

Peptides de transduction : analyse des relations « structure-fonction » à l'aide de membranes modèles

par Antonin Lamazière¹, Gérard Chassaing², Germain Trugnan¹ & Jesus Ayala-Sanmartin^{1*}

¹UMR Inserm U538, CHU Saint Antoine, Université Pierre et Marie Curie, 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France; ²UMR CNRS 7613, Université Pierre et Marie Curie, 4, place Jussieu, 75252 Paris cedex 05, France.

*Auteur correspondant.

Tél. : 33+1 40 01 13 24. Fax : 33+1 40 01 13 90. E-mail : jayala@chusa.jussieu.fr

Reçu le 15 mars 2006

RÉSUMÉ

Dans ce travail, nous nous intéressons à une étape clef de l'internalisation des peptides dans les cellules : l'interaction peptide-membrane. Nous avons étudié les effets de trois peptides : La substance P, la pénétatine et un peptide amphipatique (RL)₁₆ sur deux types de membranes modèles, les vésicules géantes unilamellaires (GUVs) et les vésicules larges unilamellaires (LUVs). Nous avons observé que la pénétra-

tine provoque la formation de tubules à l'intérieur des vésicules géantes sans perte de perméabilité. Le peptide amphipatique (RL)₁₆, quant à lui, affecte profondément la perméabilité des membranes ce qui se traduit notamment par l'éclatement des vésicules géantes. Enfin, la substance P ne semble pas avoir d'effet sur des deux types de membranes modèles.

SUMMARY Transduction peptides : structural-functional analyses in model membranes

Peptide-membrane interaction is the first step required for peptide cell internalization. In this paper we studied the interactions of substance P, Penetratin and an amphiphilic 16mer (RL)₁₆ peptide in two different model membranes, giant unilamellar vesicles and large unilamellar vesicles. Penetratin was

able to induce the formation of tubes inside the giant vesicles without changes in membrane permeability. On the contrary, RL₁₆ induced the disruption of giant vesicles and the permeabilization of large vesicles. Substance P showed none of these effects.

INTRODUCTION

Plusieurs processus biologiques, comme la neuromodulation, la toxicité ou la communication cellulaire, peuvent être régulés par des peptides naturels. Parmi ces peptides, on trouve notamment des hormones et des neuromodulateurs comme les enképhalines et la substance P et des peptides antibactériens comme la cecropine, la melittine ou la magainine.

Par ailleurs d'autres peptides basiques, mais cette fois-ci dérivés de protéines naturelles, ont été décrits depuis une dizaine d'années comme étant capables de traverser les membranes de nombreux types cellulaires. Ils sont fortement chargés (positivement) et peuvent être utilisés en tant que vecteurs pour transporter des molécules bioactives à l'intérieur des cellules. Ils sont connus généralement sous le nom de peptides vecteurs ou peptides pénétrants (en anglais cell penetrating peptides : CPPs). Parmi les plus répandus, on trouve la pénétatine, issue de la troisième hélice de l'homéoprotéine Antennapedia

(Derossi *et al.*, 1994) ou TAT(48-60), le fragment de la protéine de régulation du virus HIV-1 (Vivès *et al.*, 1997). Enfin, des peptides purement synthétiques sont souvent utilisés, comme des modèles simples, pour étudier les propriétés fondamentales des séquences d'un point de vue structural ou fonctionnel (rôle des charges, de la taille, de l'hydrophobicité...).

Cependant, principalement à cause de la complexité cellulaire, les mécanismes moléculaires fondamentaux, qui gouvernent la perméabilité de la membrane cellulaire en présence de ces peptides, ne sont pas encore clairement définis.

La première étape de l'interaction peptide-cellule est l'association du peptide avec la membrane plasmique. Deux grands types d'interaction sont possibles : le peptide peut soit interagir avec un récepteur protéique, soit interagir directement avec les lipides membranaires. La plupart des peptides naturels qui entrent en jeu dans la communication cellulaire stimulent la cellule en interagissant avec des récepteurs spécifiques. Cependant, cer-

tains d'entre eux comme la substance P peuvent interagir des deux manières. En effet, une étude récente (Oehlke *et al.*, 2005) vient de constater que la substance P qui se lie à un récepteur spécifique (NK1) peut entrer dans des mastocytes qui précisément n'ont pas ces récepteurs.

