



Développement et vectorisation de peptides inhibiteurs du domaine PDZ de CAL pour le traitement de la mucoviscidose

Quentin Seisel

► To cite this version:

Quentin Seisel. Développement et vectorisation de peptides inhibiteurs du domaine PDZ de CAL pour le traitement de la mucoviscidose. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT010 . tel-01868210

HAL Id: tel-01868210

<https://theses.hal.science/tel-01868210>

Submitted on 5 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie / Santé

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (ED 168)

Unité de recherche : Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier (CNRS UMR 5237)

Développement et vectorisation de peptides inhibiteurs du domaine PDZ de CAL pour le traitement de la mucoviscidose

Présentée par Quentin SEISEL

Le 15 juin 2018

Sous la direction de Prisca BOISGUERIN

Devant le jury composé de

Mme Prisca BOISGUERIN, CR, CRBM – CNRS UMR 5237, Montpellier

Mme Fabienne BURLINA, CR, UPMC – CNRS UMR 7203, Paris

Mr Gilles TRAVE, DR, IGBMC – CNRS UMR 7104 / Inserm U 1258, Illkirch

Mme Florine CAVELIER, DR, IBMM – CNRS UMR 5247, Montpellier

Mme Magali TAULAN-CADARS, MCF, LGMR – EA 7402, Montpellier

Mr Burkhard BECHINGER, PU, Uds – CNRS UMR 7177, Strasbourg

Directrice de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Présidente du jury (Examinatrice)

Examinatrice

Examineur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse, réalisée au sein du Centre de Recherche en Biologie cellulaire de Montpellier (CRBM) dirigé par Anne Debant et financée par les National Institutes of Health (NIH) et la Fondation de Recherche en Santé Respiratoire (FRSR), n'aurait définitivement pas été possible sans la présence de nombreuses personnes à mes côtés. Je souhaite remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont aidé à mener cette thèse à son succès.

En premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, Prisca Boisguérin, qui m'a donné la chance de travailler à ses côtés pendant ces trois ans et demi et m'a accordé sa confiance. Elle est un modèle pour moi, de par sa réelle excellence scientifique mais aussi son ouverture d'esprit, sa tempérance et son intégrité. Merci de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux des sciences biologiques, et de m'avoir aidé à surmonter mon chagrin la première fois que j'ai dû tuer des cellules.

Je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse : Mme Fabienne Burlina et Mr Gilles Travé qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que Mme Florine Cavelier, Mme Magali Taulan-Cadars et Mr Burkhard Bechinger qui m'évalueront en tant qu'examineurs. Je remercie également Mme Magali Gary-Bobo qui a été un membre indispensable de mon comité de suivi de thèse.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de l'équipe et ses inoubliables membres dont j'ai plus ou moins partagé la vie et les péripéties pendant ces trois ans et demi : Sébastien Deshayes, le pro de la fluorescence et de la référence biblio ; Karidia Konate, l'experte en liposomes ; Eric Vivès, dresseur de peptides ; Israpong Lakumpa, mon super stagiaire ; mais aussi Anaïs Vaissière, Bérengère Chavey, Nizar Nasr, Etienne Dupré, Marion Dussot, Maia Harvey, Anthony Telmar, Mattias Lindberg. Je crois en chacun de vous et je vous souhaite ce que vous méritez : le meilleur !

Je remercie également nos collaborateurs : Gudi Aldrian pour ses analyses de masse et sa bonne humeur quand je parle de chimie ; Florine Cavelier pour son expertise en acides aminés non-naturels, Mathieu Arribat et Roberto Fanelli pour la synthèse des acides aminés silylés ; Magali Taulan-Cadars et Alexandra Pommier pour leur aide lors de la culture de cellules CFBE410- et de cellules polarisées ; Dean Madden et Nicholas Gill pour la synthèse protéique et leur assistance en FP. Un grand merci à Myriam Boyer-Clavel, Rémi Muller et Baptiste Monterroso qui m'ont formé à la cytométrie de flux et à la microscopie, ainsi qu'à toute la plate-forme MRI. Un aussi grand merci à Pascal Verdié, qui m'a formé sur la plate-forme SynBio3, qui a encadré mes synthèses de peptide sur la plate-forme SynBio3 et qui a supporté la présence persistante de mes fameux peptides roses.

Je voudrais aussi remercier tous ceux qui ont été là pour parler sciences ou ne pas parler sciences, partager un verre ou un moment de franche décontraction : la team P..., Emilie, Fanny, Etienne, Jabran, Alicia et David, pour leur amitié ; Sophie, mais aussi Dylane, François, Matija, Justine, Azam, Damien, Ruby et tous les autres doctorants du CRBM, unis tous ensemble ; ainsi que nos voisins de l'autre rive, Pierre, Ildem, Yousra, Adham, Matthias, Léo, Carola, Chloé, Diwas et tellement d'autres ! Enfin, je remercie mes co-admins de l'asso CBS2, en particulier Alex, Jen, Pierre, Laeti, Camille, Laura, Ben, Amélie, Sarah, Sarah, Noémie et Mathilde ; et Doria, sans qui mes aventures à Aloose auraient été bien moins savoureuses.

Un grand merci à Caroline, qui a été pour moi une amie très précieuse depuis notre rencontre en classe prépa et qui a catalysé ma rencontre avec l'équipe Boisguérin. Merci à mes amis les plus proches, Yohann,

Jean, Joachim, Théo, Anthony, Simon, Gaëlle, Claire, Hélène, Loïc, qui m'ont soutenu à différents moments de ma vie et notamment au cours de cette thèse. J'adresse un merci tout particulier à mon homonyme préféré, qui m'a apporté un soutien sans bornes et dont la motivation m'a donné l'envie de me surpasser et d'en arriver là où je suis. Enfin, le meilleur pour la fin, je voudrais remercier mon frère et mes parents, dont l'amour et le soutien inconditionnel depuis 25 ans et quelques ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Rien de tout ça ne serait arrivé sans eux.

Résumé

La mucoviscidose est une maladie génétique létale induite par des mutations du canal ionique CFTR, provoquant une perte de sa fonctionnalité au niveau des tissus épithéliaux de divers organes. Le poumon est particulièrement touché et devient sujet à des infections bactériennes chroniques. Dans le but de traiter la maladie, nous avons développé des « stabilisateurs » de la protéine CFTR : il s'agit de peptides inhibant l'interaction de la protéine CFTR avec le médiateur-clé de sa demi-vie à la membrane apicale des cellules épithéliales, la protéine CAL. En particulier, le peptide iCAL36 a démontré une hausse de fonctionnalité de la protéine CFTR mutée. Le but de cette thèse a été de renforcer cet effet biologique en améliorant ses caractéristiques pharmacologiques : pénétration cellulaire (vectorisation), stabilité métabolique et affinité pour la protéine CAL.

Le premier axe d'optimisation a été l'internalisation du peptide iCAL36 par 7 différents peptides vecteurs (CPP). Les conjugués correspondants ont été évalués suivant leur cytotoxicité, leur efficacité d'internalisation et leur capacité à maintenir cette efficacité en présence de sérum. Le mécanisme d'entrée des deux meilleurs conjugués a ensuite été étudié. Divers biais couramment rencontrés lors de l'analyse de l'efficacité d'internalisation de peptides vecteurs par des méthodes de fluorescence ont également été identifiés et expliqués. La séquence du peptide iCAL36 a ensuite été modulée par inclusion d'acides aminés non-naturels. Le criblage des interactions peptide/protéine a été réalisé par une procédure optimisée dans le cadre de cette thèse (méthode PIPEPLUS) et a permis d'identifier 32 analogues prometteurs de la séquence d'iCAL36 incluant différentes substitutions. En particulier, une des séquences identifiées (iCAL-Q27) a démontré une affinité 70 fois supérieure à celle du peptide iCAL36 pour la protéine CAL, indiquant une inhibition plus complète de l'interaction CAL/CFTR.

Ces résultats majeurs permettent dans leur ensemble de développer des « stabilisateurs » peptidiques de seconde génération pouvant avoir un effet biologique accru dans le contexte de la mucoviscidose.

Abstract

Cystic fibrosis is a lethal disease induced by genetic mutations of the CFTR chloride channel, leading to a loss of its function in the epithelial tissues of various organs. The lung is particularly affected and becomes a target for chronic bacterial infections. To cure the disease, we developed so-called CFTR “stabilizers”, which are peptides inhibiting the interaction between the CFTR protein and the key mediator of its half-life at the apical membrane of epithelial cells, the CAL protein. In particular, the iCAL36 peptide showed an increase of the functionality of the mutated CFTR protein. The aim of this thesis was to increase this biological effect by improving its pharmacological parameters: cellular internalization (vectorization), metabolic stability and affinity for the CAL protein.

The first axis of optimization was the internalization of the iCAL36 peptide by 7 different cell-penetrating peptides (CPP). The corresponding conjugates were evaluated upon their cytotoxicity, their uptake efficiency and their capacity to maintain this efficiency in the presence of proteases. The mechanism of entry of the two best candidates was then studied. Various bias frequently encountered during the analysis of CPP uptake efficiency by fluorescence methods were also identified and explained. Afterwards, the iCAL36 sequence was modulated by inclusion of non-natural amino acids. The screening of the peptide/protein interactions was performed by a method optimized during this thesis (PIPEPLUS process) and allowed the identification of 32 promising analogues of the iCAL36 sequence including several substitutions. In particular, one of these sequences (iCAL-Q27) showed an affinity 70 times stronger for the CAL protein compared to iCAL36, hinting a more complete inhibition of the CAL/CFTR interaction.

Overall, these major results grant the access to second-generation “stabilizers” potentially showing an improved biological effect in the context of cystic fibrosis.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	3
RESUME	5
ABSTRACT	6
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES ACIDES AMINES NON-NATURELS UTILISES.....	14
CHAPITRE 1 - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1.1. LA MUCOVISCIDOSE.....	16
1.1.1. Incidence, cause et symptômes de la mucoviscidose	16
1.1.2. La protéine CFTR et ses mutations.....	17
1.1.2.1. Caractérisation, structure et fonction du canal CFTR.....	17
1.1.2.2. Classification des mutations du gène CFTR	17
1.1.2.3. La mutation p.Phe508del : trois défauts fonctionnels	19
1.1.3. Etat des lieux de la recherche thérapeutique	20
1.1.3.1. Modulation de l'activité de la protéine CFTR	21
1.1.3.2. Inhibiteurs de la protéine ENaC et autres cibles protéiques	23
1.1.3.3. Thérapies du gène CFTR.....	24
1.1.3.4. Conclusion.....	27
1.2. L'INTERACTION CFTR-CAL COMME CIBLE BIOLOGIQUE	28
1.2.1. Interactome protéique du CFTR.....	28
1.2.1.1. Trafic intracellulaire de la protéine CFTR mature	28
1.2.1.2. L'interaction CFTR-CAL/NHERF est spécifique des domaines PDZ	29
1.2.1.3. Rationnel de l'inhibition de l'interaction CFTR/CAL	31
1.2.2. Méthodes de criblage applicables à l'analyse des PPI.....	32
1.2.2.1. Criblage des PPI par des banques génétiques	32
1.2.2.2. Criblage des PPI par synthèse SPOT	35
1.2.3. Les peptides inhibiteurs de CAL	39
1.2.3.1. Historique du développement du peptide iCAL36	39
1.2.3.2. Comment optimiser la séquence peptidique de iCAL36 en vue d'une application thérapeutique ?	41
1.3. VECTORISATION DE PEPTIDES INHIBITEURS	42
1.3.1. Méthodes de vectorisation applicables aux peptides.....	42
1.3.1.1. Méthodes d'injection et de perméabilisation temporaire	43
1.3.1.2. Vecteurs biologiques.....	43
1.3.1.3. Vecteurs lipidiques et polymériques	43
1.3.1.4. Vecteurs inorganiques et peptidiques	44
1.3.2. Les peptides vecteurs (Cell-Penetrating Peptides).....	44
1.3.2.1. Historique.....	44
1.3.2.2. Stratégies de vectorisation par les CPP	46
1.3.2.3. Mécanismes d'internalisation des CPP.....	47
CHAPITRE 2 - OBJECTIFS DE LA THESE ET STRATEGIE DEVELOPEE.....	52
CHAPITRE 3 - COMMENT EVALUER L'EFFICACITE D'INTERNALISATION DES CPP PAR FLUORESCENCE : BIAIS METHODOLOGIQUES ASSOCIES AUX PEPTIDES RICHES EN TRYPTOPHANES (PUBLICATION 1)	56
CHAPITRE 4 - OPTIMISATION DE L'INTERNALISATION CELLULAIRE DU PEPTIDE ICAL36 A L'AIDE DE PEPTIDES VECTEURS (CPP)	82
4.1. INTRODUCTION.....	83

4.1.1.	Choix des CPP utilisés pour vectoriser le peptide iCAL36	83
4.1.2.	Objectifs du chapitre.....	84
4.2.	MATERIELS ET METHODES.....	85
4.2.1.	Synthèse peptidique et solubilisation des peptides	85
4.2.2.	Culture cellulaire	85
4.2.2.1.	Cellules Caco-2	86
4.2.2.2.	Cellules Calu-3	86
4.2.2.3.	Cellules CFBE41o-	86
4.2.3.	Mesure d'activité LDH.....	87
4.2.4.	Evaluation de l'efficacité d'internalisation par cytométrie en flux	87
4.2.5.	Observation des *CPP-iCAL36 par microscopie confocale.....	88
4.2.6.	Expression et purification des protéines	89
4.2.7.	Mesures d'affinité protéine/ligand par polarisation de fluorescence.....	89
4.2.8.	Préparation des liposomes de type LUV	91
4.2.9.	Dichroïsme circulaire	91
4.2.10.	Déstabilisation des membranes lipidiques par les CPP-iCAL36	91
4.3.	RESULTATS : CRIBLAGE DE VECTEURS PEPTIDIQUES.....	92
4.3.1.	Evaluation de la cytotoxicité des conjugués CPP-iCAL36.....	92
4.3.2.	Mesure de l'internalisation des peptides par cytométrie de flux.....	94
4.3.3.	Optimisation du temps de transfection des CPP-iCAL.....	96
4.3.4.	Visualisation de la localisation cellulaire des *CPP-iCAL36	98
4.3.5.	Internalisation des conjugués *CPP-iCAL36 en présence de sérum.....	101
4.3.6.	Critères de sélection des deux meilleurs candidats.....	102
4.3.7.	Internalisation de cellules CFBE41o- par *TRI36 et *P36	103
4.3.8.	Affinité et sélectivité de TRI36 pour CALP.....	104
4.3.9.	Conclusion.....	105
4.4.	MECANISME D'INTERNALISATION DE TRI36 ET P36	106
4.4.1.	Interaction des CPP-iCAL36 avec des bicouches lipidiques	106
4.4.1.1.	Analyse structurale par dichroïsme circulaire	106
4.4.1.2.	Potentiel de déstabilisation des bicouches lipidiques	107
4.4.2.	Importance relative des voies énergie-dépendantes dans le mécanisme d'internalisation de TRI36 et de P36.....	108
4.4.3.	Implication de voies d'endocytose spécifiques dans le mécanisme d'internalisation de TRI36 et de P36.....	109
4.4.4.	Trafic intracellulaire des conjugués *TRI36 et *P36	112
4.4.5.	Conclusion.....	115

CHAPITRE 5 - OPTIMISATION DU PROCESSUS DES PEPTIDES INVERSES (PIPE^{PLUS}) POUR LE SCREENING DE LIGANDS DES DOMAINES PDZ (PUBLICATION 2)..... 116

CHAPITRE 6 - DEVELOPPEMENT D'INHIBITEURS DE CAL DE SECONDE GENERATION (ICAL-2G) INCLUANT DES ACIDES AMINES NON-NATURELS 133

6.1.	INTRODUCTION.....	134
6.1.1.	Contexte de l'optimisation du peptide iCAL36 par des AANN.....	134
6.1.2.	Objectifs du chapitre.....	134
6.2.	MATERIELS ET METHODES.....	135
6.2.1.	Description des acides aminés utilisés	135
6.2.2.	Synthèse peptidique et solubilisation des peptides	135
6.2.3.	Quantification du couplage des acides aminés non-naturels	136
6.2.4.	Expression et purification des protéines	136
6.2.5.	Préparation des banques peptidiques par synthèse SPOT.....	137

6.2.6.	Révélation des interactions peptide/domaine PDZ sur membrane	137
6.2.7.	Mesures d'affinité protéine/ligand par polarisation de fluorescence	138
6.3.	ANALYSE DE SUBSTITUTION D'ICAL36 PAR DES AANN	138
6.3.1.	Validation du couplage des AANN sur la membrane PUC	138
6.3.2.	Analyse de substitution d'ICAL36 par des AANN	140
6.4.	CRIBLAGE DES POSITIONS P ⁰ , P ⁻¹ , P ⁻⁴ ET P ⁻⁵ DU PEPTIDE ICAL36.....	142
6.4.1.	Criblage des positions P ⁰ et P ⁻¹ de la séquence ANSRWPTSII.....	142
6.4.2.	Criblage des positions P ⁻⁴ et P ⁻⁵ de la séquence ANSRWPTSvp	144
6.4.3.	Quantification de l'affinité et de la sélectivité d'ICAL-Q6.....	145
6.4.4.	Criblage des positions P ⁻⁵ et P ⁻⁴ de la séquence ANSRWPTSyt.....	146
6.4.5.	Quantification de l'affinité et de la sélectivité d'ICAL-Q13	147
6.5.	DETERMINANTS DE LA SELECTIVITE ENVERS TIP-1.....	149
6.5.1.	Criblage des positions P ⁻¹ et P ⁻⁵ de la séquence ANSRWPTSI.....	149
6.5.2.	Criblage des positions P ⁻¹ et P ⁻⁴ de la séquence ANSRWPTSI.....	149
6.5.3.	Quantification de l'affinité et de la sélectivité d'ICAL-Q27 et d'ICAL-Q28	151
6.6.	CONCLUSION	152
6.7.	PERSPECTIVES : AUTRES SEQUENCES ICAL-2G	153
CHAPITRE 7 - DISCUSSION GENERALE		154
7.1.	UNE STRATEGIE POUR TRAITER LA MUCOVISCIDOSE	155
7.2.	VECTORISATION DU PEPTIDE ICAL36 PAR DES CPP	156
7.2.1.	Quantifier l'internalisation de biomolécules.....	156
7.2.2.	Identification des CPP optimaux pour la vectorisation du peptide iCAL36.....	159
7.2.2.1.	Les conjugués CPP-ICAL36 ne présentent pas de cytotoxicité aux doses pertinentes pour les cellules adhérentes	159
7.2.2.2.	Cinq conjugués délivrent efficacement iCAL36 dans le cytosol	160
7.2.2.3.	Les CPP-ICAL36 seraient-ils utilisables <i>in vivo</i> ?.....	161
7.2.3.	TRI36 et P36 sont internalisés par les voies d'endocytose.....	163
7.2.4.	Conclusion.....	165
7.3.	DEVELOPPEMENT DE PEPTIDES THERAPEUTIQUES ICAL DE SECONDE GENERATION (ICAL-2G)	166
7.3.1.	Optimiser la séquence du peptide iCAL36 pour diminuer sa dose thérapeutique	166
7.3.2.	L'extension PIPE ^{PLUS} de la synthèse SPOT pour cribler les interactions peptide/PDZ	167
7.3.3.	Modulation de l'affinité du peptide iCAL36 par des AANN.....	168
7.3.4.	Développement des premiers peptides iCAL-2G.....	170
7.3.5.	Rationalisation de l'affinité pour la protéine TIP-1.....	171
7.3.6.	Conclusion.....	172
7.4.	PERSPECTIVES GENERALES DU PROJET.....	174
7.4.1.	Confirmer le mécanisme d'internalisation de TRI36 et P36.....	174
7.4.2.	Poursuivre la vectorisation d'ICAL36 : vers un modèle <i>ex vivo</i>	175
7.4.3.	Poursuivre le développement de peptides iCAL	175
7.4.4.	Evaluer l'activité des conjugués peptidiques CPP-ICAL.....	176
BIBLIOGRAPHIE		177

Liste des abréviations

*	TAMRA	C6M1	CPPas publié par Jafari <i>et al</i> en 2013
AA	Acides aminés	DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
AAD	AA de configuration D	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
AANN	AA non-naturels	DG	2-Déoxyglucose
ADN	Acide désoxyribonucléique	DOPC	Dioléoylphosphatidylcholine
ALI	Interface air-liquide	D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ANTS	Acide 8-aminonaphthalène-1,3,6-trisulfonique	DPX	Bromure de <i>p</i> -xylène-bispyridinium
ARN	Acide ribonucléique	dTat	Enantiomère D de Tat
ATP	Adénosine triphosphate	ENaC	<i>Epithelial Na⁺ Channel</i>
Caco-2	Lignée cellulaire d'adénocarcinome du côlon	Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyl
CAL	<i>CFTR-Associated Ligand</i>	FP	Polarisation de fluorescence
CALP	Domaine PDZ de CAL	GAG	Glycosaminoglycan
Calu-3	Lignée cellulaire d'adénocarcinome du poumon	HPLC	Chromatographie liquide haute performance
Chol	Cholestérol	HSPG	Protéoglycans à héparane sulfate
CF	<i>Cystic Fibrosis</i>	iCAL	Peptide inhibiteur de l'interaction CFTR/CAL
CFBE-ΔF	Cellules bronchiques de patients p.Phe508del	K_D	Constante de dissociation
CFBE410-	Cellules CFBE dites parentales	K_i	Constante d'inhibition
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>	LDH	Lactate déshydrogénase
CPP	<i>Cell-Penetrating Peptide</i>	LUV	<i>Large Unilamellar Vesicle</i>
CPPap	CPP amphipathique primaire	MbCD	Méthyl-β-cyclodextrine
CPPas	CPP amphipathique secondaire	MEM	Minimum Essential Medium
CPP-iCAL36	Conjugué entre un CPP et le peptide iCAL36	MPG	CPPap publié par Morris <i>et al</i> en 1997
CPPna	CPP non amphipathique	NHERF	<i>Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor</i>
CPZ	Chlorpromazine	NT	Cellules non-traitées
CQ	Chloroquine		
CtB	Sous-unité B de la toxine du choléra		

NYS	Nystatine	SDS	Dodécylsulfate de sodium
N1P1	Domaine PDZ1 de NHERF1	SM	Sphingomyéline
N1P2	Domaine PDZ2 de NHERF1	TAMRA	Tétraméthylrhodamine
N2P1	Domaine PDZ1 de NHERF2	Tat	<i>Transactivator of transcription</i>
N2P2	Domaine PDZ2 de NHERF2	TIP-1	<i>Tax-interacting protein-1</i>
PDZ	Domaine d'interaction protéique dont l'acronyme est issu des protéines <u>P</u> SD-95, <u>D</u> LG1 et <u>Z</u> O-1	TFE	2,2,2-Trifluoroéthanol
Pen	Pénétratine	TRI	Tat <i>retro-inverso</i>
p.Phe508del	Délétion de la phénylalanine 508	WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
PIPE	Processus du peptide inversé	WRAP5	<i>Tryptophan and Arginine-rich Amphipathic Peptide 5</i>
PPI	Interaction protéine-protéine	wt-CFTR	Protéine CFTR de type sauvage (<i>wild-type</i>)
SD	Ecart-type		

Liste des tableaux

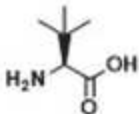
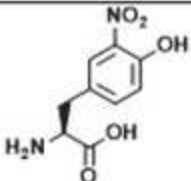
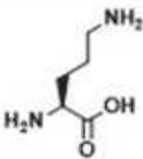
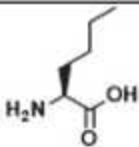
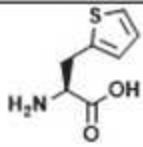
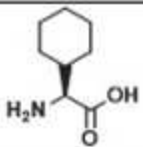
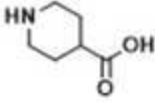
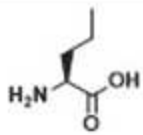
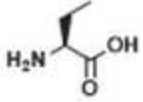
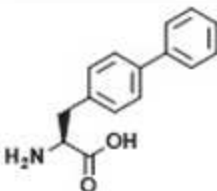
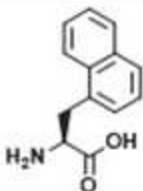
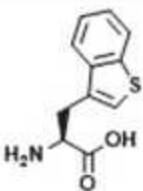
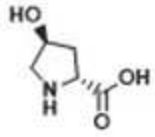
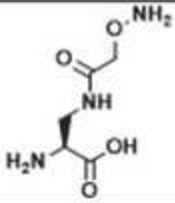
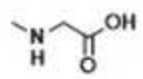
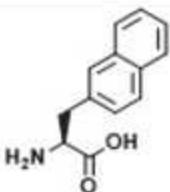
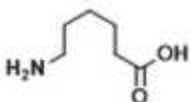
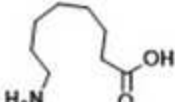
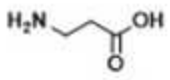
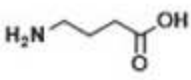
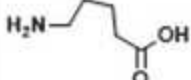
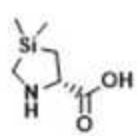
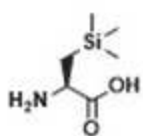
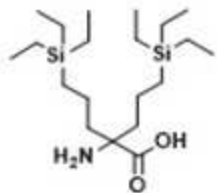
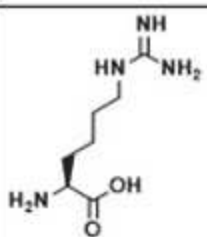
Tableau 1.1. Comparaison des séquences des domaines PDZ de CAL, NHERF1 et NHERF2.....	31
Tableau 1.2. Constantes d'inhibition (K _i) des différents candidats iCAL.....	39
Tableau 4.1. Séquences et caractéristiques des peptides étudiés.....	85
Tableau 4.2. Affinité et sélectivité d'iCAL36 et des conjugués CPP-iCAL36 pour CALP.	104
Tableau 6.1. AANN utilisés dans ce chapitre.....	135
Tableau 6.2. Comparaison in vitro de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL36 et d'iCAL-Q6.....	145
Tableau 6.3. Caractérisation in vitro de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL-Q13.....	148
Tableau 6.4. Caractérisation in vitro de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL-Q27 et d'iCAL-Q28.	151
Tableau 7.1. Séquences et caractéristiques physico-chimiques des peptides étudiés.....	159
Tableau 7.2. Résumé du criblage de conjugués CPP-iCAL36.....	163
Tableau 7.3. Résumé des expériences menées pour la détermination des voies d'endocytose employées par les conjugués peptidiques TRI36 et P36.....	165
Tableau 7.4. Rationalisation du caractère des résidus augmentant l'affinité pour les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1 dans le cas de mono-substitutions de la séquence ANSRWPTSII (iCAL36).....	169
Tableau 7.5. Séquences des peptides iCAL-2G identifiées au cours de ces travaux.....	172
Tableau 7.6. Affinité des peptides iCAL pour les protéines CALP, TIP-1 et N2P2.	173

