracellulaires, soulève de nombreux espoirs pour la pharmacologie. Pour s'en tenir au système nerveux central, une très large majorité des drogues actuellement sur le marché sont dirigées contre des cibles extracellulaires, comme les récepteurs ou transporteurs de neuromédiateurs. Il existe des exceptions, comme la L-DOPA, capturée par les cellules et transformée en Dopamine, mais on peut aujourd'hui anticiper que, dans un avenir pas trop lointain, l'industrie pharmaceutique sera à même de produire des drogues qui traverseront la barrière hémato-encéphalique et seront envoyées spécifiquement vers tel type cellulaire pour y exercer une activité pharmacologique extra- ou intra-cellulaire, par exemple au niveau génomique.

Ce petit jeu prospectif en dit long sur les difficultés qui nous attendent et devrait inciter à la modestie. Car il ne sera pas seulement important d'entrer dans les cellules, mais aussi d'entrer dans les bonnes cellules, et d'atteindre les compartiments sub-cellulaires appropriés. Les questions de toxicité, d'activité mutagène, et de biodisponibilité sont aussi au rendez-vous. Pour ne rien dire, pour ce qui est du cerveau ou de l'absorption *per os*, de la nécessité de traverser les barrière à jonctions serrées sans rester coincé dans la cellules épithéliales ou endothéliales et d'en ressortir, du bon côté si possible.

Du fait de la concentration des efforts sur le versant thérapeutique, l'idée d'origine selon laquelle la transduction de facteurs de transcription pourraient avoir une fonction physiologique n'a été explorée que par un petit nombre d'équipes. La crainte de l'artefact et la pusillanimité intellectuelle ne sont pas sans rapport avec cet apparent manque de curiosité. Si l'on considère qu'en dépit des centaines d'articles décrivant l'utilisation des peptides de transduction, il est encore des groupes, peu nombreux il faut l'admettre, pour attribuer leur internalisation à un artefact de fixation, on imagine comment a pu être reçue l'hypothèse du transfert intercellulaire des homéoprotéines. Sécrétion sans signal peptide, internalisation sans endocytose, action paracrine, autant d'éléments qui prenaient à contre-pied des dogmes solidement établis.

Et pourtant, 17 ans plus tard, le projet est toujours vivant ! La raison principale de cette survie se trouve probablement dans l'aspect technologique. En effet, le développement systématique des peptides de transduction et la recherche des mécanismes présidant à leur entrée dans les cellules ont été, à l'origine, stimulés par les travaux sur la Pénétratine, peptide qui a ouvert ce champ de recherche. Un autre ressort de la survie de l'hypothèse de signalisation par transfert d'homéoprotéines est la conservation au cours de l'évolution des séquences de sécrétion et d'internalisation, que nous avons identifiées. Pour un nombre significatif de collègues, une telle conservation devait ou pouvait avoir un sens fonctionnel. Notre équipe a donc pu bénéficier de suffisamment de crédit, de crédits aussi, pour être en mesure aujourd'hui de proposer un certain nombre de fonctions pour ce phénomène, assez inattendu il faut le reconnaître.

Les lecteurs intéressés par les mécanismes de sécrétion indépendants de l'appareil de Golgi, ou curieux quant aux différentes fonctions proposées pour ce phénomène de transduction des homéoprotéines, trouveront les informations nécessaires dans des revues plus ou moins récentes (Joliot & Prochiantz, 2004 ; Prochiantz, 2000 ; Prochiantz & Joliot, 2003). Rappelons simplement que trois fonctions essentielles ont été proposées : la compartimentation du neuroépithélium, le guidage axonal et la plasticité synaptique. Des travaux publiés, d'autres qui tentent de l'être, démontrent que ces trois fonctions sont aujourd'hui au rendez-vous (Brunet *et al*., 2005).