Le second type d'interaction, indépendant de tout récepteur, concerne une grande majorité de peptides qu'ils soient hydrophobes, basiques, chargés ou amphipatiques. Ces interactions engendrent alors une large gamme de déformations au niveau de la topologie de la membrane cellulaire. Il a été suggéré que certains de ces peptides pourraient traverser la bicouche lipidique par formation de micelles inverses (Derossi *et al.*, 1996), d'autres ont plutôt tendance à former des pores et à provoquer la perméabilisation de la membrane et enfin d'autres encore pourraient entrer par des voies de type endocytose et pinocytose.

Le but de ce travail est d'étudier les relations entre les propriétés physico-chimiques des peptides basiques et leurs effets sur les membranes. Nous avons choisi trois différentes sortes de peptides (Tableau I) : un neuromodulateur naturel la substance P, un peptide vecteur la pénétratine, et un peptide synthétique amphipatique (RL)₁₆.

TABLEAU I. – Séquence des trois peptides basiques utilisés.

Substance P	H-RPKPQQFFGLM-NH ₂
Pénétratine	H-RQIKIWFQNRMRKWKK-NH ₂
(RL) ₁₆	biotine-RRLRLLRLLRLLRRLRR-NH ₂

Pour cette étude, nous avons utilisé des liposomes (vésicules formées de bicouches lipidiques) comme modèles membranaires simples pour mimer les membranes des cellules. Le principal avantage de ces systèmes est qu'ils sont facilement modulables aussi bien du point de vue de la taille que de la composition lipidique. Ils sont, en général, aisément manipulables et chaque type de liposome permet une approche expérimentale différente. Les vésicules géantes unilamellaires (GUVs) (diamètre d'environ 50-100 µm) ont été utilisées pour étudier de manière qualitative les effets mésoscopiques induits par les peptides sur des membranes phospholipidiques. Elles peuvent être directement observables en microscopie optique (contraste de phase, fluorescence ou confocal). La libération de calcéine, reflet de la perméabilisation des membranes a été quantifiée par spectroscopie de fluorescence sur des liposomes de diamètre plus petit (100 nm), les LUVs (vésicules larges unilamellaires).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Produits chimiques

La L- α -Phosphatidylcholine (PC) issue de jaune d'œuf, la L- α -Phosphatidyl-DL-glycerol (PG) issue de jaune d'œuf, et la calcéine proviennent de SIGMA. Les

acides aminés tertibutyloxycarbonyl (Boc), la résine p-méthylbenzhydramine-et le O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) ont été achetés chez Senn Chemicals (Dielsdorf, Switzerland). Les autres solvants et réactifs utilisés pour la synthèse peptidique proviennent de chez Applied Biosystems.

Synthèse peptidique

Les peptides ont été synthétisés (synthétiseur ABI Model 433A (Applied Biosystems)) en phase solide suivant la stratégie standard BOC (acides aminés activés avec dicyclohexylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole ou HBTU) comme décrit précédemment (Burlina *et al.*, 2005). Après la synthèse, les peptides ont été séparés de la résine par un traitement anhydride HF (1 h, 0° C) en présence d'anisol et de diméthyl sulfide. Ils ont été purifiés par HPLC en phase inverse sur des colonnes C8 en éluant avec un gradient linéaire d'acétonitrile (solution aqueuse à 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique). Les peptides sont purs à 95 % (HPLC analytique) et leur identité a été confirmée par spectroscopie de masse MALDI-TOF (Voyager Elite, PerSeptive Biosystems).