Liste des figures

Figure 1.1. Mécanismes de l'épaississement du mucus chez les patients CF.	16
Figure 1.2. Représentation des domaines de la protéine CFTR.	18
Figure 1.3. Présentation des différentes classes de mutation du gène CFTR.	18
Figure 1.4. Défauts fonctionnels de la protéine p.Phe508del-CFTR.	19
Figure 1.5. Stratégies de traitement des défauts fonctionnels de la protéine p.Phe508del-CFTR.	21
Figure 1.6. Régulation de l'efflux de chlorure par CFTR et d'autres canaux ioniques.	24
Figure 1.7. Stratégies génomiques applicables au traitement de la mucoviscidose.	25
Figure 1.8. Régulation du trafic intracellulaire de la protéine CFTR par ses partenaires protéiques.	29
Figure 1.9. Interaction du domaine PDZ de la protéine CAL avec son ligand peptidique iCAL36.	30
Figure 1.10. Alignement de la structure de CALP avec celles de N1P1, N1P2, N2P1 ou N2P2.	32
Figure 1.11. Criblage de PPI par la méthode du phage display.	33
Figure 1.12. Criblage de PPI par la méthode du double hybride.	34
Figure 1.13. Préparation de banques peptidiques par synthèse SPOT.	36
Figure 1.14. Principes du PepScan, de la SubAna et de la ComLib.	37
Figure 1.15. Processus du peptide inversé.	38
Figure 1.16. Modélisation du complexe CALP/iCAL36 ₁₀	40
Figure 1.17. SubAna d'iCAL35 ₁₀ avec des aminoacides de configuration D (données non publiées).	41
Figure 1.18. Méthodes envisageables pour la vectorisation de molécules thérapeutiques.	42
Figure 1.19. Stratégies covalente et non-covalente pour la vectorisation par des CPP.	46
Figure 1.20. Mécanismes d'endocytose.	48
Figure 1.21. Modèles de translocation directe.	50
Figure 1.22. Endocytose, disruption membranaire et cytotoxicité.	51
Figure 4.1. Effet des conjugués CPP-iCAL36 sur la viabilité de cellules Caco-2 et Calu-3.	93
Figure 4.2. Efficacité d'internalisation des peptides *CPP-iCAL36 par des cellules Caco-2 et Calu-3.	95
Figure 4.3. Cinétique d'entrée de *TRI36 et de *P36 dans des cellules Caco-2 et Calu-3.	97
Figure 4.4. Images représentatives de l'internalisation des *CPP-iCAL36 dans des cellules Caco-2.	99
Figure 4.5. Images représentatives de l'internalisation des *CPP-iCAL36 dans des cellules Calu-3.	100
Figure 4.6. Efficacité d'internalisation des peptides *CPP-iCAL36 en présence de sérum.	102
Figure 4.7. Efficacité d'internalisation de *TRI36 et *P36 par des cellules CFBE41o-.	103
Figure 4.8. Mesure de l'affinité des peptides iCAL36 et TRI36 pour CALP, N2P1 et N2P2 par FP.	105
Figure 4.9. Spectres de dichroïsme circulaire représentatifs des peptides TRI36 et P36.	107
Figure 4.10. Analyse du mécanisme d'internalisation énergie-dépendent des conjugués *TRI36 et de *P36 dans des cellules Caco-2.	109
Figure 4.11. Images représentatives de la colocalisation de *TRI36 et de *P36 avec des marqueurs d'endocytose dans des cellules Caco-2.	110
Figure 4.12. Influence de l'inhibition sélective des voies d'endocytose sur la transfection de *TRI36 et de *P36 dans des cellules Caco-2.	111
Figure 4.13. Influence du relargage des conjugués *TRI36 et de *P36 hors des endosomes suite au traitement à la chloroquine.	113
Figure 4.14. Images représentatives de la colocalisation des conjugués *TRI36 et de *P36 avec des marqueurs d'endosomes ou des lysosomes dans des cellules Caco-2.	114
Figure 4.15. Images représentatives de cellules Caco-2 présentant un marquage homogène de peptide *TRI36.	114

Figure 6.1. Efficacité de couplage de l'extrémité C-terminale des AANN sur HMPA et sur β Ala, et de leur extrémité N-terminale avec β Ala.	139
Figure 6.2. Introduction d'AANN dans la séquence d'iCAL36 en mono-mutation : effets sur l'interaction avec les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1.	141
Figure 6.3. Introduction d'AANN dans la séquence d'iCAL36 en bi-mutation (P^0 et P^{-1}) : effets sur l'interaction avec les protéines CALP ou N2P2.	143
Figure 6.4. Introduction d'AANN dans la séquence d'iCAL-Q2 en bi-mutation (P^{-4} et P^{-5}) : effets sur l'interaction avec les protéines CALP ou N2P2.	144
Figure 6.5. Affinité des peptides iCAL36 et iCAL-Q6 pour CALP, N2P2 et TIP-1 par FP.	146
Figure 6.6. Introduction d'AANN dans la séquence d'iCAL-Q3 en bi-mutation (P^{-4} et P^{-5}) : effets sur l'interaction avec les protéines CALP ou N2P2.	147
Figure 6.7. Affinité du peptide iCAL-Q13 pour CALP, N2P2 et TIP-1 par FP.	148
Figure 6.8. Introduction d'AANN dans la séquence ANSRWPTSIt en bi-mutation (P^{-1} et P^{-5}) : effets sur l'interaction avec les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1.	150
Figure 6.9. Influence de l'échange de la position P^{-4} par ϵ	151
Figure 6.10. Affinité des peptides iCAL-Q27 et iCAL-Q28 pour CALP, N2P2 et TIP-1 par FP.	152
Figure 7.1. Modèle comparant les biais liés aux protéines transmembranaires en cytométrie de flux et spectroscopie de fluorescence pour l'internalisation de peptides *CPP-iCAL36.	158
Figure 7.2. Processus du peptide inversé optimisé (PIPE ^{PLUS}).	168
Figure 7.3. Structure chimique des peptides iCAL36, iCAL-Q6, iCAL-Q13, iCAL-Q27 et iCAL-Q28.	173
Figure 7.4. Comparaison de l'affinité des peptides iCAL36, iCAL-Q6, iCAL-Q13, iCAL-Q27 et iCAL-Q28 pour CALP, N2P2 et TIP-1 par FP.	174

Liste des acides aminés non-naturels utilisés

	tert-leucine α		3-nitrotyrosine δ		ornithine ϕ
	norleucine γ		β -thiénylalanine ψ		cyclohexylglycine ν
	acide 4-pipéridine carboxylique θ		norvaline ρ		acide 2-amino butyrique τ
	<i>p</i> -phénylphénylalanine ϖ		1-naphtylalanine ω		3-benzothiénylalanine χ
	3-hydroxyproline ϵ		(aminooxy méthylcarbonyl) aminoalanine η		sarcosine ι
	2-naphtylalanine κ		acide 6-amino hexanoïque π		acide 8-amino octanoïque σ
	β -alanine β		acide 4-amino butyrique $\omicron$		acide 5-amino butyrique Δ
	silaproline χ		(triméthylsilyl) alanine ϵ		
	di(triéthylsilyl propyl)glycine ϕ		homoarginine H		

Chapitre 1

-

Etude bibliographique

1.1. La mucoviscidose

1.1.1. Incidence, cause et symptômes de la mucoviscidose

La mucoviscidose (cystic fibrosis, CF) est, chez les populations d'origine caucasienne, la plus commune des maladies génétiques létales à transmission autosomique récessive. L'incidence de la mucoviscidose est géographiquement hétérogène : en France par exemple, elle est comprise entre 1/2 500 (Bretagne) et 1/10 000 (Provence-Alpes-Côte d'Azur)¹. En moyenne, un nouveau-né sur 3 500 est atteint par la maladie : une explication à cette prévalence élevée est que l'état hétérozygote de la maladie aurait permis de mieux résister à des maladies telles que la tuberculose².

La mucoviscidose est causée par des mutations du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), situé sur le long bras du chromosome 7 (locus 7q31.2)³. La protéine CFTR est un canal ionique participant à l'efflux des ions chlorure (Cl^-) et étant impliqué dans l'homéostasie des cellules épithéliales et la clairance mucociliaire des voies respiratoires. Plus de 2 000 mutations différentes du gène CFTR ont été décrites, chacune affectant les patients de façon plus ou moins sévère. Ces différentes mutations provoquent une perte partielle ou totale de sa fonctionnalité, qui mène à l'épaississement et l'accumulation du mucus extracellulaire dans de nombreux organes (**Figure 1.1**), ce qui en fait une maladie pluriviscérale⁴. La mucoviscidose n'est donc pas une maladie unique : chaque mutation nécessite un traitement personnalisé et adapté.

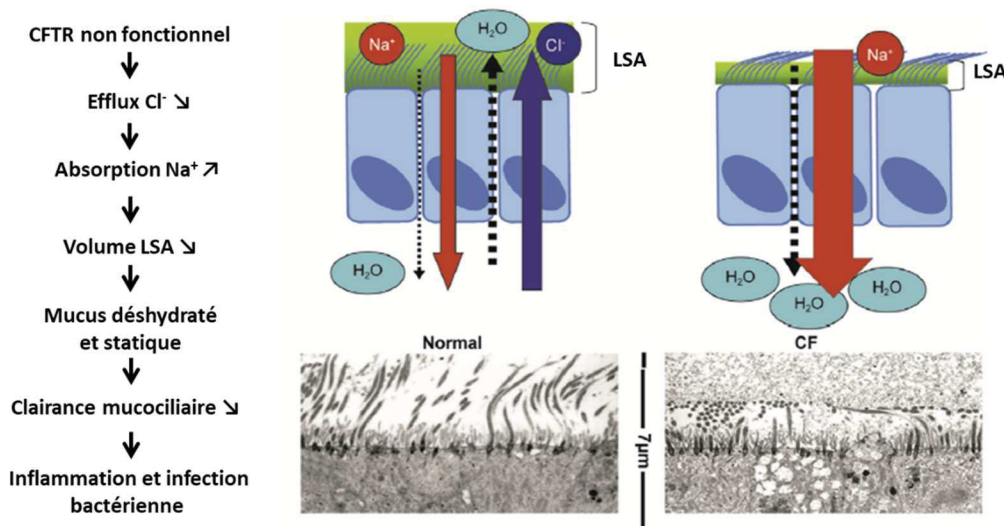


Figure 1.1. Mécanismes de l'épaississement du mucus chez les patients CF.

La perte de fonctionnalité du canal CFTR provoque un déplacement de l'équilibre entre sécrétion de chlorure et absorption de sodium, ce qui diminue le volume de liquide de surface des voies aériennes (LSA) et mène à un mucus déshydraté. Adapté de Banjar et Angyalosi⁵.

Dans le poumon des patients atteints de mucoviscidose (patients CF), le mucus ne peut plus être évacué convenablement par les cellules ciliées⁵, ce qui provoque une obstruction et une inflammation des bronches.

Du fait de l'absence de transfert des ions bicarbonate (HCO_3^-), halogénure ou pseudo-halogénure (thiocyanate SCN^- , espèces réactives de l'oxygène XO^-), le pH du mucus est dérégulé et ses propriétés bactéricides sont perdues, ce qui cause des infections sino-respiratoires⁴. En plus de ces affections pulmonaires, les patients CF souffrent souvent d'insuffisance pancréatique, de troubles de croissance dus à la mauvaise absorption des nutriments par le tractus gastro-intestinal, de dysfonctionnement des glandes sudoripares ou de troubles de fertilité⁴. L'inflammation et l'insuffisance pulmonaires sont les principales causes de mortalité chez les patients CF. Sous traitement, l'espérance de vie des patients peut aujourd'hui atteindre les cinquante ans⁶. Néanmoins ces traitements sont seulement palliatifs et ne permettent toujours pas d'envisager une guérison définitive et une rémission totale de la maladie.

1.1.2. La protéine CFTR et ses mutations

1.1.2.1. Caractérisation, structure et fonction du canal CFTR

La protéine CFTR est un canal ionique régulé par l'adénosine monophosphate cyclique. Il est localisé à la membrane apicale des cellules épithéliales : on le retrouve dans des organes tels que le poumon, l'intestin, le pancréas, le rein ou l'appareil reproducteur masculin. Il fait partie des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*), qui utilisent l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) pour transférer des molécules à travers la membrane plasmique⁷. Il interagit également avec d'autres canaux et transporteurs ioniques tels que le canal *Epithelial Na⁺ Channel* (ENaC), qui régule l'absorption intracellulaire des ions sodium^{8,9}.

La protéine CFTR est formée d'une chaîne unique de 1 480 acides aminés et présente une architecture typique des transporteurs ABC. Elle comporte deux domaines transmembranaires (*membrane-spanning domains*, MSD ; ou *transmembrane domains*, TMD) chacun composé de 6 hélices α fortement basiques qui délimitent un pore sélectif des petits anions^{4,10}. Elle est également constituée de deux domaines d'interaction aux nucléotides (*nucleotide-binding domains*, NBD1 et NBD2) qui, associés au domaine régulateur (RD), gèrent l'ouverture et la fermeture du canal¹¹ (**Figure 1.2**).

1.1.2.2. Classification des mutations du gène CFTR

Les mutations du gène CFTR sont regroupées en différentes classes, indicatrices de la gravité de l'atteinte du patient^{5,6} (**Figure 1.3**). Les mutations de classe I à III sont « sévères » et mènent à une activité du canal CFTR nulle ou résiduelle. Les mutations « peu sévères » (classes IV à VI) maintiennent quant à elles une activité de la protéine CFTR réduite mais significative impliquant des symptômes moins lourds. Il a été observé que les patients hétérozygotes présentant deux mutations « sévères » sont plus gravement atteints que ceux présentant une mutation « sévère » et une mutation « peu sévère »¹². Les mutations de classe I sont dues à des mutations non-sens ou frame-shift, les mutations de classe II sont causées par des mutations faux-sens ou des délétions, et les mutations de classe III à VI sont causées par des mutations faux-sens ou des défauts d'épissage (classe V). Toutes les mutations de classe III sont situées sur les NBD, ce qui explique leur influence sur la probabilité d'ouverture du canal¹².

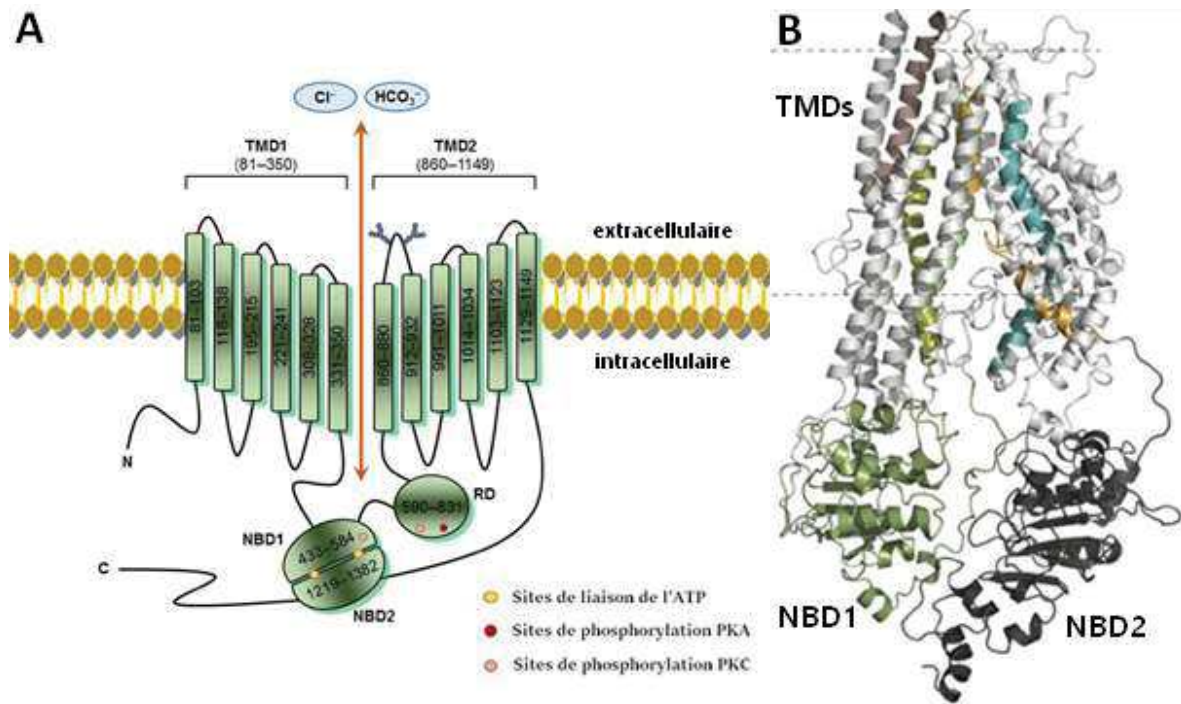
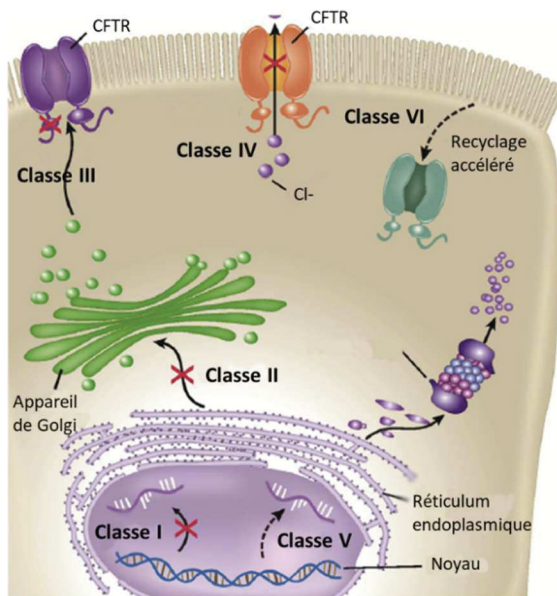


Figure 1.2. Représentation des domaines de la protéine CFTR.

(A) Représentation schématisée (d'après Lopes-Pacheco¹³) faisant figurer les domaines transmembranaires TMD1 et TMD2 et les domaines intracellulaires NBD1, NBD2 et RD. Les sites de phosphorylation PKA et PKC se trouvent sur le domaine RD. Les sites de liaison à l'ATP sont à l'interface des domaines NBD1 et NBD2. Les extrémités N- et C- terminales sont situées dans le cytoplasme. (B) Modélisation de la structure tridimensionnelle de la protéine CFTR (d'après Das et al¹⁴) incluant des contraintes issues de données expérimentales. Le domaine régulateur RD n'est pas inclus.



Classe I : synthèse de CFTR stoppée

Classe II : trafic intracellulaire perturbé

Classe III : activation/régulation défectueuse

Classe IV : conduction réduite

Classe V : quantité de CFTR réduite

Classe VI : endocytose rapide à la membrane apicale

Figure 1.3. Présentation des différentes classes de mutation du gène CFTR.

Les différentes classes de mutations sont indicatrices de la gravité de l'atteinte du patient. Les mutations de classe I à III affectent de façon plus importante la fonctionnalité du canal CFTR, d'où des symptômes plus graves chez le patient. Adapté de Banjar et Angyalos⁵.

1.1.2.3. La mutation p.Phe508del : trois défauts fonctionnels

La mutation la plus fréquente du gène CFTR est une délétion de trois nucléotides au niveau du dixième exon du gène, aboutissant à la perte d'un résidu phénylalanine en position 508 (mutation p.Phe508del)¹⁵. Cette mutation de classe II, située sur le domaine NBD1¹⁶, provoque un défaut de repliement de la protéine dans le réticulum endoplasmique (ER). 85% des patients CF portent au moins un allèle p.Phe508del, et près de 65% en sont porteurs homozygotes^{15,17}.

Le défaut de repliement de la protéine CFTR mène à trois conséquences fonctionnelles (**Figure 1.4**). La première est la dégradation précoce de la protéine CFTR mutée, suite à son interaction avec les protéines chaperons Hsp70 et Hsp90 au niveau du réticulum endoplasmique¹⁸⁻²⁰. Ces protéines chaperons ne parviennent pas à corriger le défaut de repliement de la protéine CFTR mutée et forment des liaisons fortes avec elle, puis mènent à son ubiquitination par un complexe ubiquitine ligase E3 ciblant sélectivement les protéines mal repliées. La protéine CFTR ubiquitinée est alors menée au protéasome pour y être dégradée^{20,21}. La fraction de protéine CFTR ayant échappé à la dégradation protéasomale est par la suite plus prompte à être ubiquitinée dans les compartiments post-Golgi par une voie CHIP-dépendante^{22,23}.

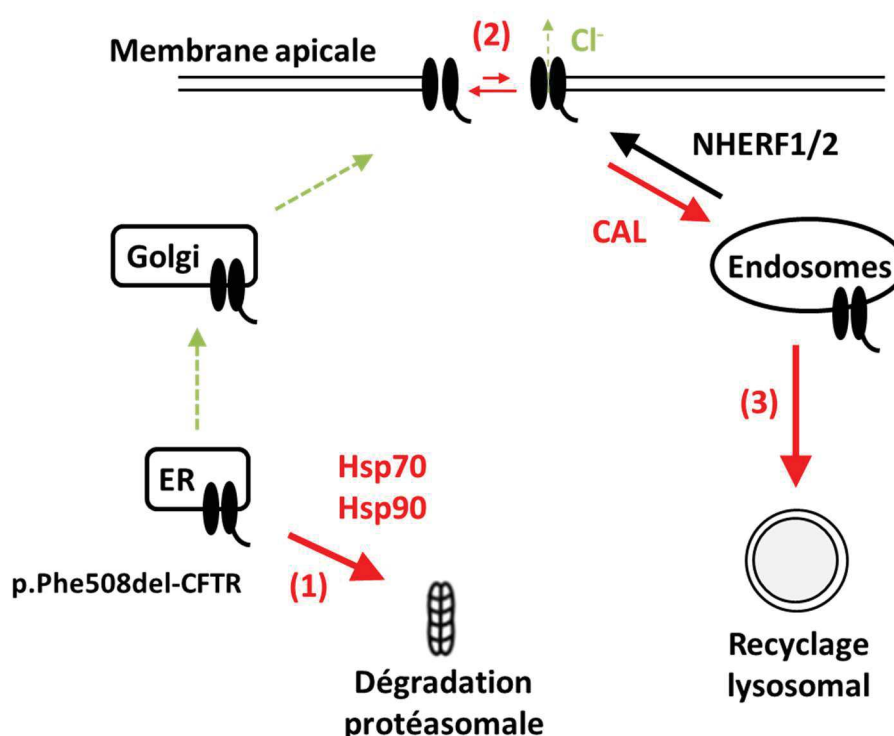


Figure 1.4. Défauts fonctionnels de la protéine p.Phe508del-CFTR.

La protéine p.Phe508del-CFTR présente trois défauts fonctionnels : (1) un repliement structurel défectueux dans le réticulum endoplasmique (ER) menant à une dégradation par le protéasome (ERAD) ; (2) une diminution de la probabilité d'ouverture P_o du canal p.Phe508del-CFTR présent à la membrane apicale ; (3) une accélération de l'endocytose de la protéine, résultant en une baisse de sa demi-vie à la membrane apicale.

Ainsi, seulement 1% de la protéine CFTR mutée est capable de rejoindre la membrane apicale des cellules épithéliales²⁴, où elle est complexée aux protéines NHERF1 et NHERF2 (Na^+/H^+ Exchanger Regulatory

Factor 1 et 2) qui facilitent son ancrage à la membrane^{20,25}. Toutefois, le canal p.Phe508del-CFTR présente une probabilité d'ouverture P_0 plus faible (**Figure 1.4**) que celle du type sauvage *wt*-CFTR²⁶.

Enfin le troisième défaut concerne la demi-vie du canal p.Phe508del-CFTR à la membrane (< 4 heures) qui est considérablement plus courte que celle de la protéine de type sauvage *wt*-CFTR (> 48 heures)²⁷. Le canal *wt*-CFTR est normalement endocyté par une voie impliquant la protéine CAL (*CFTR-Associated Ligand*)²⁸, puis est le plus souvent recyclé et reconduit à la membrane plasmique. Mais chez les patients CF, la faible stabilité du canal p.Phe508del-CFTR le rend hautement susceptible d'être endocyté à l'aide de la protéine CAL puis redirigé vers le lysosome où il sera définitivement dégradé²⁹.

Ces trois défauts déterminent la quantité de protéine CFTR à la membrane apicale et affectent donc le flux de chlorure et de bicarbonate : ils ont donc un rôle direct sur la viscosité du mucus.

1.1.3. Etat des lieux de la recherche thérapeutique

A ce jour, il n'y a pas de traitement curatif adapté à tous les patients CF. Les traitements quotidiennement administrés sont palliatifs et impliquent entre autres :

- Des antibiotiques (céphalosporines, macrolides, fluoroquinolones...) contre les bactéries les plus courantes chez les patients CF (*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*)^{30,31}, ainsi que de fortes doses d'anti-inflammatoires³² ;
- Des mucolytiques et soins kinésithérapiques qui facilitent l'évacuation du mucus^{30,33} ;
- Des enzymes pancréatiques gastro-résistantes (Pancreaze³⁴, Liprotamase³⁵) et des suppléments en nutriments³⁶ ;
- Une bithérapie augmentant la stabilité et la probabilité d'ouverture de la protéine CFTR (Orkambi®) chez les patients porteurs de la mutation p.Phe508del-CFTR.

Malgré d'importantes avancées thérapeutiques³⁷⁻⁴¹, les traitements existants ont de lourds effets secondaires et ne peuvent qu'alléger les symptômes des patients CF⁴². Des thérapies plus efficaces et moins contraignantes sont donc en cours de développement pour traiter les racines de la pathologie⁴³. On en distingue deux catégories :

- Les thérapies dites protéiques, qui agissent sur la protéine CFTR mature ou sur d'autres canaux ioniques afin de normaliser l'efflux d'ions chlorure, et donc de traiter les symptômes à leur source ;
- Les thérapies dites génétiques, qui ciblent le gène CFTR en vue de corriger la mutation ou de créer *de novo* une protéine CFTR non-mutée.

1.1.3.1. Modulation de l'activité de la protéine CFTR

Plusieurs études ont montré qu'une restauration partielle de l'activité du canal CFTR (5% à 35% du *wt*-CFTR) suffirait à obtenir un bénéfice thérapeutique significatif et une diminution de l'atteinte du patient^{30,44,45}. Plusieurs groupes développent donc des modulateurs de CFTR, ciblant directement la protéine ou renforçant l'efflux ionique par des voies alternatives. En particulier, de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur les trois défauts fonctionnels induits par la mutation p.Phe508del (**Figure 1.5**) ont été appliquées.

- Des « correcteurs » du mauvais repliement post-traductionnel de la protéine CFTR présentant une mutation de classe II renforcent sa stabilité et réduisent sa dégradation protéasomale⁴⁶ ;
- Des « potentiateurs » renforçant la faible probabilité d'ouverture du canal muté mènent à une augmentation de l'efflux ionique, potentiellement applicable aux mutations de classe II, III et IV⁴⁷ ;
- Des « stabilisateurs » renforçant la demi-vie de la protéine CFTR à la membrane apicale mènent à son accumulation⁴⁸, ce qui serait une approche efficace pour les mutations de classe V et VI.

Ces approches sont potentiellement combinables : un exemple de multi-thérapie impliquant plusieurs modulateurs de CFTR, l'Orkambi®, a été mis sur le marché en 2015 (voir chapitre 1.1.3.1.3).