Ce sur quoi, j'aimerais attirer l'attention sur le fait que les homéoprotéines, en tout cas nombre d'entre elles, ne sont pas seulement des facteurs de transcription, mais régulent aussi la traduction. Plusieurs d'entre elles se fixent spécifiquement à eIF4E, un facteur clé de d'initiation de la traduction. Cela est connu depuis de nombreuses années pour Bicoid, une homéoprotéine régulant la traduction de l'ARN messager de Caudal chez la Drosophile (Niessing *et al*., 2002 ; Rivera-Pomar *et al*., 1996), mais est aussi vrai pour Engrailed, Emx2, Otx2 et PRH (Nedelec *et al*.,

2004 ; Topisirovic *et al*., 2003). Bien plus, le domaine responsable de la fixation à eIF4E présent dans ces quelques homéoprotéines est conservé dans plus de 200 autres, ce qui suggère que la fonction de régulateur traductionnel pourrait être généralisée à de nombreux membres de la famille (Topisirovic & Borden, 2005).

Dans ce contexte, il est intéressant de constater que plusieurs homéoprotéines ont été visualisées, non seulement dans le noyau, mais aussi dans des compartiments incompatibles avec la transcription, en particulier les terminaisons nerveuses. On pourrait en déduire que ces homéoprotéines régulent la traduction locale, de façon autonome cellulaire, ou après transfert intercellulaire, par exemple trans-synaptique. Etant donné que les homéoprotéines encodent une information positionnelle, une régulation paracrine de la traduction serait un moyen élégant d'échanger une information de cette nature entre les partenaires d'un réseau complexe. Cette hypothèse vient de recevoir un support expérimental dans le domaine du guidage axonal. Nous avons,en effet, démontré, en collaboration avec le laboratoire de Christine Holt, que la protéine Engrailed exerce une activité de guidage vis-à-vis des axones ganglionnaires en régulant localement, après internalisation, la traduction des messagers présents dans les cônes de croissance (Brunet *et al*., 2005). Ces résultats, et d'autres soumis pour publication, soutiennent l'idée selon laquelle les homéoprotéines sont des morphogènes agissant par diffusion locale et régulation non cellulaire autonome de la transcription et de la traduction. Comme ces facteurs sont exprimés aussi chez l'adulte, ce nouveau mécanisme de signalisation pourrait avoir des fonctions physiologiques importantes.

Cet aspect physiologique, doit amener à se poser des questions sur les conséquences de cette voie de signalisation en pathologie et en thérapeutique. Il est ici utile, sans doute, de rappeler qu'un grand nombre d'homéogènes ont été associés, souvent génétiquement, à certaines pathologies (voir par exemple, Eells, 2003 ; Hide *et al*., 2002 ; Sgado *et al*., 2006 ; Smidt *et al*., 2004 ; Taylor & Fei, 2005). De ce fait les homéoprotéines, par leur capacité transductrice, pourraient être vues comme des protéines thérapeutiques potentielles. C'est une idée qui est appuyée par les expériences démontrant que l'internalisation de HoxB4 par les cellules hématopoïétiques exprimant CD-34 stimule leur prolifération (Amsellem *et al*., 2003). Dans un même ordre d'idée, nous venons de démontrer que l'internalisation *in vivo* de Engrailed par les neurones dopaminergiques de la substance noire bloque leur mort progressive chez l'adulte.

En conclusion de cette introduction aux articles qu'on va lire dans ce numéro, le message principal est que beaucoup de patience et de travail seront encore nécessaires avant que le phénomène de transduction soit entièrement compris, suffisamment en tout cas pour trouver son chemin vers les applications médicales espérées. Cependant, il n'est pas besoin d'être particulièrement prévenu pour réaliser que cette approche pharmacologique, appelons-la « thérapie protéique », pourrait être à terme complémentaire des approches par thérapie génique et cellulaire. Pour en arriver là, il sera nécessaire que physiciens, chimistes et biologistes joignent leurs forces.