Électroformation des GUVs

Les GUVs ont été préparées en adaptant la méthode d'électroformation décrite précédemment (Puff *et al.*, 2004). Brièvement, le principe consiste d'abord à préparer une solution de lipides (dans les proportions souhaitées) à une concentration finale à 0,4 mg/ml dans un mélange de diéthyléther/méthanol/chloroforme (70/10/20, v/v). Une goutte (~ 1 µl) de cette solution est ensuite déposée sur deux électrodes en platine (diamètre 0,8 mm, distance entre électrodes 1 cm). La goutte est ensuite séchée sous un léger flux d'azote pendant 30 minutes. Puis les électrodes sont placées dans une chambre de travail thermostatée sur la platine d'un microscope Zeiss Axiovert 200 M, équipé d'une caméra CCD (Cool Snap HQ). Un courant alternatif est ensuite appliqué aux électrodes (5 Hz et 150 mV) et le film de lipides sec est hydraté rapidement par 2 ml d'une solution tampon de basse force ionique (typiquement de l'HEPES 0,5 mM, pH 7,4 et conductivité 20 µS/cm). Le voltage est graduellement augmenté jusqu'à 1 V pour favoriser l'électroformation. Au bout de 3 heures, on obtient au moins 10 vésicules géantes possédant un diamètre compris entre 20 et 100 µm.

Enfin, le peptide est ajouté dans la chambre de travail à l'aide d'une micropipette. Toutes les observations décrites ont été obtenues dans au moins cinq expériences du même type. Toutes les expériences ont été effectuées à 25° C.

Libération de la calcéine dans des LUVs

Les LUVs contenant la calcéine ont été préparées par extrusion en adaptant le protocole décrit précédemment (Ambroggio *et al.*, 2005). Brièvement, une solution de

lipides à 10 mg/ml (PC/PG (9/1)) dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1) est séchée sous azote pendant 2 heures puis placée sous vide pendant 2 heures pour éliminer les traces de solvants résiduelles. Parallèlement, on prépare une solution de calcéine 70 mM dans de l'HEPES 10 mM pH 7,4. Le film de lipides secs est ensuite hydraté avec la solution de calcéine en mélangeant vigoureusement au vortex. Puis, les LUVs sont obtenues après 21 passages de cette suspension de vésicules multi-lamellaires à travers une membrane en polycarbonate dont les pores ont un diamètre de 100 nm (extrudeur Avestin). La calcéine non encapsulée dans les vésicules est alors éliminée en passant la solution à travers deux colonnes de filtration sur gel Econo-pac 10 DG (Bio Rad).

La libération de la calcéine encapsulée dans les LUVs après ajout des peptides est détectée par spectrofluorimétrie à une longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 490 et 520 nm. L'intensité de fluorescence est enregistrée cinq minutes après l'ajout du peptide dans la solution de LUVs. La libération de calcéine est exprimé en pourcentage relatif par rapport au 100 % de libération obtenu après ajout de Triton X-100 (1 % final) à la suspension de LUVs (% libération de calcéine = $100 \times (F - F_0) / (F_T - F_0)$, où F est l'intensité de fluorescence après ajout du peptide, F_0 est l'intensité initiale des LUVs, et F_T correspond à l'intensité de fluorescence après ajout du triton). Les expériences ont été répétées au moins trois fois. Toutes les expériences ont été effectuées à 25 °C.

RÉSULTATS

Précédemment, Menger et collaborateurs ont montré que la poly-L-lysine pouvait engendrer la formation de microtubes dans des vésicules géantes unilamellaires de composition (DOPC/DOPG, 9/1) (Menger *et al.*, 2003) et l'équipe de Kinnunen a suggéré que certains peptides anti-bactériens (magainine 2 et indolicidine) induisaient des vésiculations à l'intérieur des GUVs (Zhao *et al.*, 2001 ; Zhao *et al.*, 2002). Dans le but d'étudier les déformations éventuelles des membranes lipidiques provoquées par des peptides nous avons choisi de travailler avec des vésicules géantes unilamellaires composés de lipides naturels (PC/PG 9/1). Trois peptides aux propriétés physico-chimiques très différents ont été choisis pour suivre leurs effets sur les membranes : la substance P un neuromodulateur faiblement chargé (positivement), la pénétratine un peptide vecteur basique, et enfin le peptide synthétique (RL)₁₆, une hélice α -amphipatique. (Tableau I).