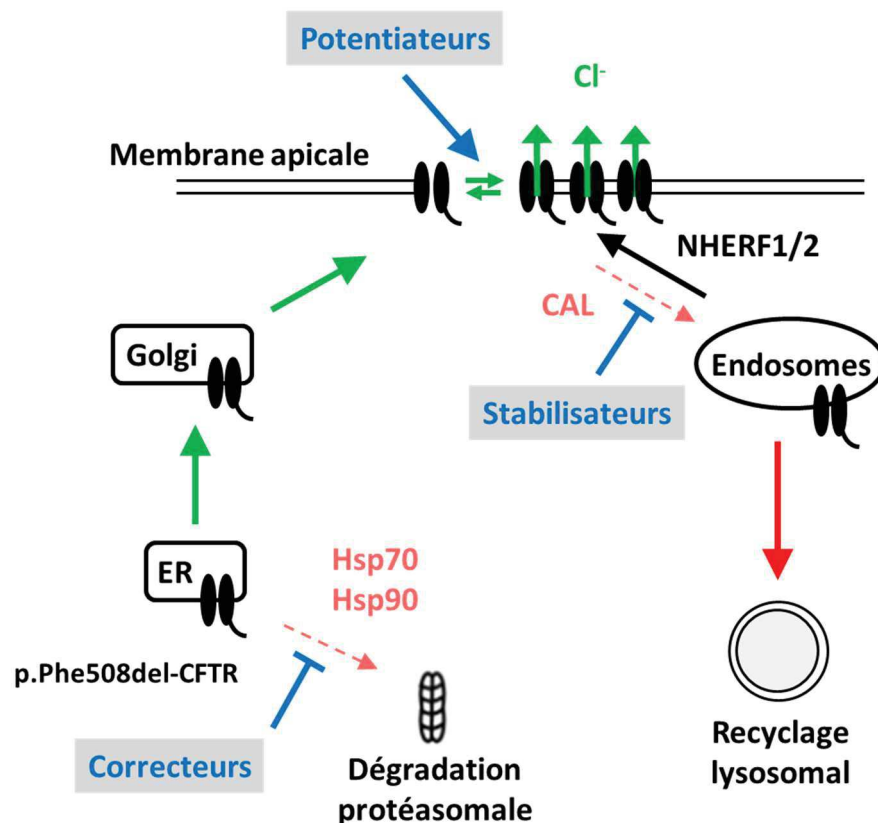


Figure 1.5. Stratégies de traitement des défauts fonctionnels de la protéine p.Phe508del-CFTR.

Stratégies thérapeutiques associées à chaque défaut fonctionnel : (1) développement de protéines chaperons « correcteurs » du repliement du canal p.Phe508del-CFTR ; (2) utilisation de « potentiateurs » renforçant la probabilité d'ouverture P_o du canal p.Phe508del-CFTR ; (3) usage de « stabilisateurs » augmentant la demi-vie du canal CFTR à la membrane.

1.1.3.1.1. Correcteurs de la protéine CFTR

Les correcteurs sont des petites molécules organiques visant à corriger le défaut de maturation et de transport de la protéine CFTR, lui permettant de se positionner correctement à la membrane cellulaire. Ils mènent à une meilleure efficacité de repliement de la protéine et à une amélioration de son trafic intracellulaire, et sont donc adaptés aux mutations de classe II. Ces agents peuvent être des chaperons pharmacologiques se fixant sur la protéine ou des régulateurs des processus de repliement⁴⁹.

Le principal correcteur de CFTR est le Lumacaftor® (VX-809, Vertex Pharmaceuticals). Ce composé renforce *in vitro* la quantité de protéine CFTR à la membrane apicale avec une efficacité supérieure à ceux de correcteurs antérieurs tels que VRT-325⁵⁰ ou corr-4a⁵¹ et a montré une diminution du taux de chlorure dans la sueur de patients p.Phe508del⁴⁶. Toutefois, lors d'essais cliniques aucune amélioration de la capacité respiratoire des patients (volume expiratoire maximal par seconde, FEV₁) n'a pu être mise en évidence avec le Lumacaftor® seul⁵². De fait, d'autres correcteurs ont récemment été conçus et menés aux essais cliniques, tels que VX-445 et VX-659 (Vertex Pharmaceuticals) ou PTI-801 (Proteostasis Therapeutics).

1.1.3.1.2. Potentiators de la protéine CFTR

Les potentiators de CFTR agissent sur la phosphorylation du domaine RD de la protéine et renforcent sa probabilité d'ouverture P_o. Ils sont donc indiqués contre les mutations de type III et IV. Deux mécanismes d'action ont été identifiés : les analogues de la génistéine interagissent directement avec la protéine CFTR et dépendent donc de la mutation considérée⁵³⁻⁵⁵ et les analogues de la forskoline activent les cascades enzymatiques augmentant les taux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique⁵⁶.

L'Ivacaftor® (VX-770 ou Kalydeco®, Vertex Pharmaceuticals)⁵⁷ fut une révélation dans le domaine des potentiators car il permet de traiter la principale mutation de classe III, G551D⁴⁷. L'Ivacaftor® normalise le taux de chlorure dans la sueur, renforce la capacité respiratoire des patients et réduit la fréquence des infections par *P. aeruginosa*¹³. Des études précliniques mettent également en évidence son effet bénéfique sur un grand nombre de mutations de classe III et IV⁵⁸. Son mécanisme est similaire à celui de la génistéine⁵⁹.

1.1.3.1.3. Bithérapie correcteur-potentiater : bénéfices et limitations

La quantité de protéine CFTR à la membrane apicale est trop faible pour observer l'effet éventuel d'un potentiater sur des mutations de classe II⁶⁰. Toutefois, l'association de l'Ivacaftor® à un correcteur tel que le Lumacaftor® a permis d'arriver à un effet thérapeutique sur les patients portant de telles mutations. La bithérapie résultante, Orkambi®, est à ce jour le seul traitement à avoir permis une amélioration pulmonaire et pancréatique significative des patients p.Phe508del^{37,61}. L'Orkambi® a été approuvé par la FDA en 2015, puis par l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) en 2016. Cette bithérapie est une preuve que des effets synergiques peuvent être atteints en combinant différentes classes de modulateurs du canal CFTR.

Les effets thérapeutiques apportés par l'Orkambi® sont toutefois insuffisants⁶². De plus, des études *in vitro* démontrent que le Lumacaftor® induit l'activité de CYP3A (*Cytochrome P450, family 3, subfamily A*), qui dégrade l'Ivacaftor® : des quantités plus élevées d'Ivacaftor® sont donc requises et sont associées à de lourds effets secondaires tels que des dommages hépatiques, cardiaques ou intestinaux, qui forcent parfois

les patients à arrêter le traitement⁶³. Enfin, trois études indépendantes montrent que des doses trop élevées d'Ivacaftor® diminuent la stabilité de la protéine CFTR corrigée par le Lumacaftor®⁶⁴⁻⁶⁶.

Divers correcteurs non-inducteurs de CYP3A ont donc été développés. Le plus prometteur est le Tezacaftor® (VX-661) : la bithérapie Tezacaftor®/Ivacaftor® a démontré des effets supérieurs à l'Orkambi®⁶⁷ et a passé la phase III des essais cliniques (EVOLVE, EXPAND, essai clinique NCT02412111) ; elle est désormais commercialisée sous le nom Symdeko®. Des trithérapies impliquant le Symdeko® et d'autres correcteurs de mécanismes différents sont aussi étudiées (NCT02951182, NCT03227471, etc.). De nouveaux potentiateurs ont également été identifiés, puis testés cliniquement en co-traitement avec le Lumacaftor®. En particulier, CTP-656 (Concert Pharmaceuticals, essai clinique NCT02971839) est un isotope nonadeutééré de l'Ivacaftor® plus résistant au cytochrome CYP3A (brevet WO 2012158885 A1).

La problématique majeure reste la faible demi-vie de la protéine CFTR mutée à la membrane apicale, qui réduit l'efficacité des thérapies existantes. La priorité est donc d'identifier des stabilisateurs de la protéine CFTR qui vont compenser cet effet.

1.1.3.1.4. Stabilisateurs du canal CFTR

Les stabilisateurs ont pour but d'augmenter la demi-vie du canal CFTR à la membrane apicale, et donc la quantité de canaux ioniques disponibles par unité de temps. Ces approches permettraient de traiter les mutations de classe V et VI mais également, en trithérapie avec un potentiateur et un correcteur, de traiter les mutations de classe II, III et IV.

Un mécanisme particulièrement intéressant dans cette optique est l'ancrage de la protéine CFTR par les protéines NHERF. L'activation de la voie de signalisation Rac1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) promeut l'interaction de la protéine CFTR avec NHERF1 et renforce sa demi-vie à la membrane apicale⁶⁸ : l'activation directe de Rac1 n'est toutefois pas souhaitable car elle peut enclencher des processus tumoraux⁶⁹. Une approche indirecte est alors explorée : l'inhibition de l'interaction CFTR/CAL par un peptide d'interface. La protéine CAL (*CFTR-Associated Ligand*) étant en compétition avec NHERF1 pour se lier à CFTR, inhiber l'interaction CFTR/CAL permet de maintenir la protéine CFTR plus longtemps à la membrane apicale, d'où une augmentation de son efflux extracellulaire de chlorure⁴⁸. Cette approche sera détaillée ultérieurement (chapitres 1.2.1.3 et 1.2.3).

1.1.3.2. Inhibiteurs de la protéine ENaC et autres cibles protéiques

Le canal CFTR module l'efflux extracellulaire des ions chlorure et diminue donc la force ionique intracellulaire. L'équilibre osmotique est rétabli par un efflux extracellulaire d'eau, qui alimente le liquide de surface des voies aériennes (LSA). Le canal *Epithelial Na⁺ Channel* (ENaC) a un rôle contraire : il provoque l'absorption d'ions sodium et d'eau par la cellule, provoquant une diminution du volume de LSA⁹. Lorsque la protéine CFTR est mutée, cet équilibre est déplacé dans le sens de la réduction du volume de LSA et de la déshydratation du mucus. Des bloqueurs du canal ENaC tels que l'amiloride⁶³, puis SPX-101 (phase II) ou VX-371 (Vertex Pharmaceuticals, phase IIa)⁷⁰ aident à rétablir cet équilibre. L'inhibition du canal par un système

ARN/lipide/peptide ainsi que l'inhibition de protéases activatrices du canal ENaC sont également documentées^{9,71}.

D'autres canaux ioniques sont impliqués dans l'efflux de chlorure (**Figure 1.6**) : certains sont activés par le calcium (*calcium-activated chloride channels*, CaCC) comme la protéine TMEM16A (*transmembrane member 16A*) ou le canal ORCC (*outward rectifying chloride channel*)⁷² ; d'autres sont de nature plus variée (tels SLC26A9, *solute carrier family 26 member 9*)⁷³. L'activation des récepteurs purinergiques activés par l'ATP (voie P2Y2) permettrait simultanément l'activation des CaCC et l'inhibition des canaux sodiques épithéliaux³⁰, ce qui permettrait de rétablir l'équilibre d'efflux/influx. Alternativement, l'inhibition de la protéine PDE5 (*phosphodiesterase 5*) par le sildénafil (Viagra®) ou le valdénafile (Levitra®) corrige la localisation de la protéine CFTR et réduit l'inflammation⁷⁴. Les doses de sildénafil requises sont toutefois trop élevées pour pouvoir envisager un traitement thérapeutique⁷⁵.

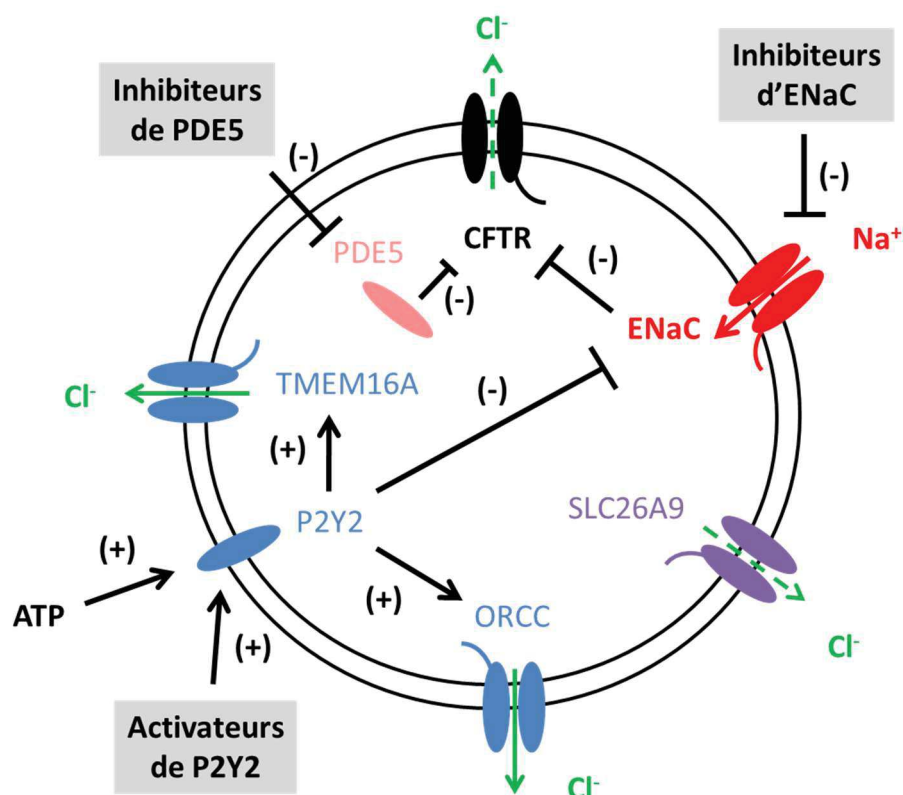


Figure 1.6. Régulation de l'efflux de chlorure par CFTR et d'autres canaux ioniques.

Lorsque le canal CFTR perd sa fonctionnalité, l'action d'ENaC devient majoritaire. L'inhibition du canal ENaC permet de rétablir l'équilibre entre l'efflux de chlorure et l'influx de sodium. La perte d'activité du canal CFTR mène également à la libération extracellulaire d'ATP, qui active les récepteurs P2Y2 activant en retour d'autres CaCC^{30,76,77}. L'activation thérapeutique des récepteurs P2Y2 pourrait avoir le même effet.

1.1.3.3. Thérapies du gène CFTR

Plutôt que de traiter les symptômes de la maladie ou de chercher à rétablir l'activité du canal CFTR mutée, certaines études ont cherché à corriger directement la mutation au niveau du gène CFTR. On parle alors de thérapie génique et d'édition du génome. Ces techniques nécessitent encore beaucoup de mise au

point, notamment au niveau de la sélectivité et de l'efficacité de la correction génomique, ou sur la vectorisation du matériel génétique correspondant. Toutefois, leur potentiel est considérable.

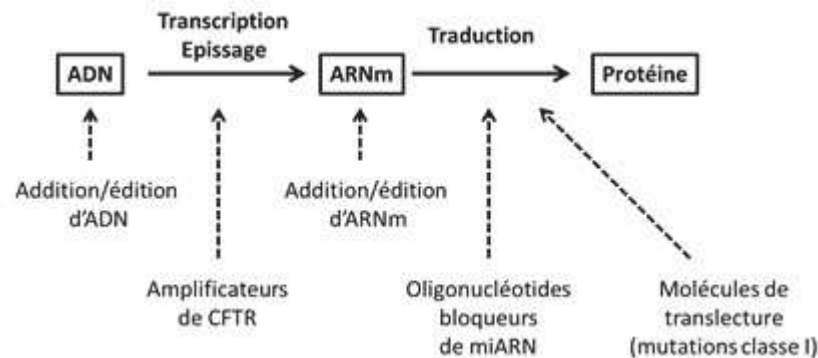


Figure 1.7. Stratégies génomiques applicables au traitement de la mucoviscidose.

Le matériel génétique codant la protéine CFTR peut être introduit sous forme d'ADN complémentaire, de plasmide ou d'ARNm, ou réparé par édition du génome. Les amplificateurs de CFTR augmentent post-transcriptionnellement la quantité d'ARNm produit. Les oligonucléotides bloqueurs inhibent l'interaction de micro-ARN déstabilisateurs de l'ARNm CFTR avec le ribosome. Les molécules de translecture sont applicables aux mutations de classe I et permettent au ribosome de traduire l'ARNm au-delà des codons stop mutationnels.

1.1.3.3.1. Correction du gène CFTR par addition d'ADN complémentaire

L'addition d'ADN consiste à introduire dans les cellules une copie saine du gène codant le wt-CFTR, sous forme d'ADN complémentaire (ADNc) ou de plasmide (**Figure 1.7**). Cet ADN est répliqué, transcrit et traduit en une protéine fonctionnelle. Cette approche est indépendante de la mutation du gène CFTR et pourrait donc être appliquée à tous les patients CF. Néanmoins, la délivrance spécifique de l'ADN reste un problème difficile à surmonter. Plusieurs méthodes de vectorisation (liposomes cationiques⁷⁸⁻⁸¹, vecteurs viraux^{82,83} ou systèmes nanoparticulaires^{84,85}) sont aujourd'hui étudiées afin de renforcer l'internalisation de l'ADNc et d'obtenir une activité du canal CFTR menant à une meilleure fonction pulmonaire des patients CF. En particulier, obtenir une expression de CFTR dans 25% des cellules constituant les épithéliums pulmonaires de patients p.Phe508del y normaliserait la fluidité du mucus⁸⁶.

A ce jour, l'insertion de plasmides ou d'ADNc exogènes dans les cellules n'est effective que durant quelques semaines : l'expression du gène étant progressivement perdue⁷², un traitement par cette technologie devrait donc être administré à vie pour apporter un bénéfice durable au patient CF.

1.1.3.3.2. Correction du gène CFTR par édition de l'ADN

Plutôt que d'introduire une nouvelle copie du gène CFTR par addition d'ADN, l'édition du génome permet la correction directe du gène portant la mutation. Elle a été rendue possible par deux types de nucléases : les enzymes de restriction telles que les ZFN (zinc-finger nucleases) ou les TALEN (transcription activator-like effector nucleases)⁸⁷⁻⁸⁹, et les protéines associées aux CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) telles Cas9 (CRISPR-associated protein 9)^{90,91}. Ces deux systèmes permettent la génération de fragments d'ADN double brin. Cette fragmentation est majoritairement réparée par jonction d'extrémités non-homologues⁸⁸ : ce processus crée des erreurs dans le génome et mène fréquemment à la

dégradation du brin d'ADN. Mais lorsqu'une courte séquence d'ADN exogène est présente, elle peut servir de modèle de réparation et être insérée en lieu et place du fragment d'ADN initial par recombinaison homologue⁸⁸. Ces techniques permettent donc l'addition et la suppression de gènes de façon contrôlable.

L'avantage du système CRISPR/Cas9 est qu'au contraire des enzymes de restriction qui ont un site de reconnaissance spécifique, la fragmentation causée par Cas9 est définie par la présence d'un ARN guide (ARNg)^{92,93}. Il suffit donc de changer d'ARNg pour changer de cible, ce qui rend la technique bien plus versatile et facile à appliquer. En pratique, on construit un plasmide codant un/des ARNg, qui est intégré dans des vecteurs viraux puis utilisé pour infecter des cellules exprimant Cas9 (naturellement ou par transfection de la protéine/du gène correspondant), menant durablement aux mutations souhaitées⁹⁴.

Ce système révolutionnaire a ouvert la porte à de nouvelles approches de traitement⁴⁵, notamment sur des modèles d'organoïdes intestinaux CF et de cellules souches CF qui, une fois reprogrammés et différenciés, ont présenté une activité du canal CFTR semblable à celle de cellules saines^{95,96}. Un article récent montre également l'usage de ce système pour corriger des mutations liées à des défauts d'épissage⁹⁷. L'objectif est aujourd'hui d'améliorer la spécificité de Cas9⁹⁸ et le pourcentage de correction atteignable.

1.1.3.3.3. Thérapies de l'ARN messenger (ARNm) du CFTR

Une stratégie reportée dès 2004 démontre la possibilité d'éliminer la mutation p.Phe508del de l'ARNm en utilisant des oligonucléotides de type phosphorothioate (PS), capables de s'hybrider à l'ARNm par complémentarité de Watson-Crick⁹⁹. Cet analogue est conçu de manière à s'associer à l'ARNm du CFTR sur le site de la mutation, ce qui active l'ARNase H endogène qui va dégrader l'ARNm au niveau de la mutation. L'oligonucléotide de type PS étant résistant aux nucléases et ARNase H, il peut servir comme guide et permettre la reconstruction de l'ARNm de wt-CFTR.

De façon analogue, ProQR Therapeutics a mis au point QR-010, un oligonucléotide anti-sens contenant le codon Phe508 et qui agit en tant que guide de traduction pour les patients porteurs de la mutation p.Phe508del⁶³ : ce composé est actuellement en phase clinique Ib (NCT02532764, NCT02564354). Alternativement, des oligonucléotides anti-sens ont été utilisés sur des cellules nasales de patients CF portant des mutations de classes V causées par un épissage incorrect : l'ARNm correspondant a pu être corrigé et a alors mené à la transcription d'un canal CFTR non-muté¹⁰⁰.

Une autre approche est l'usage d'amplificateurs de CFTR, qui agissent post-transcriptionnellement et augmentent spécifiquement la quantité d'ARNm CFTR produit¹⁰¹. Cet effet pourrait ensuite être potentialisé par d'autres classes de modulateurs de CFTR. Le composé PTI-428 (Proteostasis Therapeutics) est un amplificateur de CFTR qui a passé la phase I des essais cliniques (NCT0271845, NCT02846142).

1.1.3.3.4. Agents de translecture pour les mutations de classe I du gène CFTR

Les mutations de classe I sont dues à l'apparition d'un codon stop prématuré, provoquant une troncation majeure de la protéine (exemple : p.Gly542X, remplacement de la glycine 542 par un codon stop). Pour contourner ce problème, des molécules de translecture ont été développées : elles permettent au ribosome de dépasser ces codons prématurés (mais pas les codons stop « naturels ») en attirant à eux un aminoacyl-ARNt proche. L'effet provoqué est l'introduction d'un acide aminé aléatoire dans la chaîne protéique et la

poursuite de la biosynthèse^{102,103}. Dans un premier temps, des aminoglycosides ont pu être utilisés à cet effet, mais leur efficacité ne s'est pas révélée significative sur les patients, au contraire de leur toxicité à doses récurrentes^{104,105}.

Ataluren¹⁰⁶ (PTC124, Translarna®) est un agent de translecture développé par PTC Therapeutics qui ne présente pas de similarité structurale avec les aminoglycosides et ne partage pas leur toxicité¹⁰⁷. Toutefois, son efficacité n'a pas pu être prouvée en phase III (NCT02139306)¹⁰⁸ ou sur des organoïdes de patients CF¹⁰⁹, et le développement de la molécule a donc été abandonné.

1.1.3.3.5. Oligonucléotides bloqueurs d'interaction micro-ARN/ARNm

Les ARN non-codants (ARNnc)¹¹⁰ sont des oligonucléotides non traduits qui sont impliqués dans de nombreux phénomènes épigénétiques et post-transcriptionnels. Les ARNnc ont une grande diversité quantitative et fonctionnelle : ARN ribosomiques, ARN de transfert ou introns pour ne nommer que quelques exemples. En particulier, les micro-ARN sont des oligonucléotides simple brin de 21 à 24 bases qui ciblent exclusivement les extrémités 3'-UTR de leur ARNm cible et déstabilisent ainsi les transcrits qui leur sont spécifiques, et modulant leurs niveaux d'expression génique.

Divers micro-ARN modulent négativement la quantité d'ARNm de CFTR¹¹¹. Les miR-101, miR-145 et miR-384 régulent le passage de forts niveaux d'expression de la protéine CFTR chez le fœtus vers des niveaux plus faibles après la naissance. Entre autres, il a été démontré que les niveaux de miR-145 et miR-494 sont dérégulés chez les patients porteurs de la mutation p.Phe508del, et que l'usage de l'inhibiteur spécifique du canal CFTR (Inh172) augmente les niveaux de ces micro-ARN¹¹⁰. Il est donc possible qu'une baisse des niveaux de ces micro-ARN ait un effet positif sur les patients CF.

Au vu de la quantité de transcrits régulés par un seul micro-ARN, la modulation de la quantité globale de micro-ARN générée dans la cellule pourrait induire de nombreux effets imprévisibles sur le génome¹¹². Une solution ingénieuse consiste à développer des oligonucléotides d'interface bloquant sélectivement l'interaction du micro-ARN d'intérêt avec l'ARNm de CFTR, tout en maintenant sa capacité à interagir avec d'autres ARNm¹¹². Cette stratégie est étudiée extensivement dans l'équipe du Dr. Magali Taulan-Cadars (Laboratoire de Génétique des Maladies Rares, Montpellier).

1.1.3.4. Conclusion

Les récentes avancées thérapeutiques dans le domaine de la mucoviscidose sont très variées et encourageantes, même si elles n'atteignent pas encore les effets finaux souhaités. La combinaison de traitements symptomatiques améliore significativement la qualité de vie des patients, mais elle est contraignante et ne permet pas la guérison à proprement dit. Les additions et éditions du gène CFTR sont quant à elles très prometteuses : il est toutefois encore nécessaire d'optimiser la vectorisation du matériel génétique ainsi que la précision, le rendement et la spécificité de ces méthodes qui nécessitent un contrôle parfait pour ne pas causer de mutations indésirables. De plus, les thérapies géniques et la modification du génome posent des questions éthiques, d'autant plus lorsque le matériel génétique correspondant est introduit par des vecteurs viraux.

Dans un futur proche, les thérapies protéiques semblent donc être les plus adéquates. En particulier, les bithérapies Orkambi® et Symdeko®, démontrant des effets significatifs sur les patients p.Phe508del, constituent ensemble un point de départ solide. Leurs molécules actives pourraient aisément être combinées à des stabilisateurs, des amplificateurs de CFTR ou à des oligonucléotides bloqueurs dans une optique de médecine plus adaptée à la multitude de mutations du gène CFTR.

1.2. L'interaction CFTR-CAL comme cible biologique

1.2.1. Interactome protéique du CFTR

1.2.1.1. Trafic intracellulaire de la protéine CFTR mature

Une fois son passage à travers l'appareil de Golgi engagé, la protéine CFTR est impliquée dans de nombreuses interactions protéine-protéine (PPI). En particulier, NHERF1 participe à stabiliser la protéine CFTR à la membrane apicale des cellules épithéliales, tandis que CAL est le médiateur-clé de son endocytose²⁸. Un modèle détaillé des protéines impliquées dans le trafic intracellulaire de la protéine CFTR est présenté plus bas (**Figure 1.8**).