Finalement, il est très important de faire en sorte que les conséquences pratiques de ce phénomène de transduction protéique ne se mettent pas en travers des études fondamentales qui essayent de comprendre sa signification physiologique. Cela en défense affirmée et assumée d'une recherche académique désintéressée, si souvent et si injustement attaquée, d'autant plus injustement qu'il est inévitable que la découverte et l'étude de phénomènes nouveaux débouche, un jour ou l'autre, sur des vues originales, dans les domaines de pathologie et de la thérapeutique.

## BIBLIOGRAPHIE


Amsellem S., Pflumio F., Bardinet D., Izac B., Charneau P., Romeo P. H., Dubart-Kupperschmitt A. & Fichelson S., *Ex vivo* expansion of human hematopoietic stem cells by direct delivery of the HOXB4 homeoprotein. *Nat. Med*., 2003, 9, 1423-1427.

Berlose J. P., Convert O., Derossi D., Brunissen A. & Chassaing G., Conformational and associative behaviours of the third helix of Antennapedia homeodomain in membrane-mimetic environments. *Eur. J. Biochem*., 1996, *242*, 372-386.

Brunet I., Weinl C., Piper M., Trembleau A., Volovitch M., Harris W., Prochiantz A. & Holt C., The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature*, 2005, *438*, 94-98.

Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G. & Prochiantz A., Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem*., 1996, *271*, 18188-18193.

Derossi, D., Joliot A. H., Chassaing G. & Prochiantz A., The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem*., 1994, *269*, 10444-10450.

Eells J. B., The control of dopamine neuron development, function and survival: insights from transgenic mice and the relevance to human disease. *Curr. Med. Chem*., 2003, *10*, 857-870.

Frankel A. D., Bredt D. S. & Pabo C. O., Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science*, 1988, *240*, 70-73.

Hide T., Hatakeyama J., Kimura-Yoshida C., Tian E., Takeda N., Ushio Y., Shiroishi T., Aizawa S. & Matsuo I., Genetic modifiers of otocephalic phenotypes in Otx2 heterozygous mutant mice. *Development*, 2002, *129*, 4347-4357.

Joliot A., Pernelle C., Deagostini-Bazin H. & Prochiantz A., Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, *88*, 1864-1868.

Joliot A. & Prochiantz A., Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat. Cell. Biol*., 2004 *6*, 189-196.

Lindgren M., Hällbrink M., Prochiantz A. & Langel U., Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol. Sci*., 2000, *21*, 99-103.

Nedelec S., Foucher I., Brunet I., Bouillot C., Prochiantz A. & Trembleau A., Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, *101*, 10815-10820.

Niessing D., Blanke S. & Jackle H., Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes Dev*., 2002, *16*, 2576-2582.

Prochiantz A., Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr. Opin. Cell. Biol*., 2000, *12*, 400-406.

Prochiantz A. & Joliot A., Can transcription factors function as cell-cell signalling molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003, *4*, 814-819.

Rivera-Pomar R., Niessing D., Schmidt-Ott U., Gehring W. J. & Jackle H., RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature*, 1996, *379*, 746-749.

Sgado P., Alberi L., Gherbassi D., Galasso S. L., Ramakers G. M., Alavian K. N., Smidt M. P., Dyck R. H. & Simon H. H., Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal Engrailed mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, *103*, 15242-15247.

Smidt M. P., Smits S. M. & Burbach J. P., Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell. Tissue Res.*, 2004, *318*, 35-43.

Snyder E. L. & Dowdy S. F., Cell penetrating peptides in drug delivery. *Pharm. Res.*, 2004, *21*, 389-393.

Taylor H. & Fei X., Emx2 regulates mammalian reproduction by altering endometrial cell proliferation. *Mol. Endocrinol*., 2005, *19*, 2339-2346.

Topisirovic I. & Borden K. L., Homeodomain proteins and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E): an unexpected relationship. *Histol. Histopathol*., 2005, *20*, 1275-1284.

Topisirovic I., Culjkovic B., Cohen N., Perez J. M., Skrabanek L. & Borden K. L., The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue-specific inhibitor of eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *Embo. J*., 2003 *22*, 689-703.