Le cas le plus simple est observé pour la substance P. En effet, comme le montre la figure 1a et 1b aucune déformation de la vésicule n'est visible en microscopie à contraste de phase, même à des fortes concentrations en peptide (300 nM finale) et même sur des temps d'incubation de plus de 12 h. La pénétratine en revanche, utilisée à des concentrations finales de 60 nM, déstabilise profondément la membrane de la vésicule et des microtubes croissent de la membrane vers le centre de la vési-

cule (Fig. 1c). Ces tubes n'apparaissent qu'environ dix minutes après addition du peptide dans la chambre. En revanche, dès lors que la membrane commence à être perturbée, la formation du tube est très rapide (de l'ordre de la seconde). De manière intéressante, on note que, malgré une profonde déformation de la membrane, la vésicule conserve son intégrité et les tubes continuent à se déplacer librement à l'intérieur de celle-ci. Le peptide (RL)₁₆ comme le montre la figure 1d, e, f a un comportement totalement différent. Dans ce cas, le peptide provoque la disparition de la vésicule. Cet effet se déclenche pour des concentrations en peptide équivalentes à celles pour lesquelles apparaissent les tubes (60 nM finale).

La disparition de la GUV après ajout de (RL)₁₆ suggère que le peptide est capable de perméabiliser la membrane alors que dans le cas de la pénétratine la formation des tubes n'engendre pas l'éclatement. Pour étudier des éventuels changements de perméabilité, nous avons quantifié par spectroscopie de fluorescence la libération d'un fluorophore, la calcéine, encapsulé à forte concentration (70 mM) dans des LUVs. À ces concentrations il existe une inhibition de la fluorescence du fluorophore contenu dans les LUVs. Si un peptide arrive à perméabiliser la bicouche lipidique la calcéine va être libérée à l'extérieur de la vésicule et se diluera dans le milieu extérieur et, en conséquence, sa fluorescence augmentera.

Comme on peut le voir dans la figure 2, seul (RL)₁₆ est capable d'induire la libération de la calcéine. Les deux autres peptides ne semblent pas perméabiliser la membrane des LUVs.

DISCUSSION

L'interaction des peptides avec les membranes cellulaires est une étape fondamentale pour comprendre leur devenir dans la cellule. Dans ce travail, nous proposons des pistes pour comparer les effets de différents peptides sur deux types de membranes modèles. Ces deux approches sont complémentaires. L'utilisation de liposomes permet d'étudier l'influence de paramètres physico-chimiques précis (taille, charge, perméabilité des liposomes...). Les expériences effectuées sur les GUVs mettent en évidence un comportement très différent pour chaque peptide. Pour des peptides non amphipatiques, il semble que la charge soit un facteur clef pour déstabiliser la membrane. La pénétratine très chargée (7+) provoque la formation de microtubes alors que la substance P moins chargée (3+) capable d'interagir fortement avec des bicouches chargées négativement (Duplaa *et al.*, 1992), ne modifie pas la morphologie de la vésicule. La pénétratine (4 Lys et 2 Arg) interagirait fortement avec les charges négatives des phospholipides de la membrane et les séquestrerait autour d'elle créant une différence locale entre le nombre de lipides du feuillet externe et du feuillet interne. Cette différence se traduit par une courbure spontanée vers l'intérieur de la vésicule et un microtubule lipidique est alors capable de croître vers l'intérieur de la vésicule. La substance P moins chargée