Après sa sortie par la face *trans* de l'appareil de Golgi (TGN), la protéine CFTR interagit avec la protéine CAL. Le complexe CFTR/CAL peut alors suivre deux voies : la première est une interaction avec la *syntaxin-6* (SYN6), une protéine SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors*) impliquée dans le transport vésiculaire entre le TGN et le lysosome¹¹³. La dégradation lysosomale de la protéine CFTR est médiée par un complexe tripartite entre les protéines CAL, SYN6 et MARCH2 qui est responsable de son ubiquitination¹¹⁴. La seconde possibilité est l'interaction du complexe CFTR/CAL avec la protéine TC10, une GTPase qui, une fois activée par la guanosine triphosphate (GTP) et/ou IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), initie l'exocytose du complexe CFTR/CAL et le dirige vers la membrane apicale, empêchant de fait le complexe CFTR/CAL d'interagir avec SYN6^{115,116}. Le complexe NHERF1/ezrine, qui est voisin de la membrane apicale, déplace alors la protéine CAL de son interaction avec le canal CFTR et prend en charge l'insertion de la protéine CFTR dans la membrane, où elle peut effectuer sa fonction de canal.

Au bout d'un certain temps, l'interaction CFTR/NHERF1 se dissocie. Une hypothèse proposée est que l'interaction de la protéine kinase A (PKA) avec le complexe CFTR/NHERF1/ezrine induise la dissociation de l'interaction CFTR/NHERF1¹¹⁷. A ce moment, la protéine CFTR est ré-endocytée et peut suivre deux voies possibles : interagir avec un nouveau complexe NHERF1/ezrine pour être réinsérée dans la membrane apicale, ou interagir avec CAL pour être dirigée vers sa dégradation lysosomale.

Au vu de ces mécanismes, les protéines CAL et NHERF1 peuvent être considérées comme des protéines adaptatrices¹¹³, permettant au canal CFTR d'interagir avec les protéines SYN6, TC10 ou ezrine, qui font elles-mêmes un lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine.

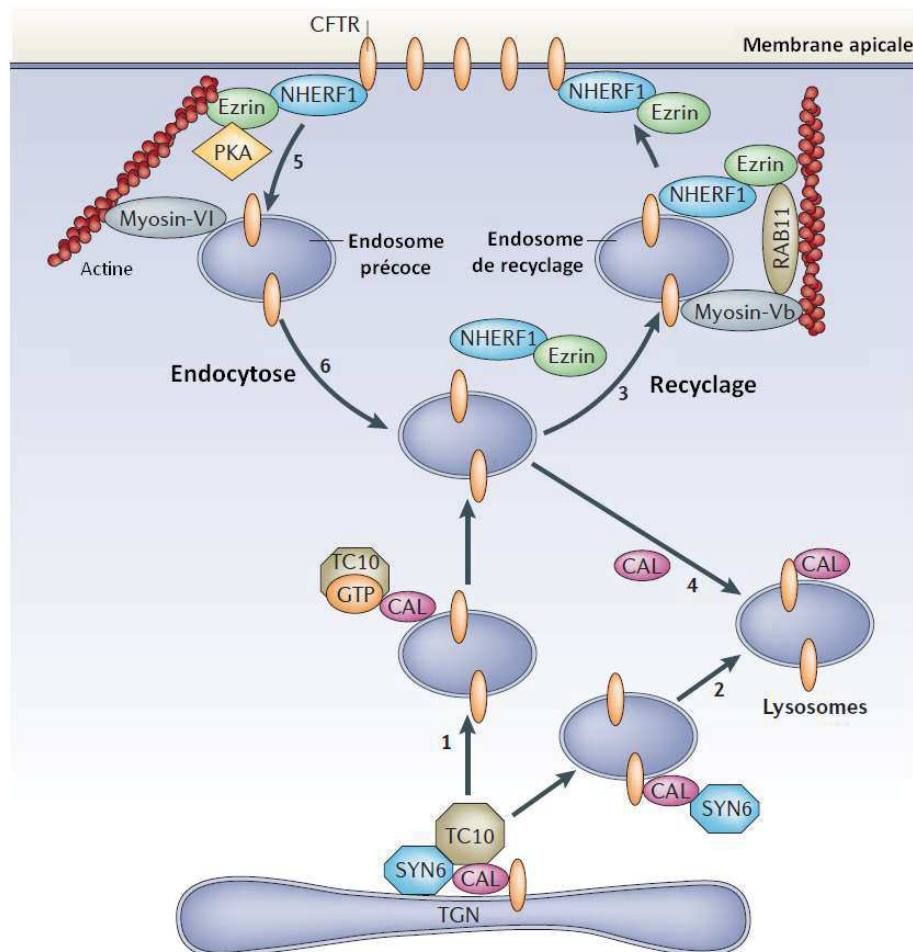


Figure 1.8. Régulation du trafic intracellulaire de la protéine CFTR par ses partenaires protéiques.

A la sortie de la face trans de l'appareil de Golgi (TGN), la protéine CFTR (représentée par l'ovale orange) interagit avec CAL, qui est fixée à la TGN par SYN-6. CAL interagit également avec la Rho GTPase TC10. (1) Quand TC10 est activée par la GTP, elle facilite l'entrée de CFTR dans une voie de recyclage/exocytose. (2) En absence d'activation de TC10, SYN6 dirige l'endosome du TGN vers le lysosome, menant à la dégradation de la protéine CFTR. (3) Le complexe NHERF1/ezrine déplace la protéine CAL de son interaction avec le canal CFTR, et mène l'endosome-CFTR à la membrane apicale de la cellule par un mécanisme assisté par la myosine-Vb et RAB11. La protéine CFTR est ensuite insérée dans la membrane par le complexe NHERF/ezrine, qui est relié au réseau d'actine. (4) Toutefois, si l'interaction CFTR/NHERF1/ezrine ne se produit pas, l'interaction CFTR/CAL persiste et l'endosome est dévié vers le lysosome. (5, 6) Quand la protéine NHERF1 se dissocie du canal CFTR (possiblement par l'action de la protéine kinase A), celui-ci est endocyté et retiré de la membrane. Il interagit alors soit avec la protéine CAL, ce qui mène à la redirection de l'endosome vers le lysosome; soit à nouveau avec la protéine NHERF1, et est alors réintroduit dans le cycle d'exocytose puis ramenée à la membrane apicale. Adapté de Guggino et Stanton²⁹.

1.2.1.2. L'interaction CFTR-CAL/NHERF est spécifique des domaines PDZ

De nombreux processus cellulaires tels que la signalisation, le trafic et l'assemblage des protéines sont régulés par des réseaux entiers d'interaction protéine-protéine¹¹⁸. Ces interactions se font par des domaines spécifiques comme les domaines SH2, SH3, WW, SAM^{118,119} (pour en nommer seulement quelques-uns) qui interagissent entre eux par des interactions hydrophobes et/ou électrostatiques.

Les domaines PDZ constituent une classe particulièrement intéressante de domaines d'interaction. Le nom PDZ est un acronyme issu des trois premières protéines au sein desquelles ces domaines ont été identifiés : *postsynaptic density protein-95* (PSD-95), *discs large tumor suppressor* (DLG1) et *zonula*

occludens-1 (ZO-1)¹²⁰. Les domaines PDZ sont usuellement composés d'environ 90 résidus et ont une structure globulaire formée de six feuillets β (β A- β F) et une à deux hélices α (α A- α B)^{121,122}. Les différents domaines PDZ sont de structures très similaires et interagissent majoritairement avec les extrémités C-terminales de leurs ligands^{123,124}, mais d'autres modes d'interactions ont été identifiés tels que la reconnaissance de motifs internes des peptides, l'oligomérisation de domaines PDZ ou la reconnaissance de certains lipides¹²⁵. Toutes ces interactions sont relativement faibles (1-500 μ M)¹²⁶ et donc réversibles. Lorsque le domaine PDZ interagit avec l'extrémité C-terminale de son ligand, ce dernier s'insère dans une cavité hydrophobe à motif extrêmement conservé (R/K-XXX-G ϕ G ϕ , où X est un résidu quelconque et ϕ un résidu hydrophobe) située entre le feuillet β B et l'hélice α B : elle forme un septième feuillet β antiparallèle, stabilisant l'ensemble de la structure¹²⁵⁻¹²⁷ (**Figure 1.9**).

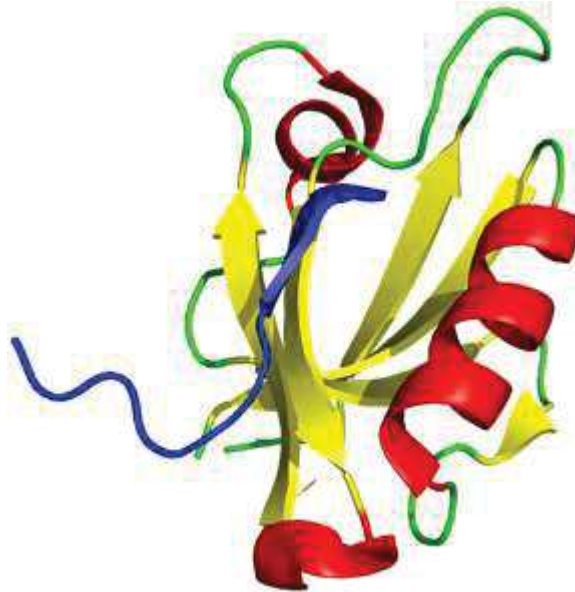


Figure 1.9. Interaction du domaine PDZ de la protéine CAL avec son ligand peptidique iCAL36.

Le domaine PDZ de CAL est constitué de six feuillets β (en jaune) et de trois hélices α (en rouge). Son ligand peptidique iCAL36 (en bleu) s'intègre de façon antiparallèle dans la structure β , générant des interactions stabilisatrices. Code PDB : 4E34.

Les domaines PDZ étaient initialement classés selon le motif C-terminal de leurs ligands. La nomenclature de ces résidus est précise : l'acide aminé C-terminal correspond à la position 0 (P^0), puis les positions successives sont appelées P^{-1} , P^{-2} ... jusqu'à P^{-n} pour l'extrémité N-terminale. L'ancienne classification des domaines PDZ faisait apparaître trois catégories : X[T/S]X ϕ -COOH (classe I), X ϕ X ϕ -COOH (classe II), et X[D/E]X ϕ -COOH (classe III). Toutefois ce critère ne suffit pas à prédire les interactions entre domaines PDZ¹²⁸, car chacun des 4 à 6 résidus C-terminaux du ligand a une importance cruciale pour la sélectivité de l'interaction : un unique remplacement d'acide aminé peut totalement abolir une PPI ou au contraire en faire apparaître de nouvelles¹²⁹. Une nouvelle nomenclature distingue 25 classes de domaines PDZ définies par leurs résidus aux positions critiques α B:1 et β B:5¹³⁰ ; une classification selon leur organisation modulaire existe également¹²⁵. Alternativement, des approches bioinformatiques ont été développées pour prévoir leur interactome^{128,131}. Enfin, de récents travaux publiés par Vincentelli *et al* reportent l'usage d'une méthode de criblage chromatographique permettant la quantification des interactions PDZ-ligand à haut débit¹³².

1.2.1.3. Rationnel de l'inhibition de l'interaction CFTR/CAL

Au vu de l'interactome protéique de CFTR, la protéine CAL semble être une cible intéressante. Alors que sa surexpression diminue drastiquement la demi-vie de CFTR à la membrane²⁸, l'inhibition de son interaction avec CFTR augmente l'efflux de chlorure mesuré sur des cellules de patients⁴⁸. Au contraire des protéines TC10, SYN6 ou MARCH2 qui sont ubiquitaires^{133,134}, CAL ne semble pas avoir d'implication dans d'autres processus que la dégradation lysosomale de la protéine CFTR. De plus, les souris CAL-déficientes sont viables¹³⁵, indiquant que l'inhibition de l'interaction CFTR-CAL serait tolérable. Enfin, l'interaction entre le domaine PDZ de CAL (CALP) et le peptide correspondant aux 10 acides aminés C-terminaux de la protéine CFTR est faible ($690 \pm 120 \mu\text{M}$)¹³⁶, laissant une large fenêtre d'action pour des inhibiteurs de l'interaction CFTR/CAL qui auraient ainsi une action de « stabilisateur » de CFTR.

Cependant, CFTR interagit aussi avec NHERF1, NHERF2 et PDZK1 (aussi appelée NHERF3)¹³⁷. Ces trois protéines participent à la stabilisation et à l'ancrage de la protéine CFTR à la membrane apicale²⁹ et à l'inhibition de l'absorption de sodium par le canal NHE3 (*Sodium-hydrogen antiporter 3*)¹³⁸, entre autres rôles. Si l'on souhaite développer des inhibiteurs de l'interaction CFTR/CAL, il faudra donc s'assurer de ne pas affecter l'interaction de la protéine CFTR avec les NHERF.

Les protéines CAL et NHERF interagissent avec CFTR *via* leur(s) domaine(s) PDZ. CAL en dispose d'un (CALP), NHERF1 et NHERF2 en ont chacune deux (N1P1/N1P2 pour NHERF1, N2P1/N2P2 pour NHERF2). Leur séquence primaire est comparée dans le **Tableau 1.1**.

On remarque rapidement que les séquences des domaines PDZ de NHERF1 et NHERF2 sont très similaires (64%). Cette similarité est moins prononcée avec la protéine CALP (33%) : néanmoins les structures tridimensionnelles de la protéine CALP et des domaines PDZ de NHERF1 et NHERF2 sont fortement superposables (**Figure 1.10**) surtout au niveau de leur site d'interaction avec leur ligand, soulignant la difficulté potentielle de développer un inhibiteur sélectif de la protéine CALP. Pour accomplir cette tâche, des méthodes permettant de cribler les interactions protéine-protéine et peptide-protéine seront nécessaires : les méthodes utilisables seront présentées dans la partie 2.2. Le développement d'un inhibiteur peptidique sélectif de la protéine CALP sera détaillé dans la partie 2.3.

Tableau 1.1. Comparaison des séquences des domaines PDZ de CAL, NHERF1 et NHERF2.

N1P1	1	-	L	C	C	L	E	K	G	P	N	G	Y	G	F	H	L	H	G	E	K	G	K	-	L	Q	Y	I	R	L	V	E	P	G	S	P	A	E	K	A	-	G	L	L	A	G	D	R	45	
N1P2	1	-	L	C	T	M	K	K	G	P	S	G	Y	G	F	N	L	H	S	D	K	S	K	-	P	Q	Q	F	I	R	S	V	D	P	D	S	P	A	E	A	S	-	G	L	R	A	Q	D	R	45
N2P1	1	-	L	C	R	L	V	R	G	E	Q	G	Y	G	F	H	L	H	G	E	K	G	R	-	R	Q	Q	F	I	R	R	V	E	P	G	S	P	A	E	A	A	-	A	L	R	A	G	D	R	45
N2P2	1	R	L	C	H	L	R	K	G	P	Q	G	Y	G	F	N	L	H	S	D	K	S	R	-	P	Q	Q	Y	I	R	S	V	D	P	G	S	P	A	A	R	S	-	G	L	R	A	Q	D	R	46
CALP	1	K	V	L	L	L	K	E	D	H	E	G	L	G	I	S	I	T	G	G	K	E	H	G	V	P	I	L	I	S	E	I	H	P	G	Q	P	A	D	R	C	G	G	L	H	V	G	D	A	48
N1P1	46	L	V	E	V	N	G	E	N	V	E	K	E	T	H	Q	Q	V	V	S	R	I	R	A	A	L	N	A	V	R	L	L	V	V	D	P	E	81												
N1P2	46	I	V	E	V	N	G	V	C	M	E	G	K	Q	H	G	D	V	V	S	A	I	R	A	G	G	D	E	T	K	L	L	V	V	D	R	E	81												
N2P1	46	L	V	E	V	N	G	V	N	V	E	G	E	T	H	H	Q	V	V	Q	R	I	K	A	V	E	G	Q	T	R	L	L	V	V	D	Q	-	80												
N2P2	47	L	I	E	V	N	G	Q	N	V	E	G	L	R	H	A	E	V	V	A	S	I	K	A	R	E	D	E	A	R	L	L	V	V	D	P	-	81												
CALP	49	I	L	A	V	N	G	V	N	L	R	D	T	K	H	K	E	A	V	T	I	L	S	Q	Q	R	G	E	I	E	F	E	V	V	Y	V	-	83												

Entre les domaines N1P1, N1P2, N2P1 et N2P2, on dénombre 38 positions identiques (vert foncé) et 14 positions totalement similaires (vert clair). CALP partage avec les domaines PDZ des NHERF 16 identités (vert foncé) et 12 similitudes (vert clair) ; 24 résidus de CALP ne concordent pas avec une identité ou une similarité totale présente chez les NHERF (rouge). Alignement réalisé avec ClustalOmega.

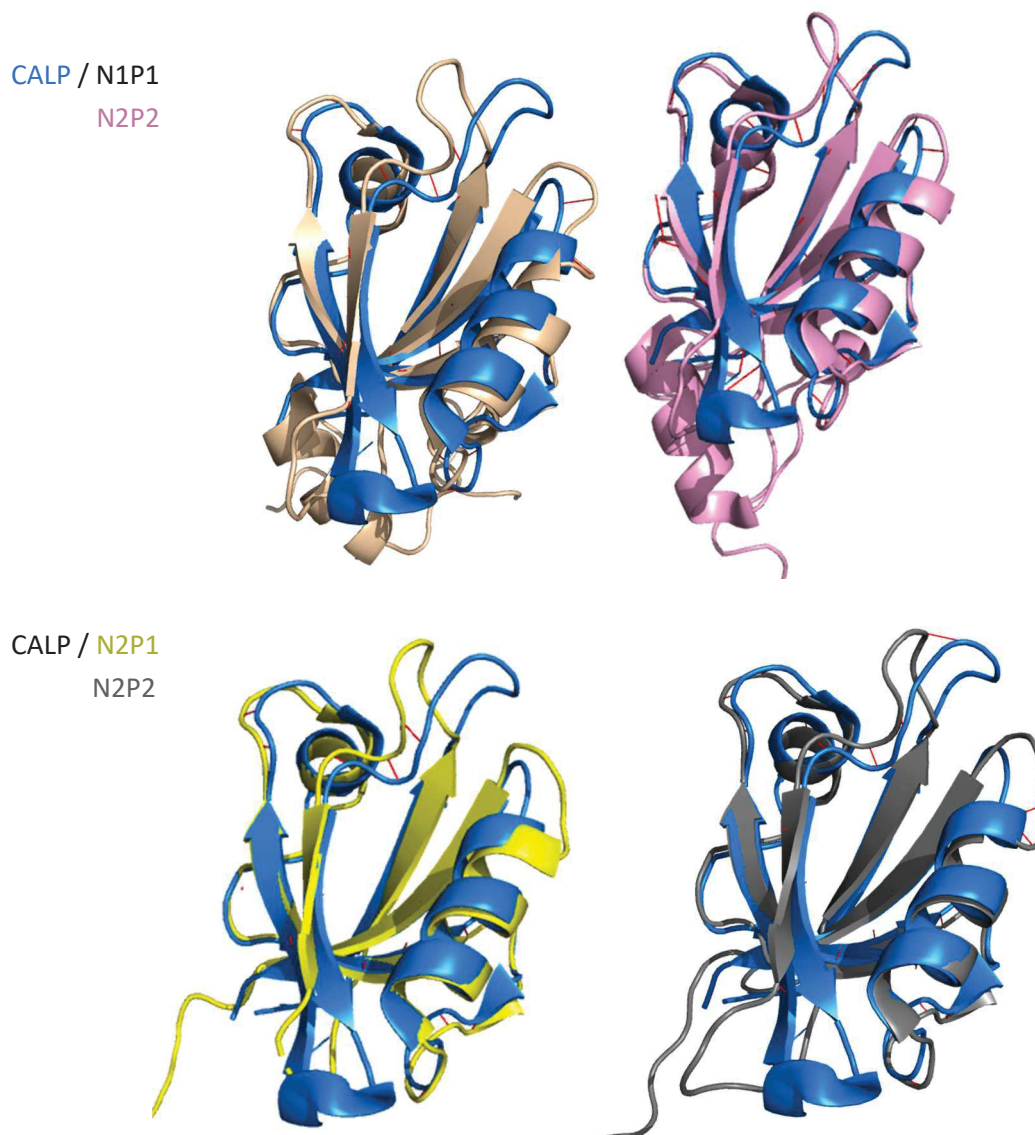


Figure 1.10. Alignement de la structure de CALP avec celles de N1P1, N1P2, N2P1 ou N2P2.

Les liaisons rouges facilitent la visualisation des divergences entre les deux structures. Alignement réalisé avec PyMOL (CALP : 4E34, bleu ; N1P1 : 2MOT, beige ; N1P2 : 2KJD, rose ; N2P1 : 2OCS, jaune ; N2P2 : 2HE4, gris).

1.2.2. Méthodes de criblage applicables à l'analyse des PPI

1.2.2.1. Criblage des PPI par des banques génétiques

1.2.2.1.1. Méthode du phage display

Le *phage display* est une technique popularisée par Smith en 1985, documentant l'insertion d'une séquence d'ADN dans des bactériophages et leur utilisation pour cribler les interactions protéine-protéine, protéine-peptide et protéine-ADN¹³⁹ (**Figure 1.11**).

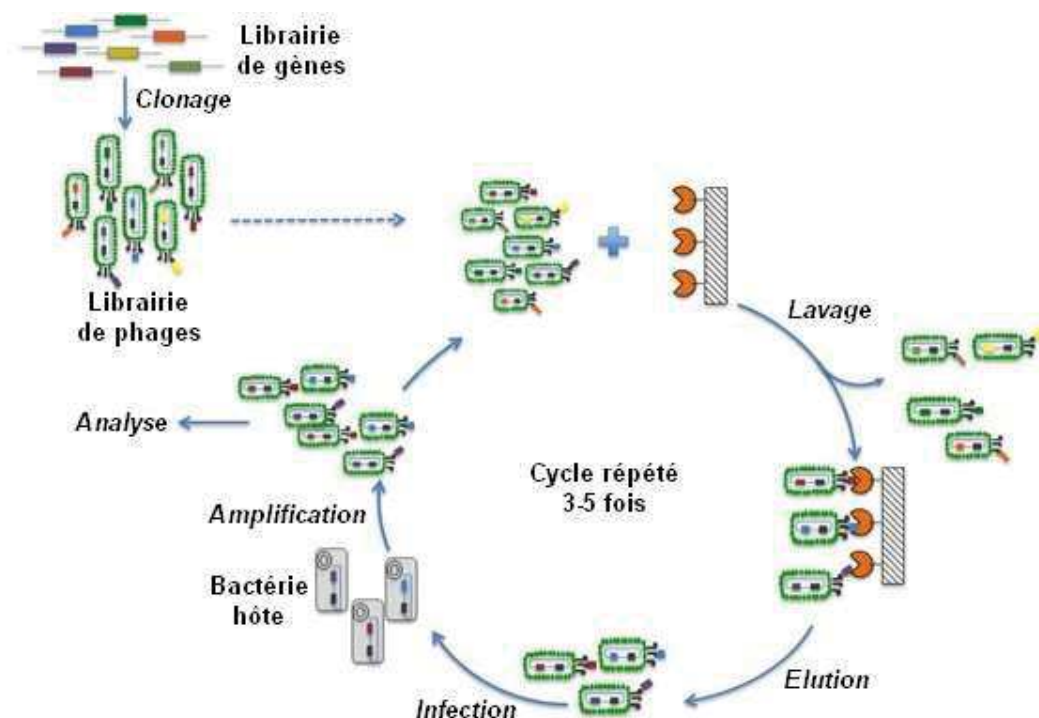


Figure 1.11. Criblage de PPI par la méthode du phage display.

Une librairie de gènes d'intérêt est clonée et intégrée à des phages, qui sont ensuite mis en interaction avec un récepteur. Les phages interagissant avec ces récepteurs restent fixés et ne sont pas éliminés lors du lavage : ces phages sont élués pour être séparés de leur récepteur, puis amplifiés. La répétition de plusieurs occurrences de ce cycle renforce le critère de sélection, permet d'éliminer les séquences faiblement affines ou interagissent non-spécifiquement avec le récepteur et de ne conserver que les séquences les plus affines. (adapté de <http://www.creative-biolabs.com/blog/index.php/fundamental-technologies-for-antibody-production-phage-display/>)

Un bactériophage (communément raccourci en « phage ») est un virus spécifique aux bactéries, un ensemble de gènes enveloppé par une capsid protéique. Des séquences d'ADN peuvent être clonées et intégrées à cette capsid pour créer une librairie de phages présentant le fragment protéique correspondant à cet ADN. Ces phages sont alors mis en interaction avec des protéines, peptides ou cellules fixés sur un support. Après lavage, seuls restent fixés les phages interagissant avec leur cible. Ces phages sont élués puis amplifiés par infection de bactéries hôtes. Plusieurs cycles d'interaction/sélection/amplification sont menés pour sélectionner les séquences les plus affines pour leur cible, qui sont ensuite séquencées.

La librairie de gènes peut être constituée de façon aléatoire, à partir de séquences connues ou en isolant l'ADN issu de lysats cellulaires¹⁴⁰. Il existe également des librairies commerciales de phages. Le phage display est depuis largement utilisé pour l'identification d'épitopes et le développement de peptides, de vaccins ou d'inhibiteurs de protéase^{141,142}, et permet l'identification *de novo* de molécules thérapeutiques ou l'optimisation d'une séquence polypeptidique par mutagenèse.

Le phage display a été largement utilisé pour l'étude des interactions des domaines PDZ avec l'extrémité C-terminale de leurs ligands¹⁴³. Des procédures permettant d'étudier la co-évolution de domaines PDZ avec leurs ligands ont même été développées¹⁴⁴. Il convient cependant d'être prudent lors de l'analyse des données, en particulier lorsque des séquences très hydrophobes sont identifiées : en effet le phage display peut favoriser ces interactions non-spécifiques, au détriment des interactions spécifiques entre un domaine PDZ et son ligand naturel¹⁴⁵.

1.2.2.1.2. Méthode du double hybride (Y2H)

La méthode du double hybride (*yeast-2-hybrid*) a été développée par Fields en 1989¹⁴⁶. Elle emploie un facteur de transcription (le plus souvent : Gal4), dont un des domaines peut se fixer à une séquence activatrice et l'autre activer la transcription d'un gène rapporteur (le plus souvent : lacZ ou la β -galactosidase). Les deux domaines de Gal4 sont séparés et chacun fusionnés, par génie génétique, au gène de l'une des protéines d'intérêt. On obtient alors deux plasmides qui sont simultanément exprimés dans des levures (le plus souvent : *S. cerevisiae*). Si les deux protéines d'intérêt interagissent, la connexion entre les deux domaines de Gal4 se fait et le gène rapporteur est exprimé. Une coloration par le galactoside modifié X-gal permet de révéler les colonies de levure où la β -galactosidase est exprimée. Les séquences permettant une interaction sont ensuite amplifiées par réaction en chaîne par polymérase (PCR) sur colonie puis séquencées. Un schéma explicatif est présenté en **Figure 1.12**.

Cette technique ne requiert pas de matériel spécifique et peut être automatisée pour en faire une méthode de criblage à haut débit. Elle est également applicable à l'étude d'interactions peptide-protéine¹⁴⁷ et peptide-PDZ¹⁴⁸. En particulier, le groupe du Prof. Jean-Paul Borg a extensivement étudié les interactions entre domaines PDZ dans *C. elegans* par cette méthode¹⁴⁹, et a récemment mis au point une librairie représentative du « PDZome » humain¹⁵⁰ compatible avec la méthode du double hybride.

La méthode souffre toutefois de faux positifs et faux négatifs fréquents, dus à la liaison avec les domaines de Gal4 qui affecte la conformation des protéines d'intérêt, à l'absence de certaines modifications post-traductionnelles chez les levures hôtes ou encore à des PPI faibles ou non-spécifiques¹⁵¹. Comme pour toutes les méthodes de criblage, de nombreux contrôles sont donc nécessaires pour assurer la pertinence des résultats, qu'il est ensuite souhaitable de confirmer par d'autres méthodes¹⁵².

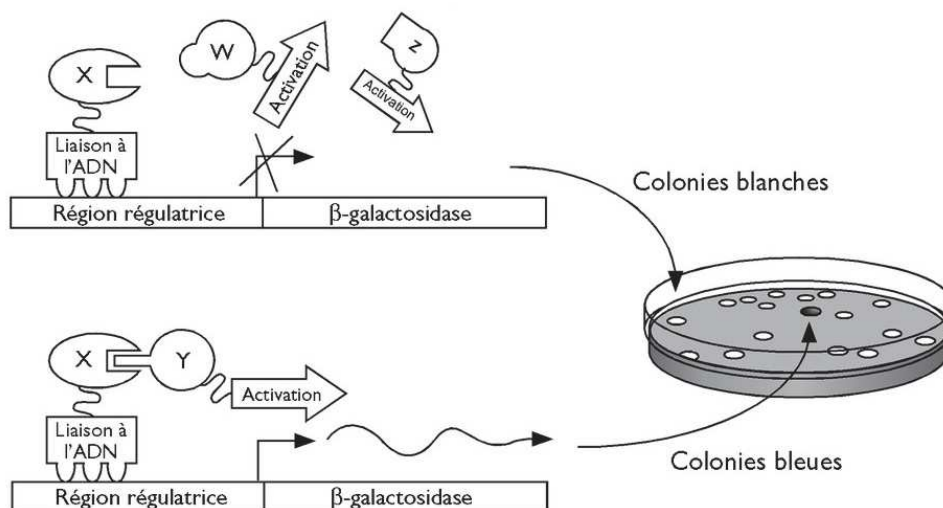


Figure 1.12. Criblage de PPI par la méthode du double hybride.

Deux plasmides sont conjointement exprimés dans des levures. Dans cet exemple, le premier code la région de la protéine Gal4 qui se lie à l'ADN, liée à une protéine d'intérêt (X). Le second code la région de Gal4 permettant l'activation de la β -galactosidase, liée à une seconde protéine d'intérêt (W, Y ou Z). Si l'interaction a lieu (interaction X/Y), les deux domaines de Gal4 sont reliés et le gène rapporteur est exprimé. (adapté de <http://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55589>)

1.2.2.2. Criblage des PPI par synthèse SPOT

1.2.2.2.1. Principe et mode opératoire de la synthèse SPOT

La synthèse SPOT est une technique robuste de criblage des PPI qui repose sur la synthèse parallèle de milliers de séquences sur une membrane de cellulose, suivie de l'incubation de cette membrane peptidique avec une protéine d'intérêt (**Figure 1.13A**). Elle présente des similarités avec la méthode « *one-bead-one-compound* » qui permet la création d'une banque combinatoire de peptides supportés sur résine¹⁵³ : cependant la synthèse SPOT est plus flexible dans le choix des séquences, et ne requiert pas d'analyses complémentaires pour identifier les séquences efficaces. Initialement présentée par Frank en 1992¹⁵⁴, elle a été significativement optimisée ces dernières années¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Tout d'abord manuelle, la synthèse des peptides peut aujourd'hui être réalisée de façon semi- ou entièrement automatisée : les séquences sont entrées dans un logiciel connecté à un robot, qui dispense alors de manière contrôlée les gouttes d'acides aminés sur la membrane.

La première étape de la synthèse SPOT est la conversion des groupements hydroxyle de la cellulose en motifs amine, qui sont plus réactives pour le couplage des acides aminés : pour cela la membrane est traitée par des molécules bifonctionnelles formant une liaison ester, éther ou amine avec le support. Les supports les plus utilisés sont des membranes β -alanine (liaison ester) ou N-CAPE (pour *N-modified cellulose amino-hydroxypropyl ether*, liaison éther)¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. On couple ensuite sur la membrane des acides aminés orthogonalement protégés suivant la stratégie Fmoc (fluorénylméthoxycarbone) : chaque réaction est confinée dans un spot de quelques millimètres de diamètre, la localisation spatiale des chaînes peptidiques en croissance est donc contrôlée (**Figure 1.13B**). La membrane est ensuite traitée par de la pipéridine qui déprotège le groupement Fmoc, libérant la partie N-terminale de l'acide aminé et permettant par la suite l'addition d'un nouvel acide aminé. Des cycles de couplage peptidique et de déprotection sont ainsi enchaînés pour construire les séquences peptidiques résidu par résidu : des étapes d'acétylation peuvent être introduites pour bloquer les positions n'ayant pas totalement réagi (*capping*) et empêcher l'accumulation de délétions dans les séquences. A l'issue de la synthèse, un traitement avec une solution concentrée d'acide trifluoroacétique permet de cliver les groupes protecteurs des chaînes latérales des peptides.

La membrane peptidique (*peptide array*) peut alors être incubée avec la protéine d'intérêt : les interactions peptide-protéine sont révélées par un système d'anticorps reconnaissant la protéine et portant une enzyme HRP (horseradish peroxidase), ce qui permet la révélation et l'analyse semi-quantitative des PPI par chimiluminescence.

1.2.2.2.2. Applications de la méthode

La synthèse SPOT permet de tester simultanément des milliers de séquences peptidiques différentes. Ces séquences peuvent être sélectionnées de façon aléatoire ou correspondre à un ensemble de séquences préalablement définies. Pour identifier les partenaires d'interaction d'une protéine, on peut par exemple construire une banque de séquences de peptides aléatoires qui permettra d'identifier *de novo* des peptides affins pour une cible protéique donnée.

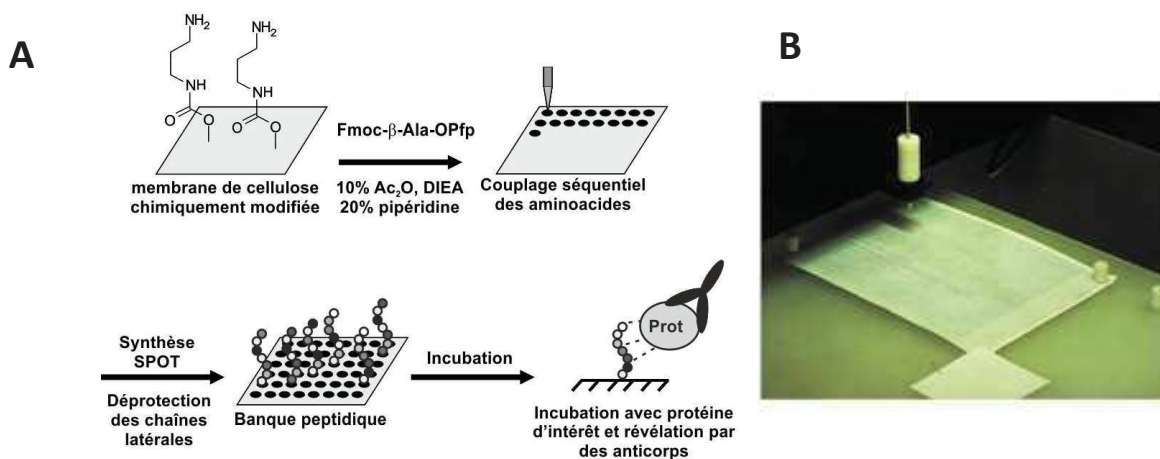


Figure 1.13. Préparation de banques peptidiques par synthèse SPOT.

(A) Schéma résumant les différentes étapes de la synthèse SPOT suivant la stratégie Fmoc. (B) Photo d'un robot « spotteur » semi-automatique (ASP222, Intavis AG) lors d'une phase de couplage¹⁵⁶. La membrane de cellulose a les dimensions d'une plaque multi-puits et comporte 2000 spots. Les spots sont marqués au bleu de bromophénol.

La synthèse SPOT est plus généralement utilisée pour cribler une interaction connue entre deux protéines X et Y, dans le but de mieux comprendre cette interaction et/ou de développer des peptides d'interface. Pour cela, une série de bibliothèques peptidiques peut être synthétisée selon le schéma suivant.

1. La première étape consiste à synthétiser une série de courts peptides chevauchants (environ 10-15 résidus) couvrant la séquence primaire de la protéine X, et à incuber cette banque peptidique avec la protéine Y. A l'aide de ce « PepScan » on peut déduire quelle partie de la protéine X interagit avec Y (**Figure 1.14A**).
2. Une fois cet épitope identifié, il est possible de préparer une membrane d'analogues de ce peptide tronqués N- et C-terminalement, ce qui permet d'identifier le peptide minimal requis pour l'interaction avec la protéine Y.
3. Pour mieux comprendre le rôle de chaque acide aminé de la séquence de l'épitope, une analyse de substitution (ou « SubAna ») peut être effectuée. En pratique, chaque position du peptide est remplacée par les 20 acides aminés : pour un peptide de 10 résidus, on synthétise donc 200 analogues. Cela permet d'identifier les positions-clés de l'interaction des protéines X et Y. La **Figure 1.14B** montre par exemple que l'isoleucine en position P⁰ (acide aminé C-terminal) ne peut être remplacée que par une leucine ou une valine, soulignant l'importance d'avoir un résidu hydrophobe ramifié en cette position.
4. Enfin, pour étudier d'éventuelles synergies entre deux positions d'une séquence peptidique, il est aussi possible de réaliser des analyses mutationnelles combinatoires (« CombLib »). Un exemple est donné avec la séquence P⁻⁵P⁻⁴TSII (**Figure 1.14C**) : pour analyser les positions P⁻⁵ et P⁻⁴ on synthétise 400 analogues, chacun portant un couple (P⁻⁵, P⁻⁴) différent tandis que les autres positions restent constantes. Des mutations à deux positions de la séquence peptidique peuvent potentiellement permettre d'identifier des remplacements qui n'auraient pas été visibles en analyse mono-mutationnelle (SubAna).

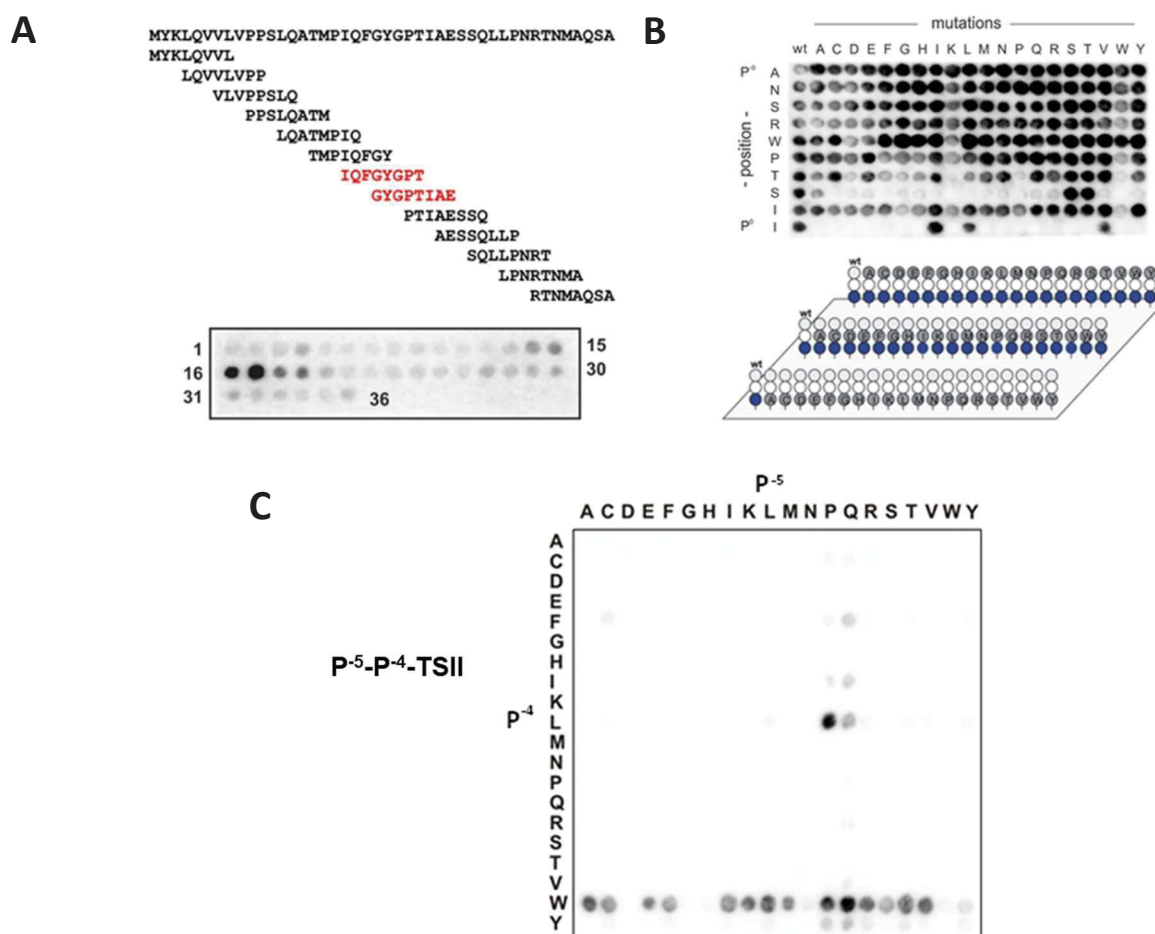


Figure 1.14. Principes du PepScan, de la SubAna et de la CombLib.

(A) *PepScan* : la séquence d'une protéine X est découpée en courts peptides chevauchants qui sont synthétisés sur des spots. Ici, l'épitope de la protéine X correspond au 11-mère IQFGYGPTIAE. (B) *SubAna* : chaque position du peptide ANSRWPTSII est remplacée par chacun des aminoacides naturels existants. (C) *CombLib* : une séquence est synthétisée pour chaque couple d'acides correspondant aux deux positions du peptide P⁵P⁴TSII. Les positions P⁵ et P⁴ sont remplacées par chacun des aminoacides naturels existants tandis que les autres positions restent constantes.

1.2.2.2.3. Construction de banques peptidiques à extrémité C-terminale libre

L'application de la synthèse SPOT au criblage d'interactions entre les domaines PDZ et leurs partenaires d'interaction était initialement freinée par une limitation technique de taille : la synthèse chimique est réalisée en élongation N-terminale, l'extrémité C-terminale du peptide étant fixée à la membrane. Or il est indispensable que le carboxyle terminal du peptide soit disponible pour que l'interaction avec le domaine PDZ ait lieu.

Au cours des vingt dernières années, le groupe du Prof. J. Schneider-Mergener puis notre groupe ont développé et optimisé une stratégie pour synthétiser des peptides avec une extrémité C-terminale accessible, tout en conservant leur connexion avec le support. Les premiers essais impliquaient la cyclisation d'un acide glutamique C-terminal et d'une β -alanine N-terminale, puis un clivage basique permettant la libération du carboxyle de la chaîne peptidique¹⁶¹. Dans sa dernière version (**Figure 1.15**), cette méthode implique l'incorporation d'un motif acido-labile (acide *p*-[hydroxyméthyl] phénoxyacétique, HMPA) et d'une cystéine en position C-terminale du peptide, qui forme une liaison avec un motif bromoacétique (BrAc)

couplé en position N-terminale du peptide. La liaison peptide-linker est ensuite rompue lors du traitement par le TFA, libérant alors l'extrémité C-terminale du peptide¹⁶².

Cette procédure ne nécessite pas d'équipement supplémentaire et peut être réalisée avec des réactifs simples, à l'exception du 2,4-dinitrophénolate de bromoacétyle qui n'est pas commercialisé. Elle ne provoque pas d'oxydation des cystéines et est compatible avec l'usage d'acides aminés phosphorylés, ce qui la rend aussi pertinente pour étudier des modifications post-traductionnelles¹⁶³.

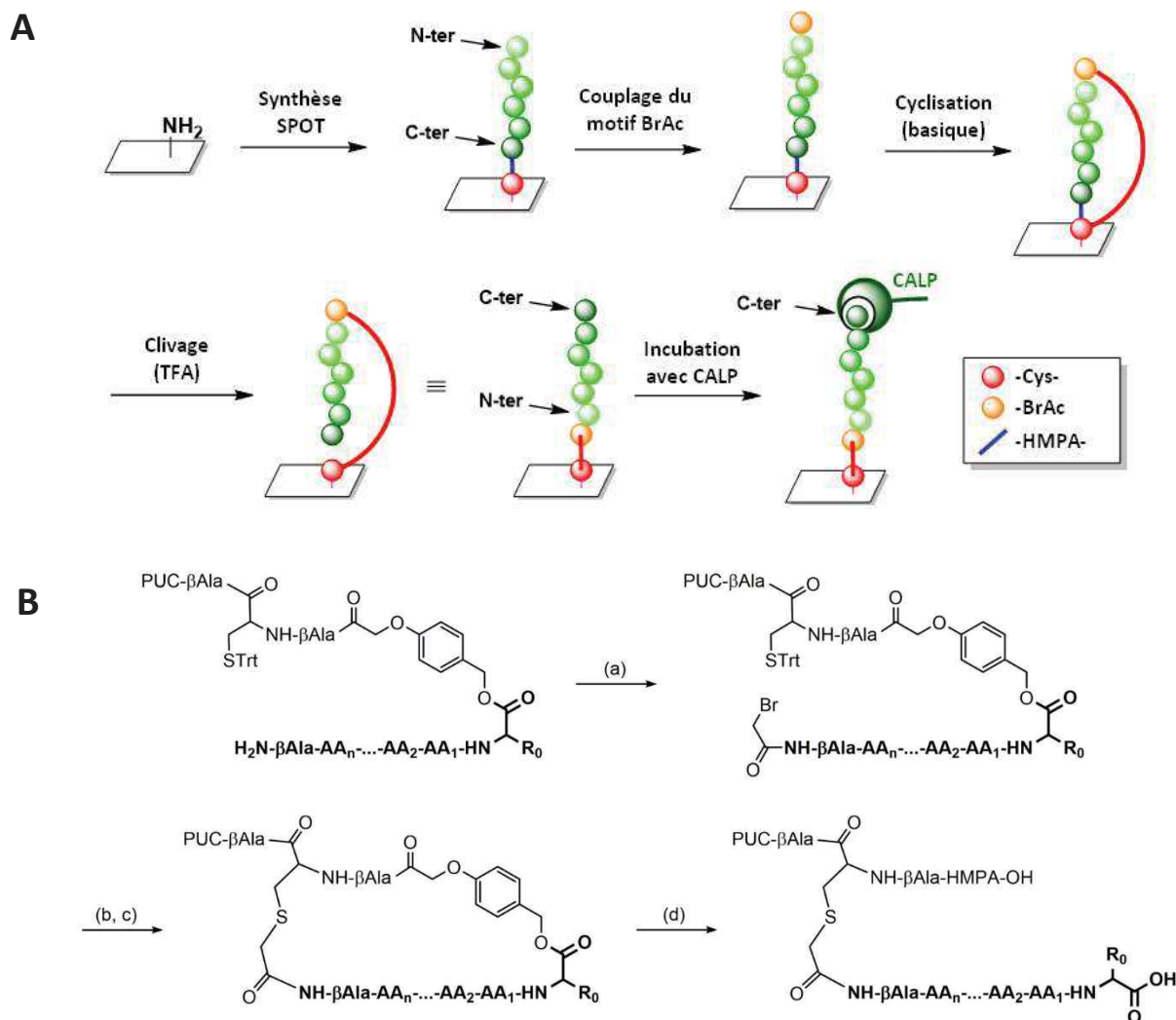


Figure 1.15. Processus du peptide inversé.

(A) Schéma explicatif du processus du peptide inversé. BrAc : motif bromoacétyle. TFA : acide trifluoroacétique. HMPA : acide p-(hydroxyméthyl)phénoxyacétique. (B) Etapes-clés du processus. (a) Couplage du motif bromoacétique. (b, c) Déprotection sélective de la cystéine tritylée (Trt) par action d'une solution diluée d'acide trifluoroacétique, puis formation du macrocycle en conditions basiques. (d) Clivage simultané du linker HMPA (acide p-[hydroxyméthyl]phénoxyacétique) et des protections des chaînes latérales.

1.2.3. Les peptides inhibiteurs de CAL

1.2.3.1. Historique du développement du peptide iCAL36

L'interaction entre le domaine PDZ de la protéine CAL (CALP) et la région C-terminale du canal CFTR (VQDTRL_{COOH}) est faible ($\approx 700 \mu\text{M}$)¹³⁶. Ce peptide ne constituait donc pas un point de départ satisfaisant pour développer un inhibiteur de CALP. Il était donc nécessaire d'identifier *de novo* de nouvelles séquences.

Dans un premier temps, une banque peptidique correspondant aux 10 acides aminés C-terminaux de 6 223 protéines humaines différentes (6223-HumLib) a été préparée par synthèse SPOT puis incubée avec la protéine recombinante correspondant à CALP. L'interaction la plus forte fut observée entre la protéine CALP et l'extrémité C-terminale du récepteur SSR5 (*somatostatin receptor type 5*), une protéine dont l'interaction avec la protéine CAL était déjà montrée chez la souris¹⁶⁴. Sa constante d'inhibition étant bien plus forte ($\approx 20 \mu\text{M}$)¹³⁶ que celle du peptide dérivé du canal CFTR, le peptide décimère SSR5₁₀ a été retenu comme candidat potentiel pour le développement d'inhibiteurs du complexe CFTR/CALP.

L'inconvénient de SSR5₁₀ est sa non-sélectivité par rapport aux PDZ de NHERF1 et NHERF2 (**Tableau 1.2**) : en effet SSR5₁₀ a une affinité similaire avec les 5 domaines PDZ d'intérêt¹⁶⁵. La sélectivité du peptide a donc été optimisée par une stratégie combinant différentes bibliothèques peptidiques générées par synthèse SPOT et des mesures de polarisation de fluorescence afin de définir les positions-clés de l'interaction du peptide avec la protéine CALP¹⁶⁶. Le remplacement des positions P⁰ et P⁻¹ par deux isoleucines (iCAL06₆, MQTSII_{COOH}) a multiplié la sélectivité par 20 sans perdre l'affinité pour CALP. Des modifications en P⁻⁵ et P⁻⁴ (iCAL36₆, WPTSII_{COOH}) ont ensuite permis d'abolir l'interaction du peptide avec les protéines NHERF, mais en réduisant l'affinité pour celle de CALP.

Tableau 1.2. Constantes d'inhibition (K_i) des différents candidats iCAL.

Peptide	Séquence	CALP	N1P1	N1P2	N2P1	N2P2	Sélectivité
CFTR ₁₀	TEEEVQDTRL	390 ± 20	0,45 ± 0,02	1,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,10 ± 0,02	0,00026
SSR5 ₁₀	ANGLMQTSKL	21,4 ± 1,7	24,5 ± 1,9	130 ± 48	38,6 ± 7,7	19,8 ± 2,7	0,93
SSR5 ₆	MQTSKL	25,3 ± 3,4	19,3 ± 5,6	50,2 ± 9,1	31,7 ± 8,9	10,0 ± 0,6	0,40
iCAL05 ₆	MQTSKI	40,8 ± 10,3	914 ± 186	1700 ± 1300	806 ± 84	109 ± 10	2,7
iCAL06 ₆	MQTSII	16,9 ± 1,6	245 ± 71	2400 ± 1400	245 ± 26	166 ± 104	9,8
iCAL35 ₆	WQTSII	16,3 ± 2,1	430 ± 109	> 5 000	496 ± 151	246 ± 186	15
iCAL36 ₆	WPTSII	32,8 ± 0,3	> 5 000	> 5 000	> 5 000	> 5 000	150
iCAL36 ₈	SRWPTSII	20,3 ± 2,6	> 5 000	> 5 000	516 ± 183	433 ± 154	21
iCAL36 ₁₀	ANSRWPTSII	17,3 ± 4,3	> 5 000	> 5 000	> 5 000	> 3 000	170

Les valeurs de K_i ± SD sont indiquées en micromole par litre (μM).

Index de sélectivité : $\min(K_i^{N1P1}, K_i^{N1P2}, K_i^{N2P1}, K_i^{N2P2}) / K_i^{CALP}$. Tableau extrait de ¹⁶⁵.

Afin d'introduire plus de spécificité pour la protéine CALP, le peptide a été allongé de 4 résidus N-terminaux. Le décimère résultant, iCAL36₁₀ (ANSRWPTSII_{COOH}), présente une affinité de (17,3 ± 4,3) μM pour CALP et n'a aucune interaction quantifiable avec les domaines PDZ des protéines NHERF. Le complexe CALP/iCAL36₁₀ a été modélisé (**Figure 1.16**) puis par la suite co-cristallisé, confirmant la géométrie de l'interaction^{167,168}.

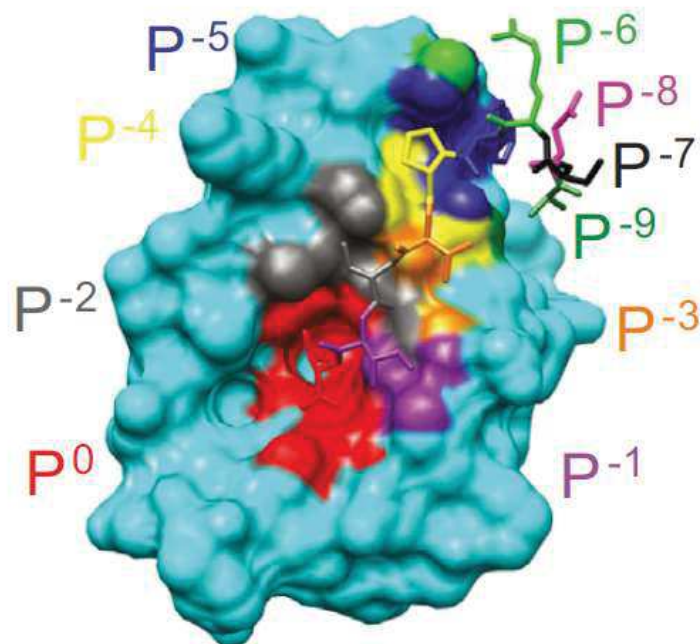


Figure 1.16. Modélisation du complexe CALP/iCAL36₁₀.

Les résidus P⁰ à P⁻⁵ d'iCAL36₁₀ sont profondément insérés dans la poche hydrophobe de la protéine, alors que les résidus P⁻⁶ à P⁻⁹ sont plutôt en surface. Cela est cohérent avec l'absence de sélectivité pour ces positions : il est supposé que l'interaction entre CALP et ces résidus est portée par la chaîne peptidique principale et non par les groupes latéraux¹⁶⁵. Adapté de Amacher et al¹⁶⁸. Code PDB : 4E34.