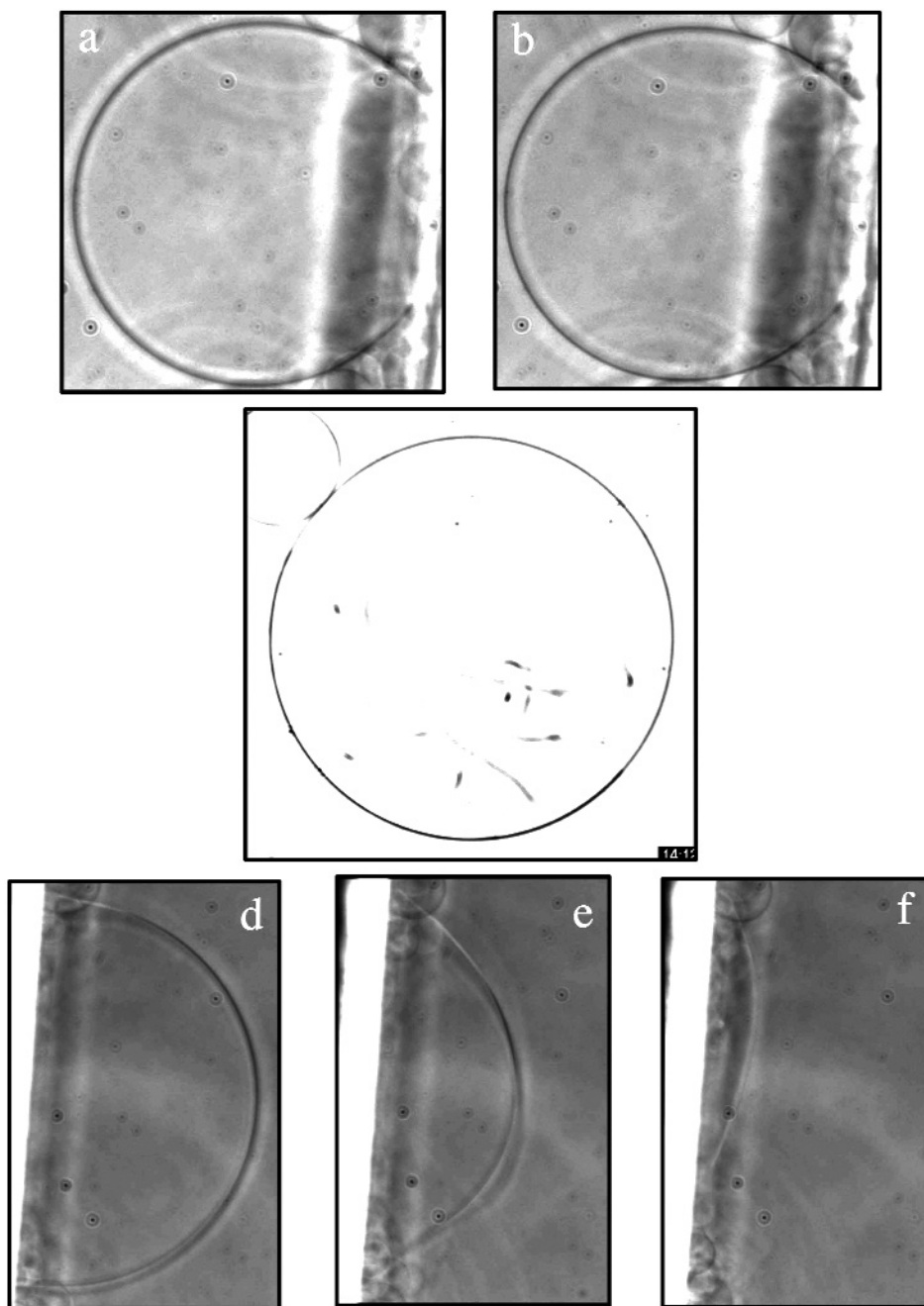


FIG. 1. – Visualisation en microscopie à contraste de phase des effets de trois peptides sur des GUVs PC/PG (9/1) : la substance P (1a, $t = 0$ h et 1b, $t = 12$ h), ne provoque pas de changements morphologiques de la membrane des GUVs même 12 h après addition du peptide. La pénétratine (1c) induit la formation de microtubules qui croissent à l'intérieur des GUVs environ 10 minutes après ajout du peptide. Le peptide $(RL)_{16}$, (1d, e, f) fait éclater les vésicule géantes 10 minutes après ajout du peptide.

ne perturbe probablement pas assez la membrane pour passer la barrière d'énergie nécessaire à la formation d'une invagination macroscopique; la vésicule n'est donc pas perturbée d'un point de vue morphologique. Enfin, pour ces deux peptides, les observations en microscopie semblent pouvoir se corréler avec celles de spectroscopie de fluorescence. Dans les deux cas, la perméa-

bilité (intégralité) des GUVs est conservée même en présence de microtubules et aucune fuite de fluorophore des LUVs n'est détectée par spectroscopie de fluorescence. La formation purement mécanique de microtubules, qui ne nécessite pas d'apport d'énergie extérieure, pourrait être responsable d'une internalisation sans perte de perméabilité membranaire.