La sélectivité du peptide iCAL36₁₀ (appelé par la suite « iCAL36 ») pour la protéine CALP a ensuite été confirmée par immunoprécipitation sur des lysats cellulaires, révélant une interaction significative avec la protéine CAL endogène mais aucune liaison avec les protéines NHERF⁴⁸. Enfin, l'efflux de chlorure induit par l'activité du peptide marqué à la fluorescéine (F*-iCAL36) a été mesuré sur des cellules bronchiques de patients porteurs de la mutation p.Phe508del (CFBE-ΔF), et un effet significatif a pu être observé comparativement à une séquence contrôle inactive (séquence brouillée F*-SPTINSAIWR_{COOH}). Un effet additif a également pu être observé lorsque les cellules étaient traitées avec F*-iCAL36 et corr-4a, indiquant la possibilité d'associer iCAL36 à d'autres modulateurs du canal CFTR⁴⁸.

Pour étudier la sélectivité absolue d'iCAL36, l'équipe du Prof. D.R. Madden a isolé les protéines qui pouvaient interagir avec iCAL36 puis les a caractérisées par spectrométrie de masse (données non-publiées). Une unique protéine fut isolée en plus de la protéine CAL : TIP-1 (*Tax-interacting protein-1*). Cette protéine est constituée d'un domaine PDZ et est impliquée dans des processus de signalisation¹⁶⁹, dans des pathologies telles que le gliome¹⁷⁰, mais aussi et surtout dans la régulation de l'expression des protéines membranaires^{171,172}. Dans un second temps, ce même groupe a pu déterminer que l'interaction TIP-1/iCAL36 est de l'ordre du micromolaire et que les protéines CALP et TIP-1 ont un mode de liaison au peptide iCAL36 très similaire¹⁷³. Bien qu'il soit déjà encourageant d'avoir développé un peptide inhibiteur n'ayant que deux cibles parmi toutes les protéines présentes dans les cellules CFBE-ΔF, l'interaction TIP-1/iCAL36 peut être nuisible et il serait donc préférable de l'abolir. Dans cette optique, le groupe du Prof. D.R. Madden a également mis en évidence le rôle prépondérant du résidu tryptophane en P⁻⁵ dans cette interaction : son remplacement par une leucine (ANSRLPTSII : iCAL42) abolit l'interaction avec TIP-1 et mène à un peptide totalement sélectif de CALP, bien que son affinité soit plus faible (17 μM → 53 μM).

1.2.3.2. Comment optimiser la séquence peptidique d'iCAL36 en vue d'une application thérapeutique ?

Les aminoacides codés génétiquement sont de configuration L. Leurs énantiomères de configuration D (AAD) ne sont pas générés par le corps humain et ne sont pas reconnus par les protéases et peptidases humaines. Inclure des AAD dans des peptides iCAL permettrait ainsi d'augmenter leur stabilité métabolique, mais aussi d'obtenir plus de diversité moléculaire et d'identifier des remplacements menant à une affinité/sélectivité accrue pour la protéine CALP. Des analyses de substitution ont été réalisées par notre groupe en incluant des AAD dans la structure d'iCAL35₁₀ (ANSRWQTSII), mais aucun remplacement n'a été toléré pour les positions P⁰ à P⁵ (**Figure 1.17**, résultats non publiés).

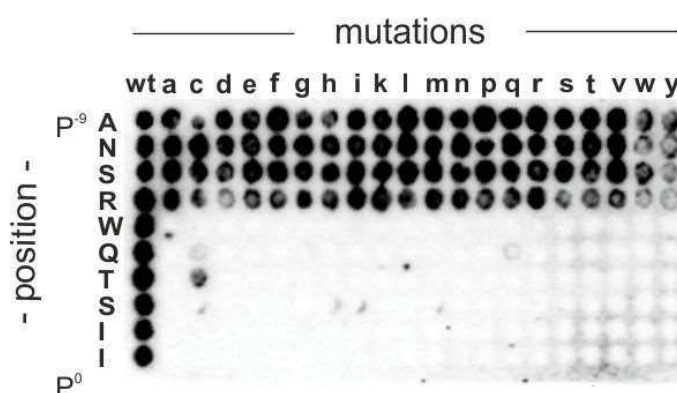


Figure 1.17. SubAna d'iCAL35₁₀ avec des aminoacides de configuration D (données non publiées).

Aucun des résidus P⁰ à P⁵ d'iCAL35₁₀ ne peut être remplacé par des AAD sans perdre l'affinité pour CALP. Par contre, le remplacement des positions P⁶ à P⁹ par n'importe quel AAD est possible et est cohérent avec le fait que n'importe quel acide aminé naturel de configuration L peut y être introduit. Cela confirme que les positions P⁶ à P⁹ sont dénuées de spécificité.

Pour les positions P⁶ à P⁹ toutefois, le remplacement par un AAD quelconque est toléré et pourrait permettre d'accroître la résistance du peptide en extrémité N-terminale : en particulier, une mutation en position P⁶ rendrait le peptide résistant à la trypsine, qui est spécifique des liaisons en position C-terminale de résidus chargés positivement tels que l'arginine¹⁷⁴. Le fait que les résidus P⁶ à P⁹ puissent être remplacés par n'importe quel AAD souligne une nouvelle fois la non-spécificité de ces positions pour l'interaction avec CALP.

Alternativement, des aminoacides non-naturels (AANN), N-méthylés, β -branchés (exemple : β -alanine) ou linéaires (exemple : acide 6-aminocaproïque) peuvent également être intégrés, donnant alors naissance à des peptidomimétiques. Dans ce contexte, le groupe du Prof. D.R. Madden a notamment développé des analogues d'iCAL36 incluant des lysines ϵ -acylées (acétyl-lysine, 4-bromobenzoyl-lysine, etc.)¹⁷⁵, certains présentant une affinité pour CALP doublée par rapport à la séquence native. Ces résultats encourageants montrent que la modulation de la séquence d'iCAL36 pourrait aboutir à des peptides « stabilisateurs » du canal CFTR plus affins et sélectifs de CALP (voir chapitre 6).

1.3. Vectorisation de peptides inhibiteurs

Comme toute molécule thérapeutique, les peptides inhibiteurs doivent pénétrer les cellules pour atteindre leur cible. Comme les peptides sont de par leur taille incapable de passer les barrières membranaires de la cellule, il est nécessaire de les vectoriser. Ce chapitre est dédié aux différentes méthodes de vectorisation applicables aux peptides : une attention particulière sera donnée aux peptides vecteurs (*cell-penetrating peptides*).

1.3.1. Méthodes de vectorisation applicables aux peptides

Les membranes cellulaires sont un ensemble dynamique de lipides, de protéines et de sucres (modèle de la mosaïque fluide¹⁷⁶). Il s'agit de barrières fluides qui protègent les cellules des pathogènes, petites molécules, matériels génétiques et protéines de façon non-spécifique. Elles sont également requises pour la maintenance de l'homéostasie cellulaire. Délivrer des molécules à l'intérieur des cellules est donc complexe : il existe pour cela différentes méthodes de vectorisation (**Figure 1.18**).

On distingue tout d'abord les méthodes physiques, qui comprennent l'injection de molécules thérapeutiques et la perméabilisation temporaire des membranes. Ces méthodes sont toutefois invasives et peuvent être fortement cytotoxiques. L'usage de vecteurs biologiques est une alternative moins toxique : leur usage pose toutefois des questions éthiques et rencontre des limitations au niveau immunitaire. Les vecteurs synthétiques n'ont pas ces limitations et sont de classes variées : on distingue les vecteurs lipidiques, polymériques, inorganiques et peptidiques.

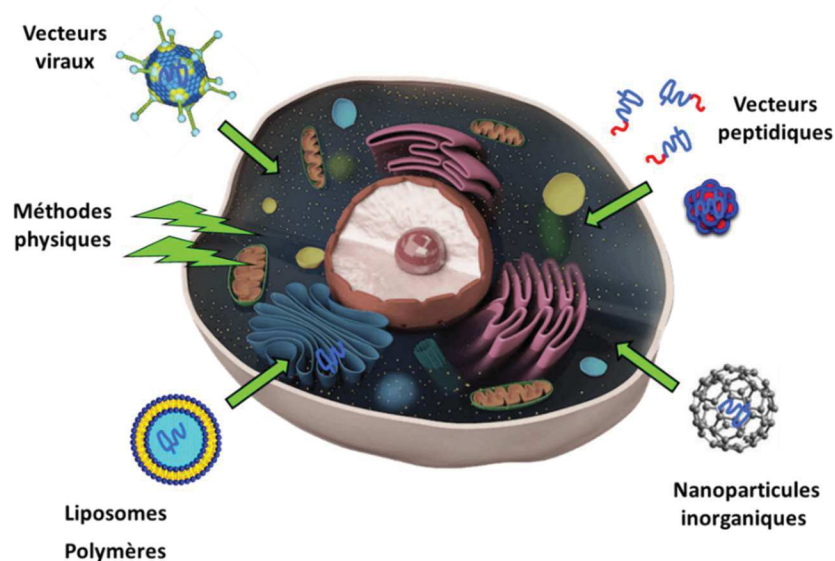


Figure 1.18. Méthodes envisageables pour la vectorisation de molécules thérapeutiques.

On distingue des méthodes physiques (injection, électroporation...), les vecteurs biologiques (tels les virus) et les vecteurs synthétiques qui regroupent les liposomes, les polymères, les nanoparticules inorganiques et les vecteurs peptidiques.

1.3.1.1. Méthodes d'injection et de perméabilisation temporaire

La transfection de peptides thérapeutiques peut être réalisée de façon mécanique, comme dans le cas des méthodes d'injection¹⁷⁷ : on distingue entre autres la micro-injection, la *jet injection* ou l'injection hydrodynamique, qui emploient respectivement des micropipettes en verre, un jet liquide à haute pression ou un grand volume de solution isotonique comme moyen de vectorisation. La membrane plasmique peut également être transitoirement perméabilisée par des impulsions électriques à haut voltage (électroporation)¹⁷⁸, par des microbulles excitées par ultrasons (sonoporation)^{179,180} ou par des pulses laser femtoseconde (transfection optique)¹⁸¹.

1.3.1.2. Vecteurs biologiques

Les adénovirus, les rétrovirus ou encore le virus de l'herpès¹⁸² peuvent être utilisés pour délivrer dans la cellule des gènes qui pourront ensuite être transcrits et traduits en protéines ou en peptides. Ils sont actuellement considérés pour la vectorisation de plasmide dans le cadre de la thérapie de patients CF¹⁸³. Les difficultés majeures liées à l'usage des vecteurs viraux sont leur potentiel toxique ainsi que les réactions immunitaires et carcinogènes qu'ils peuvent induire. Le point clé de leur ingénierie consiste donc à les rendre non-nocifs et silencieux vis-à-vis du système immunitaire du patient. Ces vecteurs viraux ne permettent que l'expression de peptides en isoforme L, ce qui exclut les peptides contenant des aminoacides D ou non-naturels.

1.3.1.3. Vecteurs lipidiques et polymériques

Les vecteurs lipidiques et polymériques sont respectivement des liposomes et des polymères souvent cationiques, capables de complexer les molécules biologiques. Les complexes résultants, respectivement appelés lipoplexes et polyplexes, interagissent avec les charges négatives des membranes puis entrent dans les cellules et y libèrent leur cargaison¹⁸⁴. Les liposomes cationiques ont été impliqués dans un nombre important d'essais cliniques, dont certains pour la délivrance de plasmide pour la thérapie génique de patients CF^{80,81}.

Dans le but de réduire la réponse immunitaire aux liposomes, des liposomes écrantés par des motifs PEG (polyéthylène glycol) ont également été développés et testés sur des primates¹⁸⁵. Des nanoémulsions sont utilisables pour la vectorisation de peptides, mais leur efficacité de transfection est modeste¹⁸⁶.

Les polymères synthétiques utilisés pour vectoriser des molécules anioniques sont le plus souvent composés de chaînes polyéthylènimine (PEI) ou poly(L-lysine) (PLL). Ces polymères délivrent efficacement leur cargaison mais sont associés à une forte cytotoxicité¹⁸⁷. Des lipopolyplexes, composés à la fois de lipides et de polymères, sont depuis peu utilisés et semblent un bon compromis entre lipoplexes et polyplexes¹⁸⁸. Ils peuvent notamment être fonctionnalisés avec des motifs de ciblage spécifiques de certaines cellules.

Pour la délivrance de protéines ou de peptides, on emploie parfois des polymères polaires non chargés tels que le chitosan, le polycaprolactone (PCL), les polyméthylméthacrylates (PMMA) ou le poly(acide

lactique) (PLA)^{186,189,190}. Ces polymères ont l'avantage d'être biocompatibles, non-immunogènes et donc peu toxiques. Ils sont toutefois mucoadhésifs et ne sont donc pas recommandés pour le traitement de la mucoviscidose¹⁹¹.

1.3.1.4. Vecteurs inorganiques et peptidiques

Outre les lipides et les polymères, des nanoparticules inorganiques ont été développées. Il s'agit de nanobilles constituées d'un cœur métallique d'or, de fer, de cobalt ou de nickel, et d'une couche d'enrobage contenant des thiols, des sucres ou des polymères auxquels peut être adsorbée la cargaison (souvent des oligonucléotides ou des peptides)¹⁹². Ces particules peuvent aussi être fonctionnalisées par toutes sortes de motifs telles que des fluorophores, des séquences de ciblage, des composants magnétiques ou thermosensibles, etc. Ces motifs leur procurent des activités diagnostiques et/ou thérapeutiques¹⁹³, et peuvent permettre la liaison non-permanente à des peptides thérapeutiques. Ces systèmes ne sont toutefois ni biocompatibles ni biodégradables, ce qui explique leur toxicité relative et le fait que leur application reste encore limitée.

Récemment, des nanoparticules de silice mésoporeuse ont été développées avec la même visée. Tout comme les nanobilles métalliques, elles peuvent être fonctionnalisées par une variété de motifs leur conférant des propriétés modulables. Elles ont été appliquées *in cellulo* au traitement du cancer par une stratégie originale : accumulation spécifique de photosensibilisateurs dans les cellules cancéreuses, puis excitation photodynamique des particules provoquant la mort des cellules cancéreuses^{194,195}. Cependant, elles ne sont pas biodégradables.

Les peptides vecteurs sont une alternative biocompatible et moins toxique. Ils sont aisément synthétisables industriellement et permettent la délivrance de peptides, mais aussi de protéines, de matériel génétique ou de molécules organiques. Ces outils versatiles seront présentés dans le chapitre suivant.

1.3.2. Les peptides vecteurs (Cell-Penetrating Peptides)

1.3.2.1. Historique

Les prémices du concept de peptide vecteur sont nés il y a trente ans, lorsque deux groupes indépendants ont observé que la protéine Tat (*transactivator of transcription*) issue du virus de l'immunodéficience humaine 1 (HIV-1) pouvait librement pénétrer les cellules et présenter une localisation nucléaire^{196,197}. Trois ans plus tard, le groupe du Pr. A. Prochiantz démontre à son tour que l'homéodomaine de la protéine *Antennapedia* de la drosophile est capable d'entrer seul dans les neurones¹⁹⁸.

Il a été révélé quelques années plus tard que des domaines particuliers de ces protéines sont suffisants pour promouvoir l'internalisation cellulaire, donnant respectivement naissance aux séquences minimales Tat¹⁹⁹ et Pénétratine (Pen)²⁰⁰. Initialement appelés domaines protéiques de transduction (PTD), ils furent regroupés sous l'appellation de « cell-penetrating peptides » (CPP) après la découverte de centaines

d'autres peptides d'origines et de séquences très différentes, possédant des capacités d'internalisation similaires²⁰¹. Il fut par la suite découvert qu'ils peuvent aussi bien être internalisés seuls dans la cellule qu'en association avec une molécule d'intérêt (cargaison), ce qui marqua le début de leur usage comme outil de vectorisation²⁰².

Aujourd'hui encore, il est difficile de définir des critères qui englobent tous les CPP existants. Ils possèdent toutefois des caractéristiques générales : leur séquence peptide contient entre 5 et 30 résidus, ils présentent souvent une charge nette positive et une capacité à traverser la membrane plasmique seuls ou avec une cargaison. La plupart d'entre eux montrent une grande efficacité d'internalisation tout en étant relativement peu toxiques²⁰¹. Selon leurs caractéristiques, ils peuvent permettre le transport de protéines, de peptides, d'acides nucléiques ou de petites molécules telles que des intercalants de l'ADN ou des sondes fluorescentes.

Les CPP ont initialement été classifiés selon leur origine :

- Certains comme Tat¹⁹⁹, Pen²⁰⁰ ou le peptide pVEC (issu de la VE-cadhérine)²⁰³ dérivent de domaines transmembranaires, ou de protéines de fusion/de transcription. Beaucoup de peptides issus de PTD sont riches en résidus cationiques.
- Des peptides chimériques ont été obtenus par fusion de fragments de différentes protéines. L'exemple-type est le transportan, né de l'association entre un neuropeptide dérivé de la galanine et du mastoparan, un peptide extrait du venin de frelon²⁰⁴. Le transportan vectorise des macromolécules variées et a servi de base aux PepFect²⁰⁵ et aux NickFect²⁰⁶. De façon similaire, les peptides MPG et Pep-1 ont respectivement été conçus par fusion de la séquence de localisation nucléaire (NLS) du T-antigène de SV40 avec le domaine gp41 du HIV²⁰⁷ ou avec un motif artificiel riche en tryptophanes²⁰⁸. Le peptide CADY est également un CPP chimérique dérivé du peptide de fusion JTS-1²⁰⁹.
- Il existe enfin des CPP purement synthétiques, issus de criblages ou d'études de relation structure-activité (SAR). En s'inspirant de Tat qui est riche en résidus cationiques, des homopolymères d'arginine de longueur variable (Arg_n, avec n = 4-16) ont été développés²¹⁰. Ces derniers sont plus efficaces que des homopolymères de lysine, d'ornithine ou d'histidine²¹¹ : en particulier, le nonamère Arg₉ est couramment employé²¹². De par leur grand nombre de charges positives, les Arg_n sont toutefois assez toxiques en comparaison avec d'autres CPP²¹³.

Les CPP ont ensuite été classifiés selon leurs caractéristiques physico-chimiques²¹⁴ :

- Les CPP cationiques (ou non-amphipathiques, CPPna) contiennent peu de résidus hydrophobes et sont riches en résidus chargés positivement (arginine, lysine voire histidine), ce qui leur permet d'interagir avec les phospholipides membranaires chargés négativement²¹⁵. Ils n'adoptent généralement pas de structures secondaires spécifiques seuls ou au contact de membranes lipidiques. Les principaux CPP de cette catégorie sont Tat, Pen et les polyarginines.
- Les CPP amphipathiques ont des proportions à peu près similaires en résidus hydrophiles et hydrophobes, qui, lorsqu'ils sont arrangés de façon spécifique, leur confèrent une nature bipartite amphiphile via la formation de deux domaines hydrophile et hydrophobe²¹⁶. En comparaison avec les peptides cationiques, les CPP amphipathiques adoptent plus fréquemment des structures secondaires spécifiques au contact des membranes lipidiques. On distingue les peptides amphipathiques primaires (CPPap) qui disposent au niveau de leur séquence d'un bloc hydrophile associé à un bloc hydrophobe, et les peptides amphipathiques secondaires (CPPas) dont la répartition des résidus hydrophiles et hydrophobes au sein de la séquence

permet la formation des deux domaines lorsque le peptide se structure en hélice alpha. Les peptides MPG et Pep-1 sont des exemples-types des CPPap ; tandis que les peptides MAP (*Model Amphipathic Peptide*)²¹⁷, SAP (*Sweet Arrow Peptide*)²¹⁸, CADY-K²¹⁹ et son équivalent *retro inverso* RICK^{220,221} constituent quelques-uns des CPPas les plus importants.

- Les CPP hydrophobes ont une faible charge globale et sont très riches en résidus hydrophobes²²², ce qui leur permet de traverser facilement les chaînes grasses des phospholipides membranaires.

De nos jours, l'usage des CPP s'est démocratisé *in cellulo* et *in vivo*²²³⁻²²⁵. Ils sont impliqués dans de plus en plus d'essais cliniques portant sur des affections telles que la perte d'audition (Auris Medical, phase III : NCT02561091, NCT02809118) ou l'inflammation intra-oculaire (Xigen SA, phase III : NCT02235272)²²⁶⁻²²⁸. La découverte de nouvelles séquences se poursuit²²⁹ mais laisse progressivement place au développement de modifications des CPP existants. On peut citer le développement d'analogues de CPP *retro inverso* ou cycliques, qui présentent une stabilité métabolique renforcée^{220,230} ; la PEGylation, qui augmente la furtivité et la durée de circulation sanguine du peptide avant son excrétion²²¹ ; le couplage de séquences de ciblage, qui permettent par exemple à un CPP de s'accumuler spécifiquement dans des cellules cancéreuses²³¹ ; ou la fonctionnalisation par des motifs pH-sensibles qui facilitent la fuite du peptide hors des endosomes (*proton sponge effect*)^{232,233}.

1.3.2.2. Stratégies de vectorisation par les CPP

Les CPP peuvent être associés à leur cargaison de deux façons : soit par un lien chimique covalent, soit par des interactions électrostatiques et hydrophobes formant un complexe stable (**Figure 1.19**).

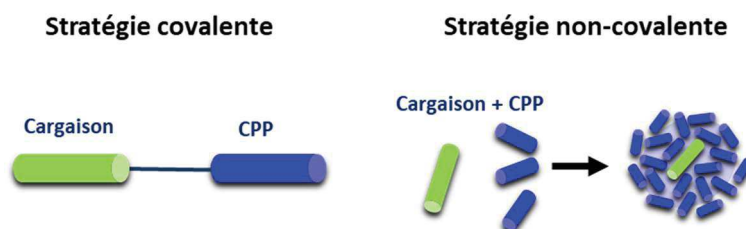


Figure 1.19. Stratégies covalente et non-covalente pour la vectorisation par des CPP.

La stratégie covalente implique une liaison chimique entre le CPP et sa cargaison. La stratégie non-covalente repose sur des interactions physiques (électrostatiques, hydrophobes...) menant à la formation de complexes.

En stratégie covalente, des liaisons chimiques sont formées entre le CPP et sa cargaison. Il peut s'agir de liaisons temporaires qui seront dissociés une fois dans la cellule (ponts disulfure, liens pH-dépendants ou sites de clivage par les protéases), ou de liaisons permanentes (amide, thioéther ou thioester). Cette stratégie est la plus souvent utilisée avec les CPP comme Tat, Pen, pVEC ou les différents polyarginines²⁰¹, notamment pour délivrer des molécules plutôt neutres comme des acides nucléiques peptidiques (PNA), des phosphorodiamidate morpholino-oligomères (PMO), des peptides ou des protéines^{234,235}. Cette méthode permet de contrôler la stœchiométrie CPP:cargaison. Toutefois, le couplage nécessite parfois des modifications chimiques. Le CPP et la cargaison ont également une influence mutuelle l'un sur l'autre : le

CPP peut affecter l'activité ou la structuration de la cargaison, et la cargaison peut modifier l'efficacité et le mécanisme d'entrée du CPP^{236–239}.

En stratégie non-covalente, le vecteur et sa cargaison forment un complexe stable *via* des interactions physiques. Cette stratégie a essentiellement permis de vectoriser des oligonucléotides avec MPG^{207,240}, stéaryl-(RXR)₄²⁴¹ ou PepFect²⁰⁵. Les charges positives des CPP sont cruciales et permettent d'établir des interactions électrostatiques avec les charges négatives de la cargaison (par exemple un oligonucléotide), ce qui mène par neutralisation de charges à la formation d'un complexe puis d'une nanoparticule. Une phase d'optimisation est toutefois requise pour déterminer le ratio molaire entre le peptide et sa cargaison^{242,243}. Pour une cargaison neutre ou cationique, l'assemblage non-covalent n'est pas toujours aussi efficace et une liaison covalente est souvent privilégiée.

1.3.2.3. Mécanismes d'internalisation des CPP

1.3.2.3.1. Deux mécanismes, un point de départ commun

Il existe deux classes de mécanismes pour l'internalisation des CPP : les mécanismes énergie-dépendants employant les voies d'endocytose, et les mécanismes énergie-indépendants consistant généralement en une translocation directe du CPP à travers la membrane. Chaque CPP peut employer un ou plusieurs de ces divers mécanismes à des proportions différentes. Le mécanisme d'entrée d'un CPP est un problème multifactoriel impliquant la température, le ratio peptide/cellule, le type cellulaire ou encore la nature de la cargaison^{244–246}.

La première étape communément acceptée de l'internalisation des CPP cationiques ou amphipathiques est une interaction de leurs résidus cationiques (en particulier les arginines) avec les charges négatives des phospholipides ou de motifs présents à la surface de la cellule, tels les protéoglycans à héparane sulfate (HSPG) ou les glycosaminoglycans (GAG)^{247–251}. Cette interaction est le point de départ commun des mécanismes d'endocytose et de translocation directe.

1.3.2.3.2. Acides aminés et facteurs influençant l'internalisation des CPP

Les acides aminés cationiques et les tryptophanes sont cruciaux pour l'internalisation cellulaire. En particulier, les arginines permettent une interaction bidentate du CPP avec les composants anioniques de la membrane tels que les phospholipides ou les GAG^{247,252}, d'où leur présence dans la majorité des CPP. Cette interaction peptide-membrane fut d'ailleurs longtemps un biais de la quantification de l'internalisation des CPP, le peptide accroché à la membrane extracellulaire provoquant une surestimation^{213,253}. Les tryptophanes sont également importants car ils participent à l'insertion du CPP dans la membrane^{245,254–258}. De façon générale, le potentiel de transfection d'un CPP résulte de sa capacité à interagir avec les motifs anioniques et/ou les lipides.

En plus du contenu du CPP en arginine et en tryptophane, des études de SAR ont souligné l'influence de paramètres comme la longueur de la séquence, la nature de l'extrémité C-terminale, le nombre de charges et le degré d'amphipathicité sur l'efficacité de transfection²⁵⁹. La capacité de certains CPP à présenter un

polymorphisme de structures secondaires est également un paramètre important : pouvoir se structurer en hélice α au contact des membranes renforce l'efficacité de transfection de certains CPP^{200,260–262}. La régularité de l'espacement des tryptophanes est également un facteur-clé, notamment pour les CPPas^{256,263,264}. En revanche, la stéréochimie du peptide ne semble pas jouer de rôle particulier car des analogues de Tat et de Pen constitués d'AAD ont montré une efficacité d'internalisation similaire voire améliorée, indiquant l'absence d'une internalisation récepteur-dépendante^{254,265}.

1.3.2.3.3. Internalisation par les voies d'endocytose

L'endocytose est le mécanisme général de transport de molécules et de particules vers l'intérieur de la cellule. Deux sous-catégories de mécanismes endocytiques sont la phagocytose, qui est l'ingestion de particules de grande taille (à partir du micromètre) par certaines cellules spécialisées, telles que les macrophages ; et la pinocytose, qui regroupe un ensemble de processus ubiquitaires d'internalisation de solutés et de biomolécules par les cellules²⁴⁷. Parmi d'autres, on distingue trois voies principales de pinocytose, appelées par extension « voies d'endocytose » (**Figure 1.20**) : la voie cavéoline-dépendante (médiée par un sous-type de rafts lipidiques, des zones enrichies en sphingomyéline et cholestérol), la voie clathrine-dépendante, et la macropinocytose plutôt non-spécifique. Marginalement, il existe aussi d'autres voies d'endocytose indépendantes de la clathrine et de la cavéoline.

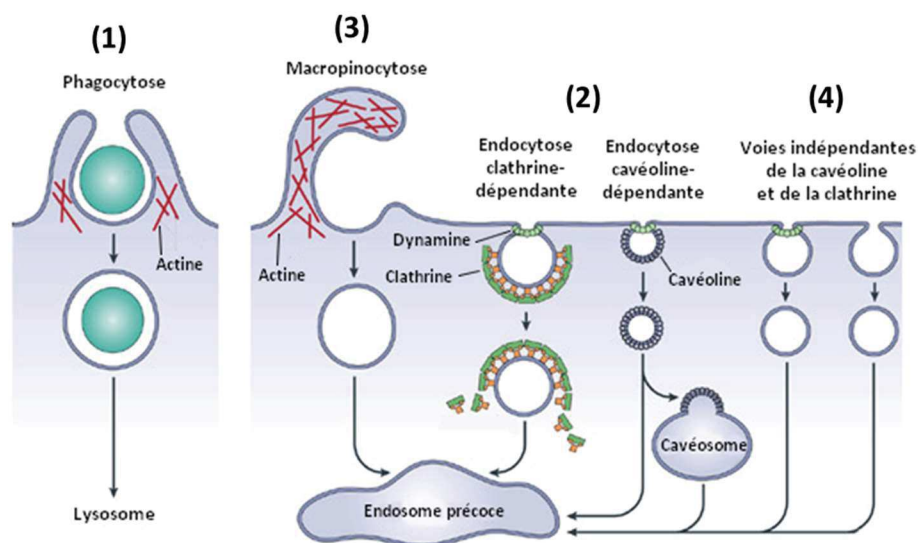


Figure 1.20. Mécanismes d'endocytose.

(1) La phagocytose est un mécanisme spécifique des cellules immunitaires qui permet l'absorption et la dégradation lysosomale de particules de taille supérieure au micromètre. (2) Endocytoses clathrine- et cavéoline-dépendantes : lorsqu'une molécule se fixe sur des zones de la membrane présentant de la clathrine ou de la cavéoline, elle est progressivement piégée dans une invagination de la membrane puis séparée du milieu extracellulaire par la dynamine. La vésicule est alors convertie en endosome précoce, puis progressivement acidifiée (endosome tardif) pour être finalement dirigée vers le lysosome. (3) Lors de la macropinocytose, la cargaison est progressivement entourée par des filaments d'actine qui forment une vésicule. Cette vésicule est ensuite dirigée vers le lysosome de la même façon que pour les autres voies d'endocytose. (4) Les voies indépendantes de la cavéoline et de la clathrine impliquent une invagination de la membrane et peuvent recourir ou non à la dynamine. La vésicule est ensuite dirigée vers le lysosome. Adapté de Mayor et Pagano²⁷⁰.

L'un des critères de décision parmi ces voies d'internalisation peut être associé à la taille de la cargaison à internaliser. Il a notamment été décrit que la voie clathrine-dépendante est généralement adaptée aux molécules et particules de taille inférieure à 200 nm et la voie cavéoline-dépendante aux particules de taille comprise entre 200 nm et 1 μ m ; de même, la macropinocytose peut impliquer la formation de vésicules allant de 500 nm à 5 μ m de diamètre²⁶⁶. Enfin, dans le cadre de l'internalisation de CPP, ces valeurs sont à comparer à la taille de la cargaison délivrée, ou à l'éventuel auto-assemblage de CPP pour ce qui concerne les stratégies non-covalentes.

De nombreux CPP tels Tat, Pen et Arg₉ peuvent emprunter simultanément les trois voies d'endocytose²⁶⁷. Il est également fréquent que dans des cellules où l'une des voies d'endocytose est inhibée ou faiblement efficace, la cellule compense cette défaillance en activant ou suractivant d'autres mécanismes, conduisant alors à l'internalisation des CPPs selon ces autres voies. Alternativement, il est envisageable que certains CPP puissent s'adapter à la défaillance de certains mécanismes d'internalisation en empruntant une autre voie d'internalisation^{268,269}.

1.3.2.3.4. Internalisation par translocation directe

L'interaction entre les résidus cationiques des CPP et les composants anioniques de la membrane (phospholipides, GAG...) mène à une compensation des charges²⁵². Le complexe résultant peut perturber localement la membrane cellulaire et faciliter l'interaction d'éventuels résidus hydrophobes du peptide avec les chaînes lipidiques. A la suite de cette interaction, divers modèles proposés sur la base d'approches expérimentales sont proposés pour la translocation énergie-indépendante de CPP à travers la membrane (**Figure 1.21**).

Un premier modèle largement accepté pour les CPPas est celui en *barrel-stave*^{271,272}. Après complexation des phospholipides par les charges positives des CPP, ils se structurent en hélice α et s'assemblent de façon cylindrique dans les membranes. Ils associent alors leurs résidus hydrophobes entre eux et dirigent leurs résidus hydrophiles vers les têtes phosphate polaires des phospholipides. Ce mécanisme correspond à des CPPas dont le caractère global est plus hydrophile qu'hydrophobe, et qui interagissent principalement avec les phospholipides anioniques^{273,274}. Ce modèle implique une perturbation mineure de la bicouche lipidique et peut donc être associé à une toxicité moindre.

Le mécanisme du pore toroïdal n'est quant à lui pas spécifique des CPPas^{272,275}. Il est très similaire au modèle en *barrel-stave*, à la différence que le CPP ne se structure pas nécessairement en hélice et que les résidus hydrophobes sont cette fois dirigés vers les chaînes lipidiques. Une réorganisation importante des lipides est requise pour rompre l'interaction électrostatique CPP-phosphate et former des interactions hydrophobes CPP-chaînes lipidiques : cela peut causer une déstabilisation plus forte de la membrane et donc une certaine cytotoxicité. Ce modèle est plus souvent associé aux CPPap dont le caractère global est plus hydrophobe qu'hydrophile, qui interagissent autant avec les phospholipides anioniques que neutres et qui induisent des pores à plus faible concentration que les CPPas^{273,274}.

Pour les peptides fortement cationiques, le modèle de la micelle inverse prévoit que l'interaction électrostatique CPP-phospholipide perturbe la bicouche lipidique, ce qui affecte son rayon de courbure et crée une invagination dans la membrane menant à la formation d'une micelle à cœur hydrophile qui encapsule le CPP. Cette structure réduit les contacts entre les charges positives du CPP et les chaînes grasses

lipidiques²⁷⁷. Ce phénomène se répète ensuite dans le sens inverse pour ouvrir la micelle vers le cytosol. Ce mécanisme a été constaté pour des CPPna comme Tat²⁷⁸.

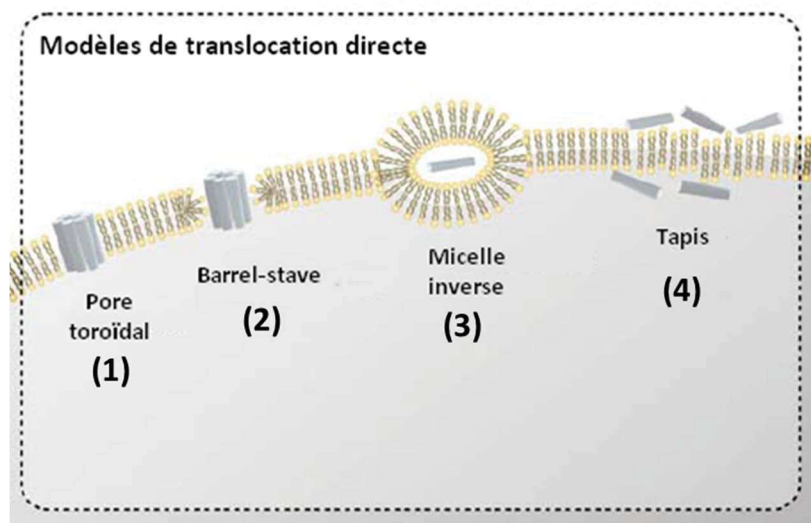


Figure 1.21. Modèles de translocation directe.

(1) *Modèle en pore toroïdal* : les CPP s'introduisent dans la bicouche lipidique et s'arrangent de façon à former un pore dont la face extérieure porte les résidus hydrophobes et interagit avec les chaînes lipidiques. (2) *Modèle en barrel-stave* : de façon similaire, les CPP s'arrangent en hélice α et forment un pore où la face extérieure porte cette fois les résidus hydrophiles. (3) *Modèle de la micelle inverse* : l'accumulation de CPP courbe la membrane, qui crée une invagination et forme une micelle membranaire où les têtes polaires des lipides interagissent avec les charges cationiques des CPP. (4) *Modèle du tapis* : le CPP s'accumule à la membrane jusqu'à atteindre une concentration critique où la membrane est déstabilisée et devient perméable aux CPP. Adapté de Trabulo et al²⁷⁶.

Enfin, un dernier modèle est celui du tapis (*carpet*), qui prévoit l'accumulation massive de CPP à la membrane plasmique : une fois une concentration critique atteinte, le CPP désorganise de façon importante la structure lipidique pour permettre son passage à travers la membrane²⁷⁴. Ce mécanisme peut être assimilé à une sorte d'électroporation locale²⁷⁹, associée à un fort ratio peptide/lipide et à une cytotoxicité élevée²⁷⁴.

Outre ces modèles, divers mécanismes entrent en jeu, tels que les mécanismes de flip-flop membranaires qui facilitent la fluidité de la membrane et les échanges entre couches lipidiques externe et interne²⁸⁰ et la réparation rapide de la membrane (*membrane repair response*) qui peut compenser les déstabilisations membranaires lorsqu'elles sont minimes²⁸¹.

En conclusion, l'importance de ces modèles dans le mécanisme d'entrée d'un CPP repose sur la balance hydrophile/hydrophobe du peptide. Le ratio entre ces deux types de résidus, leur répartition ainsi que des considérations énergétiques (prédominance des interactions électrostatiques ou hydrophobes) guideront le CPP vers des mécanismes provoquant des perturbations lipidiques modérées (modèles *barrel-stave* et micelle inverse) ou plus fortes (modèles pore toroïdal et tapis), définissant ainsi la cytotoxicité du peptide.

1.3.2.3.5. Endocytose ou translocation directe ?

Les voies d'endocytose permettent l'entrée du CPP et de sa cargaison par les endosomes, un mécanisme « prévu » dans le fonctionnement normal de la cellule qui ne menace pas l'intégrité structurale des

membranes. Mais en absence de reconnaissance particulière, les endosomes sont dirigés vers les lysosomes, ce qui implique le recyclage et la dégradation de leur contenu. L'obtention d'une réponse biologique est donc conditionnée par la capacité des CPP à traverser la membrane endosomale ou à la lyser²⁸². Plusieurs groupes se sont intéressés à cette thématique^{233,283}.

Les CPP employant des mécanismes de translocation directe ne sont pas concernés par le problème du piégeage dans les endosomes. En revanche, leur internalisation implique des déstabilisations temporaires de la membrane qui peuvent être cytotoxiques si elles sont trop durables et/ou intenses²⁸⁴, comme pour les peptides antimicrobiens²⁸⁵. L'efficacité d'un CPP résulte donc d'un subtil équilibre entre efficacité de translocation et perturbation minimale des membranes (**Figure 1.22**).

De façon générale, les CPP peuvent employer simultanément l'endocytose et à la translocation directe²⁸⁶, mais la balance entre ces deux possibilités est différente pour chaque peptide et chaque type cellulaire. Elle est aussi affectée par certains paramètres comme la taille de la cargaison qui peut favoriser les voies endocytiques ou la concentration élevée de peptide qui peut favoriser la translocation directe²⁶⁷.

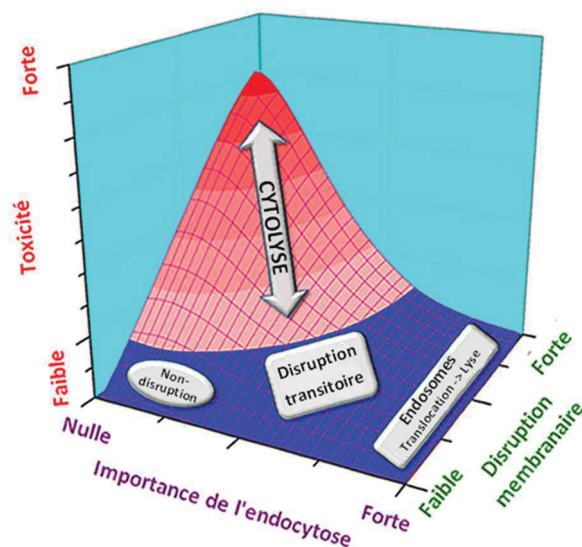


Figure 1.22. Endocytose, disruption membranaire et cytotoxicité.

De façon générale, les voies d'endocytose impliquent une toxicité moindre que les mécanismes de translocation directe. Une déstabilisation importante de la membrane mènera à de la cytotoxicité : il est donc souhaitable qu'un CPP entre par endocytose puis s'échappe des endosomes, ou qu'il entre par translocation directe via des mécanismes peu disruptifs (modèle barrel-stave ou micelle inverse). Adapté de Kauffman et al²⁴⁶.

Chapitre 2

-

Objectifs de la thèse et stratégie développée

La protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) est un canal ionique localisé à la membrane apicale des cellules épithéliales, dans des organes tels que le poumon, l'intestin ou le pancréas. Son rôle est de permettre l'efflux de petits anions tels que le chlorure ou le bicarbonate. Les mutations du gène CFTR causent la mucoviscidose (CF), la plus commune des maladies autosomales récessives létales chez les populations caucasiennes. Cette maladie implique une perte partielle ou totale de la fonctionnalité de canal ionique de CFTR et mène notamment à la formation d'un mucus épais dans les poumons, qui ne peut plus être évacué par les cellules ciliées et qui devient un terrain favorable à la formation de biofilms bactériens.

La mutation p.Phe508del implique, parmi divers défauts, une demi-vie réduite du canal CFTR à la membrane apicale des cellules épithéliales. Les acteurs de la stabilité du canal à la membrane apicale sont les protéines NHERF qui amarrent le canal CFTR à la membrane plasmique (augmentation de la demi-vie) et la protéine CAL qui promeut son endocytose et sa dégradation lysosomale (diminution de la demi-vie). Les interactions de ces protéines avec le canal CFTR se font *via* leurs domaines PDZ (CALP pour CAL ; N1P1 et N1P2 pour NHERF1 ; N2P1 et N2P2 pour NHERF2). Les précédents travaux de l'équipe ont mené au développement de peptides inhibiteurs de l'interaction CFTR/CAL (iCAL), dits « stabilisateurs » du canal CFTR, par une approche impliquant la synthèse et le criblage de banques peptidiques (synthèse SPOT) combinés avec une quantification de ces interactions peptide/PDZ par polarisation de fluorescence (FP). Cette stratégie a permis d'identifier la séquence iCAL36 (ANSRWPTSII), qui est affine pour CALP ($K_i = 17,3 \mu\text{M}$) tout en n'ayant aucune interaction quantifiable avec les domaines PDZ des protéines NHERF ($K_i > 3\,000 \mu\text{M}$)¹⁶⁵. iCAL36 a par la suite mené à une hausse de l'efflux de chlorure (+11%) dans des cellules bronchiques de patients CF (CFBE-ΔF), démontrant la possibilité d'augmenter l'abondance du canal CFTR à la membrane apicale par cette approche⁴⁸.

Notre objectif est d'appliquer iCAL36 au traitement de patients CF : ce traitement serait délivré sous forme d'aérosol en association avec les thérapies existantes (ex : Orkambi®, Symdeko®) et avec des mucolytiques qui faciliteront la traversée du mucus des patients CF. Plusieurs aspects physico-chimiques d'iCAL36 limitent toutefois encore son potentiel. En particulier, iCAL36 est incapable d'internaliser les cellules : pour observer un effet significatif sur les cellules de patient, il a fallu administrer 500 μM de peptide et le combiner au BioPorter, un vecteur lipidique d'efficacité modeste. Ce n'est pas une dose acceptable : il faudrait quotidiennement administrer 3 g de peptide à un patient de 70 kg (environ 5,4 L de sang) pour atteindre cette concentration. De plus, le mucus des patients CF est visqueux et riche en protéases, ce qui rend l'internalisation d'iCAL36 encore plus difficile et mène à sa métabolisation rapide, réduisant de fait son efficacité thérapeutique. Il est donc vital d'optimiser la délivrance intracellulaire et la stabilité métabolique d'iCAL36.

Les peptides vecteurs (*Cell-Penetrating Peptides*, CPP) sont le plus souvent des peptides courts et de charge globale positive, qui peuvent pénétrer dans les cellules seuls ou associés à une cargaison. Des résultats encourageants ont déjà démontré l'efficacité des CPP pour la vectorisation *in cellulo* d'iCAL36^{166,287} : des conjugués MPG-iCAL36 (M36) et Pénétratine-iCAL36 (P36) ont internalisé avec succès des cellules Caco-2 (côlon) et CFBE-ΔF, en culture adhérente ou en interface air-liquide (cellules polarisées), sans présenter de cytotoxicité significative. Afin de poursuivre ces travaux, de nouveaux conjugués CPP-iCAL36 seront étudiés. A l'issue d'une phase de classement des CPP-iCAL36 suivant leur capacité d'internalisation cellulaire et leur absence de cytotoxicité, les candidats les plus prometteurs seront caractérisés *in vitro* et *in cellulo*, puis leur activité sur le canal CFTR sera évaluée.

Outre son interaction avec la protéine CALP, iCAL36 interagit avec la protéine TIP-1 impliquée dans la régulation de l'expression des protéines membranaires. L'interaction TIP-1/iCAL36 pouvant potentiellement réduire l'activité du peptide iCAL36 envers la protéine CALP, il serait désirable de prévenir cette interaction. En parallèle, augmenter l'affinité d'iCAL36 pour CALP permettrait de réduire la dose requise pour obtenir un effet thérapeutique. Le peptide iCAL36 étant déjà le produit d'une optimisation extensive par des acides aminés naturels, nous proposons le développement d'analogues d'iCAL36 contenant des acides aminés non-naturels (AANN), ce qui apporte de nouvelles sources de diversité moléculaire et permettrait de trouver des remplacements avantageux en termes d'affinité et de sélectivité pour CALP, ainsi qu'en termes de stabilité métabolique.

Les travaux réalisés seront divisés selon le plan suivant :

- Chapitre 3 - Pour évaluer l'efficacité d'internalisation de conjugués CPP-iCAL36, nous avons utilisé plusieurs méthodes de quantification basées sur la fluorescence : d'une part la quantification directe de fluorescence dans des lysats cellulaires, d'autre part la cytométrie de flux et la microscopie confocale sur cellules vivantes. Nous nous sommes rendu compte de biais entre les différentes techniques, particulièrement pour les CPP amphipathiques secondaires qui présentent un polymorphisme structural et des capacités à déstabiliser la membrane cellulaire. Ces biais peuvent mener à une surestimation de la quantité de CPP internalisée par la cellule. Les résultats de ce chapitre sont présentés sous forme d'une publication qui sera soumise à *BBA Biomembranes* dès le dépôt de brevet de la séquence WRAP5.

- Chapitre 4 - Dans ce chapitre, nous avons cherché à identifier les CPP optimaux pour la délivrance intracellulaire du peptide iCAL36. Sept conjugués CPP-iCAL36 ont été soumis à une variété de tests permettant d'évaluer leur cytotoxicité, leur efficacité de transfection et leur capacité à maintenir cette efficacité en présence de sérum. Les deux conjugués CPP-iCAL36 optimaux ont été caractérisés par des méthodes biophysiques, apportant des informations sur leur affinité et leur sélectivité pour CALP, ainsi que sur leur structuration secondaire dans plusieurs conditions biologiquement pertinentes. Leur mécanisme d'entrée dans la cellule a ensuite été étudié sur des modèles *in vitro* et *in cellulo*.

- Chapitre 5 - L'objectif de ce chapitre a été d'optimiser la méthode dite du peptide inversé, une extension de la synthèse SPOT permettant la synthèse de banques peptidiques présentant une extrémité C-terminale libre. Ce processus implique plusieurs étapes chimiques dont le rendement affecte la qualité des signaux obtenus et donc la précision du criblage des interactions peptide/protéine. Nous avons développé un nouveau support fonctionnalisé compatible avec la synthèse SPOT, permettant un meilleur contrôle de la densité peptidique à la surface de la membrane. Nous avons également optimisé la réaction de cyclisation permettant de libérer la fonctionnalité C-terminale des peptides tout en maintenant les peptides liés à leur support solide. La technologie résultante, appelée PIPE^{PLUS} (Seisel *et al.*, 2017), a démontré une résolution et une précision accrues par rapport au protocole précédent, et permet la synthèse efficace de banques de peptides contenant indifféremment des acides aminés naturels ou non-naturels.

- Chapitre 6 - Ce chapitre est consacré à l'optimisation de la séquence d'iCAL36 par synthèse SPOT et polarisation de fluorescence. Des banques de peptides analogues du peptide iCAL36 incluant des AANN ont été synthétisées et ont permis d'identifier des séquences présentant une affinité et une sélectivité pour CALP améliorées. En particulier, l'une de ces séquences a démontré une affinité pour CALP environ 70 fois supérieure à celle d'iCAL36 ; une autre présente une affinité 150 fois réduite pour TIP-1.

- Chapitre 7 – Dans ce chapitre, l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse seront discutés et comparés à la littérature. Les perspectives futures du projet seront également présentées.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse permettront de développer des « stabilisateurs » peptidiques optimisés, qui seront applicables en combinaison avec d'autres molécules thérapeutiques (Symdeko[®], mucolytiques) dans le but de mettre en place le meilleur traitement possible pour les patients CF.

Chapitre 3

-

**Comment évaluer
l'efficacité d'internalisation
des CPP par fluorescence :
biais méthodologiques
associés aux peptides riches
en tryptophanes
(Publication 1)**

How to evaluate the cellular uptake of CPPs with fluorescence techniques: dissecting methodological pitfalls associated to tryptophan-rich peptides.

Seisel et al. : Manuscrit qui sera soumis à Biochimica et Biophysica Acta (BBA) après finalisation du dépôt de brevet pour le peptide WRAP5.

Les peptides vecteurs (*Cell-Penetrating Peptides*, CPP) constituent de nos jours un moyen extrêmement efficace d'internaliser différents composés comme les peptides, les oligonucléotides, les protéines ou encore les petites molécules (fluorophores, drogues...). Il s'agit généralement de peptides courts et riches en résidus cationiques, qui peuvent internaliser la cellule par des voies énergie-dépendantes ou par des mécanismes indépendants de l'énergie.

Pour caractériser de façon extensive ces véhicules, il est essentiel de pouvoir mesurer leur efficacité d'internalisation. Différentes techniques de mesure de la fluorescence le permettent : la méthode quantitative la plus répandue est la cytométrie de flux sur cellules vivantes, mais elle n'est pas toujours applicable selon les échantillons cellulaires considérés (par exemple : cellules trop grandes ou polarisées). La spectroscopie de fluorescence sur lysats cellulaires est une méthode alternative ne souffrant pas de cette limitation. Pour étudier la compatibilité des résultats de ces deux méthodes, elles ont été toutes les deux utilisées pour quantifier l'internalisation de CPP fluorescents (sonde : TAMRA) vectorisant le peptide inhibiteur iCAL36 dans des cellules Caco-2. Des CPP cationiques pauvres en tryptophane (Tat, MPG) ou riches en tryptophane (C6M1, WRAP5) ont été utilisés. De façon étonnante, des résultats très différents ont été observés entre les deux méthodes. L'objectif de cet article a été d'expliquer ces divergences et de montrer comment y remédier.

Dans un premier temps, nous avons observé que la fluorescence de la sonde est affectée par la séquence peptidique du conjugué CPP-iCAL36, et que le rendement quantique de fluorescence des peptides diffère selon le tampon utilisé. Il est apparu que le tampon de lyse a une influence sur la fluorescence des conjugués CPP-iCAL36 : cette différence n'est pas liée au pH mais à la présence de détergents neutres (Triton X-100) ou anioniques (SDS). Ces détergents affectent la structuration des CPP-iCAL36 et modifient de fait l'accessibilité de la sonde fluorescente. De façon intéressante, une corrélation a été observée entre la présence de résidus tryptophane à proximité de la sonde, la présence d'un changement structural du CPP-iCAL36 correspondant et la variation de son rendement quantique de fluorescence sous l'action de détergents. Nous avons donc développé l'hypothèse que des phénomènes de quenching intramoléculaire sonde/tryptophane affectent la fluorescence des conjugués CPP-iCAL36. En tenant compte de ces résultats, nous avons appliqué un coefficient correcteur permettant d'observer une bien meilleure cohérence des résultats entre cytométrie de flux et spectroscopie de fluorescence sur lysats pour les conjugués pauvres en tryptophane. Toutefois, pour les conjugués impliquant les CPP riches en tryptophane, ce facteur de correction ne s'est pas révélé suffisant, indiquant l'existence d'un autre biais entre les deux méthodes.

Pour en savoir plus, nous avons observé la localisation cellulaire des conjugués CPP-iCAL36 par microscopie confocale. Il est apparu que les conjugués riches en tryptophane apparaissent majoritairement au contact des membranes cellulaires, alors que les conjugués pauvres en tryptophane apparaissent exclusivement dans le cytosol. Ces résultats ont tout d'abord paru déroutants, car tous les CPP riches en résidus cationiques sont connus pour interagir fortement avec les constituants extracellulaires anioniques de la membrane plasmique. Nous avons par la suite expliqué ce résultat en prouvant que les peptides marqués par la sonde TAMRA sont sujets à un quenching de proximité sonde/sonde lorsqu'ils sont

localement concentrés, comme par exemple à la surface de la membrane plasmique, d'où une fluorescence invisible en microscopie confocale. En revanche, en se basant sur la capacité des conjugués non-marqués C6M1-iCAL36 et WRAP5-iCAL36 à s'auto-assembler (capacité observée lors de mesures de DLS), il nous est apparu que les peptides marqués interagissent probablement entre eux *via* leurs chaînes latérales, introduisant des contraintes conformationnelles limitant la capacité de ces peptides à interagir *via* leurs sondes et permettant la visualisation de ces peptides à la surface de la membrane.

Nous avons ensuite montré que les deux conjugués CPP-iCAL36 riches en tryptophanes sont capables de s'insérer dans les membranes plasmiques et peuvent y subir un quenching de leur fluorescence : ce quenching n'est pas lié au contact direct avec les lipides, mais à la présence de protéines transmembranaires qui sont riches en tryptophanes. Cela implique que lorsque ces peptides sont piégés dans les membranes, un quenching sonde/tryptophane intermoléculaire se produit et mène au quenching de la fluorescence des peptides. Lorsque les cellules sont lysées le piégeage du peptide dans la membrane est aboli, ce qui rompt le contact entre les protéines transmembranaires et le peptide résultant en une disparition du quenching. Ce phénomène explique les divergences observées entre cytométrie en flux (cellules intactes, fraction intramembranaire invisible) et spectroscopie sur lysats (membrane solubilisée, fraction intramembranaire visible).