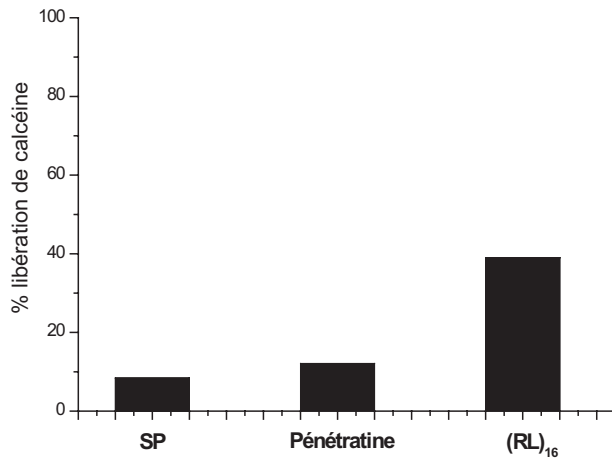


FIG. 2. – Effets des trois peptides sur la perméabilisation de la membrane des LUVs. La libération de la calcéine est quantifiée par spectroscopie de fluorescence (pourcentage de libération de la calcéine pour un ratio peptide/lipide 1/2 en masse).

En ce qui concerne le peptide amphipatique (RL)₁₆, l'interprétation des phénomènes observés est plus délicate. En effet, les mécanismes responsables de l'effondrement des vésicules peuvent être multiples. Cependant, il semblerait que la formation de « pores » soit la cause de ce phénomène. En effet, grâce à l'expérience d'encapsulation de calcéine, l'augmentation de l'intensité de fluorescence indique que la membrane est perméabilisée. Cette perméabilisation serait la cause de l'effondrement des GUVs dont les propriétés mécaniques des membranes sont profondément modifiées. Dans la littérature, les peptides antibactériens ont été très étudiés et les recherches se sont principalement focalisées sur leurs caractères lytiques et perméabilisants. Plusieurs modèles de pores ont été proposés pour expliquer la perméabilisation : le modèle « tonneau », le modèle « carpette » et le modèle « pore toroïdal » (Huang *et al.*, 2000). Cependant, nos expériences préliminaires ne permettent pas de différencier entre ces types de perméabilisation. D'autres outils et d'autres expériences sont nécessaires afin d'approfondir les phénomènes observés.

Remerciements. – Ce travail a été financé par l'INSERM et un contrat ACI-DRAB.

BIBLIOGRAPHIE

- Ambroggio E. E., Separovic F., Bowie J. H., Fidelio G. D. & Bagatolli L. A., Direct visualization of membrane leakage induced by the antibiotic peptides: maculatin, citropin, and aurein. *Biophys. J.*, 2005, 89, 1874-1881.
- Burlina F., Sagan S., Bolbach G. & Chassaing G., Quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides by MALDI-TOF mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005, 44, 4244-4247.
- 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.
- 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.
- Duplaa H., Convert O., Sautereau A. M., Tocanne J. F. & Chassaing G., Binding of substance P to monolayers and vesicles made of phosphatidylcholine and/or phosphatidylserine. *Biochimica Biophysica Acta*, 1992, 1107, 12-22.
- Huang H. W., Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*, 2000, 39, 8347-8352.
- Menger F. M., Seredyuk V. A., Kitaeva M. V., Yaroslavov A. A. & Melik-Nubarov N. S., Migration of poly-L-lysine through a lipid bilayer. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 2846-2847.
- Oehlke J., Lorenz D., Wiesner B. & Bienert M., Studies on the cellular uptake of substance P and lysine-rich, KLA-derived model peptides. *J. Mol. Recognit.*, 2005, 18, 50-59.
- Puff N., Lamazière A., Seigneuret M., Trugnan G. & Angelova M. I., HDLs induce raft domain vanishing in heterogeneous giant vesicles. *Chem. Phys. Lipids*, 2005, 133, 195-202.
- Vives 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.*, 1997, 272, 16010-16017.
- Zhao H., Mattila J. P., Holopainen J. M. & Kinnunen P. K., Comparison of the membrane association of two antimicrobial peptides, magainin 2 and indolicidin. *Biophys. J.*, 2001, 81, 2979-2991.
- Zhao H., Rinaldi A. C., Di Giulio A., Simmaco M. & Kinnunen P. K., Interactions of the antimicrobial peptides Temporins with model biomembranes. Comparison of Temporins B and L. *Biochemistry*, 2002, 41, 4425-4436.