En conclusion, il est extrêmement important d'analyser l'internalisation des CPP (seuls ou conjugués à une cargaison) par différentes méthodes, et ce particulièrement pour des peptides riches en tryptophanes tels les CPP amphipathiques secondaires. En effet, ces peptides ont une forte tendance à subir des phénomènes de quenching sonde/tryptophane intramoléculaires et intermoléculaires, résultant *via* différents mécanismes en une sous-estimation ou surestimation de la fluorescence mesurée selon la méthode. Ces biais n'étant pas spécifiques à la sonde TAMRA, il est très important de considérer ces phénomènes de quenching sonde/tryptophane à chaque fois que l'on souhaite quantifier l'internalisation de CPP par des méthodes impliquant une mesure de fluorescence.

How to evaluate the cellular uptake of CPPs with fluorescence techniques: dissecting methodological pitfalls associated to tryptophan-rich peptides.

Quentin Seisel, Sébastien Deshayes, Prisca Boisguerin

Centre de Recherche de Biologie cellulaire de Montpellier, CNRS UMR 5237, Université Montpellier, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

Key words: Cell-Penetrating Peptides, Uptake, Quantification, Fluorescence, Tryptophan, Quenching

ABSTRACT

Cell-penetrating peptides (CPP) are broadly recognized as efficient non-viral vectors for the internalization of compounds such as peptides, oligonucleotides or proteins. Characterizing these carriers requires reliable methods to quantify their intracellular uptake. Flow cytometry on living cells is a method of choice but is not always applicable (e.g. big or polarized cells), so we decided to compare it to fluorescence spectroscopy on cell lysates. Surprisingly, for the internalization of a series of TAMRA-labelled conjugates formed of either a cationic or an amphipathic CPP covalently coupled to a decamer peptide, we observed important different internalization levels between both methods.

We partly explained these discrepancies by analyzing the effect of buffer conditions (pH, detergents) and peptide sequence/structure on TAMRA dye accessibility. Based on this analysis, we calculated a correction coefficient allowing a better coherence between both methods. However, an overestimated signal was still observable for the amphipathic peptides using the spectroscopic detection, which could be due to their localization at the plasma membrane. Based on several *in vitro* experiments modeling events at the plasma membrane, we hypothesized that fluorescence of peptides entrapped in the membrane bilayer could be quenched by the tryptophan residues of close transmembrane proteins. During cell lysis, cell membranes are disintegrated liberating the entrapped peptides and restoring the fluorescence, explaining the divergences observed between flow cytometry and spectroscopy on lysates.

Overall, our results highlighted major bias in the fluorescence-based quantification of internalized fluorescence-labelled CPP conjugates, which should be taken into account for an accurate uptake quantification.

1. INTRODUCTION

Cell-penetrating peptides (CPPs) have the ability to cross cellular membranes, either alone or while transporting other molecular cargoes either covalently linked or non-covalently associated to them[1–3]. Work in the CPP area stemmed from the discovery that the third helix of the Antennapedia homeodomain (pAntp[43–58])[4] and the transactivator of transcription of HIV-1 (Tat)[5,6] can cross biological membranes on their own. Following these findings, the number of peptides assigned to the family of CPPs has drastically increased within the last two decades[7–9]. CPPs have a great sequence diversity, but can nowadays be classified in three major classes: cationic (83%), amphipathic (44%) and hydrophobic (15%), some of them being part of several classes[10].

Backed by various experimental protocols, it is now largely accepted that CPPs can penetrate *via* energy-dependent routes (endocytosis) as well as *via* energy-independent pathways (direct translocation or transduction)[11]. Therefore, CPPs constitute excellent tools for promoting intracellular delivery of therapeutics even to organelles like mitochondria[12] or internalized bacteria[13]. The question of the internalization mechanism is fundamental for the selection of the adequate CPP for a distinct application or for the transport of a specific cargo.

The internalization efficiency of CPPs can easily be evaluated using fluorescence-based techniques such as flow cytometry or confocal microscopy, which are predominant in the literature: fluorophore-labeled CPP-conjugates are used to this extent[3]. Fluorescence-based analytical tools applied to CPPs have first been criticized because of the CPP cell-surface binding leading to an overestimation of the internalized CPP fraction by flow cytometry, as well as for their redistribution upon fixation of the cells for confocal microscopy[14]. In order to circumvent these pitfalls, enzymatic digestion should be performed to eliminate externally-sticking CPPs and microscopic imaging should be performed on living cells. One should also remember that fluorophore labelling of a CPP can affect its cellular distribution[15].

For a rapid screening and comparison of the internalization of different CPP-conjugates, flow cytometry is the most adequate method. However, in some cases this approach is not applicable for too large cells (e.g. cardiomyocytes) or for polarized epithelial cells (e.g. air liquid interface culture) which cannot be separated by digesting enzymes due to tight junction formation. To evaluate the internalization of CPP-conjugates in polarized epithelial cells (for example in the context of cystic fibrosis) only quantitative fluorescence spectroscopy of cell lysates could be performed.

In the present study, we have coupled the cargo iCAL36 – a potent therapeutic peptide with cystic fibrosis application[16,17] – to a subset of different CPPs: Tat[18] (the most common used CPP), MPG (primary amphipathic peptide from our previous CPP screen[19,20]), C6M1[21] (secondary amphipathic peptide) and WRAP5 (tryptophan and arginine-rich amphipathic peptide; Konate *et al.*, manuscript in preparation). The cellular internalization of these conjugates was evaluated by flow cytometry, fluorescence spectroscopy and confocal microscopy in order to compare the reliability and the robustness of these three methods for intracellular CPP detection. The mixed isomer 5(6)-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) was selected to follow CPP-conjugate internalization, due to its relatively low sensitivity to photobleaching or solvatochromism compared to other fluorophores such as fluorescein[22,23].

Herein, we demonstrate that fluorescence intensity of the measured TAMRA-CPP-conjugates is a function of the CPP sequence as well as, when used, of the composition of the lysis buffer. Furthermore, we showed that TAMRA/TAMRA, TAMRA/lipid or TAMRA/tryptophan quenching could lead to over- or under-estimation of the occurring peptide internalization depending on the used screening method (flow cytometry *versus* fluorescence spectroscopy). Our results give an overview of possible pitfalls which could occur during the quantification of CPP uptake by fluorescence techniques. We will show that these bias especially concern

peptides able of membrane destabilization and/or exhibiting high tryptophan content, such as secondary amphipathic CPPs.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Peptide synthesis

Peptide synthesis was performed by LibertyBlue™ Microwave Peptide Synthesizer (CEM Corporation), an additional module of Discover™ (CEM Corporation) combining microwave energy at 2450 MHz to the fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)/*tert*-butyl (*t*Bu) strategy. Peptide identity and purity was checked by LC-MS (Waters). For more details, see Supplemental Information.

Table 1: Sequences used in this study.

Name	ID	Sequences	MW [g/mol]	AA
iCAL36	36	ANSRWPTSII	1144.3	10
*iCAL36	*36	*-ANSRWPTSII	1556.7	10
Tat-iCAL36	T36	GRKKRRQRRRPPQ-ANSRWPTSII	2843.6	23
*Tat-iCAL36	*T36	*-GRKKRRQRRRPPQ-ANSRWPTSII	3256.1	23
MPG-iCAL36	M36	GALFLGWLGAGSTMGAWSQPKKKRKV-ANSRWPTSII	3972.3	37
*MPG-iCAL36	*M36	*-GALFLGWLGAGSTMGAWSQPKKKRKV-ANSRWPTSII	4384.8	37
C6M1-iCAL36	C36	RLWRLLWRLWRRLWRLLR-ANSRWPTSII	3772.2	28
*C6M1-iCAL36	*C36	*-RLWRLLWRLWRRLWRLLR-ANSRWPTSII	4184.7	28
WRAP5-iCAL36	W36	xxxxxxxWxxxxxxxxx-ANSRWPTSII	3230.9	25
*WRAP5-iCAL36	*W36	*-xxxxxxxWxxxxxxxxx-ANSRWPTSII	3643.4	25

Footnote: * = TAMRA

WRAP5 sequence is momentarily not disclosed due to current patent application. After patent submission, the sequence will be added and the manuscript will send to BBA Biomembranes.

2.2. Peptide solubilization

Peptide stock solutions were prepared at 500 μ M in milliQ water (for *W36 2% of DMSO were added for solubilization purposes). After sonication for 5 min and centrifugation (5 min, 13,200 rpm), supernatant of the peptide solution was filtered (0.22 μ m). Finally, peptide concentration was controlled by absorbance at 280 nm using a NanoDrop device (Thermo Scientific).

2.3. Cell culture

Human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells were purchased from ATCC (HTB-37). Cells were maintained in DMEM 4.5 g/L glucose supplemented with UltraGlutamine (Lonza), 20% fetal bovine serum (FBS from PAA), 1% MEM non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin, 1% sodium pyruvate and 1% sodium bicarbonate (all 100x, Life Technologies). Cells were passaged once a week using trypsin (0.05%, Life Technologies) and grown in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. Cell medium was changed at 24 h and 96 h post-trypsinization.

For uptake experiments, 2×10^5 cells (1 mL) were seeded in 24-well cell culture plates (Nunc) and for confocal microscopy 3×10^5 cells (1 mL) were plated in 35 mm FluoroDish cell culture dishes (WPI). In both case, medium was exchanged after 24 h and cells were used 48 h after seeding. All cells used in experiments were between passages 9 and 25 and were regularly tested for mycoplasma contamination.

2.4. Cellular uptake of TAMRA-labeled peptides

24-well cell culture plates were seeded and cultured as described above. Cells were rinsed twice with D-PBS (Life Technologies) and incubated with 500 μ L of either 1 μ M TAMRA-labeled peptides in OptiMEM (Life Technologies) for 1.5 hours at 37°C and 5 % CO₂. The incubation medium was then removed and the cells were rinsed twice with D-PBS. To remove peptides that could have adhered to the extracellular membrane, cells were incubated for 10 min with 100 μ L 0.05% trypsin at 37°C, 5% CO₂. Cells were transferred in 1.5 mL tubes after addition of 400 μ L D-PBS complemented by 5% FBS, followed by centrifugation (10 min, 4°C, 1,500 rpm). Pellets were taken up in 500 μ L D-PBS complemented by 0.5% FBS and 0.1% DAPI (Sigma-Aldrich).

2.4.1. Flow cytometry: Half of the resulting cell suspension was transferred to polystyrene round-bottom tubes (Falcon) then analyzed using a LSR Fortessa cytometer from Becton Dickinson (DAPI: λ_{ex} = 405 nm / λ_{em} = 425-475 nm; TAMRA: λ_{ex} = 561 nm / λ_{em} = 605-625 nm). Exclusion of damaged cells was performed by DAPI staining. For each condition 10,000 events were recorded.

2.4.2. Fluorescence spectrometry: The rest of the cell suspension was centrifuged (10 min, 4°C, 1,500 rpm). Subsequently the supernatant was removed and the cells were lysed 1 h in 100 μ L RIPA lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100 (Euromedex), 0.1% (w/v) sodium dodecylsulfate (SDS, Sigma-Aldrich), pH 8.0) complemented with 10% Sigmafast® protease inhibitor (Sigma-Aldrich). Cell lysates were ultimately centrifuged (10 min, 4°C, 13,200 rpm). Uptake was determined by measuring TAMRA emission in black 96-well plates on a PolarStar microplate reader (λ_{ex} = 544 nm / λ_{em} = 590 nm) using 50 μ L of supernatant. The fluorescence values were normalized to the total protein concentration using a bicinchoninic acid protein assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher).

2.5. Determination of the correction factor for fluorescence detection from lysis buffer

5(6)-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA-COOH, Novabiochem) and all TAMRA-labeled peptides used in this study (Table 1) were dissolved in milliQ water at a stock concentration of 5 μ M. Six different conditions were measured in a black 96-well plate (Greiner) (200 μ L/well) for each peptide: Tris or RIPA buffer alone (= 0 μ M peptide), 0.2 μ M and 0.05 μ M diluted in either Tris (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8) or RIPA buffer.

The fluorescence intensities were measured at room temperature (λ_{ex} = 544 nm / λ_{em} = 590 nm) using the PolarStar Omega microplate reader (BMG Labtech). Three independent measurements were performed with two technical replicates. The fluorescence values for each condition were averaged and, for each peptide, plotted in fluorescence *versus* peptide concentrations. The slope (in L.mol⁻¹) of the resulting linear regression was determined for the respective peptide at both buffer conditions.

In a first approach, the slope of the curve of each peptide in RIPA buffer was applied as correction factor for the TAMRA-labelled peptides (**Figure 1D**). In a second approach, the correction factor for each peptide was calculated by division of the curve slopes of each peptide in RIPA buffer *versus* in Tris buffer (**Figure 4**).

2.6. Fluorescence intensities of TAMRA-labeled peptides

2.6.1. Measurements using different pH: Different aqueous mixtures of 0.5 M citric acid (Sigma-Aldrich) and 0.5 M monosodium phosphate (Fluka) solutions covering a pH range of 5-8 were prepared to assess the influence of pH on peptide fluorescence. Before diluting the peptide in the buffers with different pH values, actual pH values were checked using a pH-meter (Eutech Instruments).

2.6.2. Measurements using detergents: Four different buffers were prepared to assess the influence of detergents on peptide fluorescence: 1. Tris buffer without detergents, 2. Tris buffer containing 1% (v/v) Triton X-100, 3. Tris buffer containing 0.1% (w/v) SDS and 4. Tris buffer containing both detergents (= RIPA buffer).

For both measurements, the TAMRA-labelled peptides were diluted to a final concentration of 0.2 μ M in the different buffers in a black 96-well plate (Greiner) (200 μ L/well). The fluorescence intensities were then measured at room temperature (λ_{ex} = 544 nm / λ_{em} = 590 nm) using the PolarStar Omega microplate reader (BMG Labtech).

2.7. Structure determination by circular dichroism

Circular dichroism spectra of the peptide (80 μM final concentration) were recorded with an optical path of 1 mm on a Jasco 810 (Japan) dichrograph in quartz suprasil cells (Hellma). Peptide signal was first recorded alone in 180 μL milliQ water. After addition of 20 μL of 1% (w/v) SDS (final concentration: 0.1% (w/v)) and homogenization of the solution a second measurement was performed. For each measurement, spectra of 3 accumulations were recorded between 190 and 260 nm (0.5 nm data pitch, 1 nm bandwidth) using the standard sensitivity.

2.8. Intracellular localization of TAMRA-labeled peptides

Cells were cultured in FluoroDish cell culture dishes as described above. Cells were rinsed twice with D-PBS (Life Technologies) and incubated with 1000 μL of either 1 μM or 5 μM TAMRA-labeled peptides in OptiMEM (Life Technologies) for 3 hours at 37°C and 5 % CO_2 . 10 min before the end of the incubation, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ WGA-Alexa488 (Invitrogen) were added for nuclei and membrane staining, respectively. The incubation medium was then removed, cells were rinsed twice with D-PBS and covered with 1.5 mL of FluoroBrite (Life Technologies). Fluorescence was observed at 37°C with a Leica SP5-SMD confocal microscope (Leica HCX PL Apo CS 63x/1.4NA oil objective lens; Hoechst 33342: λ_{ex} = 405 nm / λ_{em} = 415-485 nm; TAMRA: λ_{ex} = 561 nm / λ_{em} = 571-611 nm; Alexa488: λ_{ex} = 488 nm / λ_{em} = 498-548 nm). After acquisition, the confocal images were treated with the software ImageJ.

2.9. Fluorescence spectra measurements

2.9.1. Self-quenching experiments: Fluorescence spectra of serially diluted solutions of 5(6)-carboxytetramethylrhodamine, *T36 and *W36 in milliQ water (200 μM) or DMSO (10 mM) were recorded on a PTI fluorimeter (λ_{ex} = 553 nm / λ_{em} = 565-625 nm, with respective bandwidths of 1 nm and 1.5 nm).

2.9.2. TAMRA-LUV and TAMRA-tryptophan quenching: Serially diluted solutions of LUV reflecting the plasma membrane lipid composition (100 μM) (for LUV preparation see Supplemental Information) or L-tryptophan (50 mM) in milliQ water were prepared. 5(6)-carboxytetramethylrhodamine, *T36 or *W36 were added (final peptide concentration of 500 nM) and the fluorescence spectra of the solutions were recorded on a PTI fluorimeter (λ_{ex} = 553 nm / λ_{em} = 565-625 nm, with respective bandwidths of 1 nm and 1.5 nm).

2.10. Liposome leakage assay

Leakage measurements were performed as described elsewhere[24] (see also the Supplemental Information for LUV preparation). Leakage was measured as an increase in fluorescence intensity (λ_{ex} = 360 nm / λ_{em} = 530 nm, with respective bandwidths of 2 nm and 7 nm) upon addition of either iCAL36 or a CPP-iCAL36 (final peptide concentration of 2.5 μM) to 1 mL of LUVs (100 μM) in buffer (20 mM HEPES, 145 mM NaCl, pH 7.4). 100% fluorescence was achieved by solubilizing the membranes with 0.1% (v/v) Triton X-100 resulting in the completely unquenched probe.

2.11. Peptide interaction with the lipids in cell pellets

Caco-2 cells were incubated as described in the section “Cellular uptake of TAMRA-labeled peptides” After cell trypsinization, the cell pellets were taken up in 200 μL Tris buffer (composition as described above). 50 μL of the resulting cell suspension was transferred to black 96-well plates, then the rest of the cell suspension was centrifuged (10 min, 4°C, 1,500 rpm) and the cells were lysed as described above. Cell lysates were ultimately centrifuged (10 min, 4°C, 13,200 rpm) and 50 μL of supernatant was transferred to black 96-well plates. Fluorescence signal was determined by measuring TAMRA emission (λ_{ex} = 544 nm / λ_{em} = 590 nm) on a PolarStar Omega microplate reader (BMG Labtech). The fluorescence values were normalized to the total protein concentration using a bicinchoninic acid protein assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Discrepancies in CPP uptake quantification upon the use of different methods

Flow cytometry is generally used to screen or evaluate the cellular uptake of fluorescence-labelled CPPs or CPP-conjugates in single cells. However, with regard to an internalization in polarized epithelial cells, this method is not suitable due to tight junction formation between the cells prohibiting cell individualization. As this limitation is not encountered when performing quantitative fluorescence spectroscopy on cell lysates, we started to compare quantitatively the internalization of four CPP-conjugates using both flow cytometry and fluorescence spectroscopy on non-confluent Caco-2 cells, in order to assess the compatibility of the results between both methods. As cargo, we selected the peptide iCAL36, a potent therapeutic in the context of cystic fibrosis[16,17] (**Table 1**).

The four TAMRA-labelled (noted with *) CPP-conjugates as well as the *iCAL36 cargo alone (noted *36) were incubated for 1.5 h on Caco-2 cells. After washing steps, the cells were trypsinized to digest the cell surface-bound peptides and to detach cells. Cells were then washed and split in two batches (250 µl each): one for the flow cytometry and one which will be lysed for the fluorescence spectroscopy measurements. To enable the comparison of the fluorescence intensities measured by both methods, values were normalized by the *iCAL36 value (**Figure 1A and B**). Surprisingly, even after this normalization, the measured values for all CPP-conjugates were highly divergent between both methods.

To understand these disparities, we looked in details to the experimental conditions. During flow cytometry, the fluorescently labelled peptides are surrounded by the cell content (organelles, proteins, oligonucleotides, lipids etc.) which could have an impact on the dye properties. As this environment could not be reproduced adequately in an assay tube, flow cytometry results should be always compared to other methods such as confocal microscopy.

For the fluorescence spectroscopy measurements, the cells were lysed to have access to the fluorescently labelled peptides. To identify a possible effect of the peptide sequence on the TAMRA fluorescence intensity, comparative fluorescence measurement was performed on the dye alone or coupled to the different peptides in a dose-dependent manner. **Figure 1C** clearly revealed that the fluorescence intensity differs depending on the analyzed compound. Thus, the slope of each curve could be applied as correction factor for the TAMRA-labelled peptides (**Figure 1D**). After this correction, a slightly better coherence between both methods was observed for iCAL36, Tat-iCAL36 and MPG-iCAL36. However, the values for *C6M1-iCAL36 or *WRAP5-iCAL6 were still highly different (factor 25).

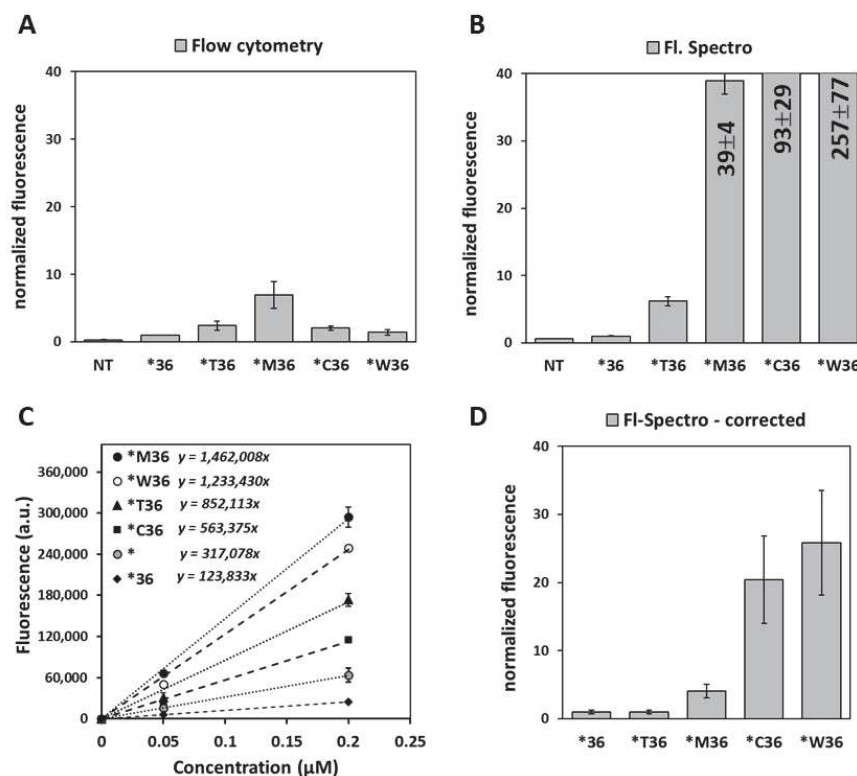


Figure 1: Comparison of the internalization of TAMRA-labelled CPP-iCAL36 conjugates measured by flow cytometry or by fluorescence spectroscopy after cell lysis.

Caco-2 cells were incubated with 1 μM TAMRA-labelled peptide solution in OptiMEM for 1.5 h. After cell trypsinization (to remove external peptide) each cell suspension was split in two batches (250 μL each). One pool was analyzed by flow cytometry (A) and the other was lysed and transfer in a microtiter plate for an acquisition by fluorescence spectroscopy (B). All fluorescence values were normalized to *iCAL36 (= 1).

(C) Dose-dependent fluorescence measurement of TAMRA alone, TAMRA-iCAL36 and of the four TAMRA-CPP-iCAL36 conjugates in RIPA buffer to obtain a slope as correction factor.

(D) Fluorescence values of the internalized peptide were corrected by the slope previously determined.

All graphs represent the mean ± SD from n ≥ 3 independent experiments measured in duplicates. * indicates TAMRA alone or TAMRA-labeling of the peptide. 36 = iCAL36, T36 = Tat-iCAL36, M36 = MPG-iCAL36, C36 = C6M1-iCAL36 and W36 = WRAP5-iCAL36.

3.2. Factors influencing the fluorescence intensity of TAMRA-labelled CPP-iCAL measured from cell lysate

Quantitative emission of fluorescence dyes can be influenced by different parameters of the used lysis buffer such as pH, salt concentration or the presence of detergents. The surrounding medium can have an impact on the position, shape and intensity of absorption and emission spectra of a dye moiety.

We first looked at the consequence of a pH shift. Indeed, fluorescein which is classically used as peptide labelling has important solvatochromic properties, losing nearly totally its signal at the low pH values which can be encountered in acidic cellular compartments[25]. TAMRA-labelled CPP-iCAL36 conjugates (0.2 μM) were consequently diluted in a series of citric acid/sodium monophosphate buffers covering a pH range of 5-8 representative of the diversity of cellular compartments, and measured by fluorescence spectroscopy in the absence of cells (Figure 2A). In all tested conditions no significant changes of the TAMRA fluorescence were observed, confirming that this rhodamine dye is not affected by variations in pH values between 4 and 10 which is an important advantage for many biological applications[26].

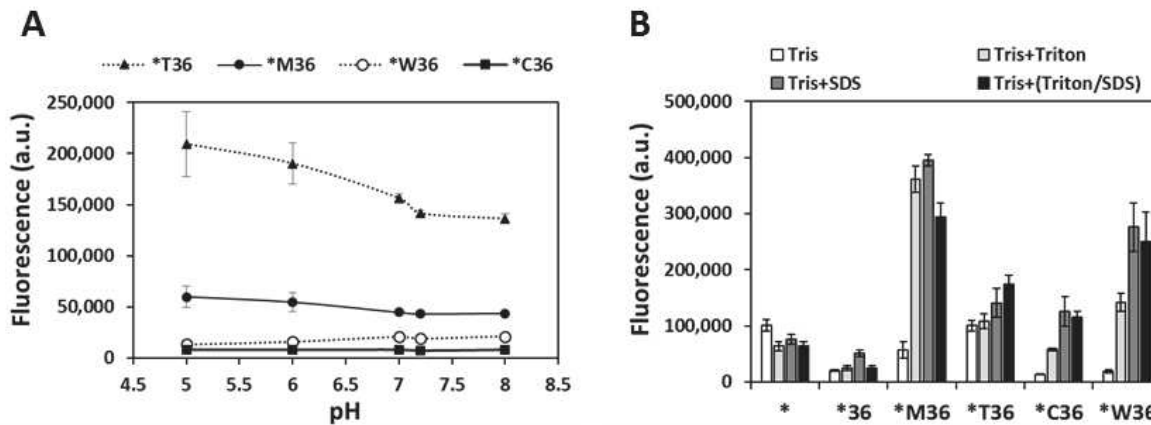


Figure 2: Evaluation of the conditions influencing the fluorescence intensities of the TAMRA-labelled CPP-iCAL36 conjugates.

(A) Evaluation of the pH dependence of the TAMRA-labelled CPP-conjugates (0.2 μ M) using a citric acid/sodium monophosphate buffer covering a pH range of 5-8 measured by fluorescence spectroscopy.

(B) Evaluation of the effect of detergents on the fluorescence intensity of TAMRA-labelled CPP-conjugates (0.2 μ M) measured by fluorescence spectroscopy.

Both graphs represent the mean $\pm$ SD from $n \geq 3$ independent experiments measured in duplicates. * indicates the TAMRA alone or the peptide labeling. 36 = iCAL36, T36 = Tat-iCAL36, M36 = MPG-iCAL36, C36 = C6M1-iCAL36 and W36 = WRAP5-iCAL36.

Further analyses did not show any influence of salt concentration or presence of DAPI on the TAMRA fluorescence (data not shown). We thus quantified the effect of the detergents present in the RIPA lysis buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 0.1% SDS, pH 8.0 = Tris+(Triton/SDS) by comparison to the Tris/NaCl buffer alone (=Tris) or with one of the detergents (= Tris+Triton or Tris+SDS) in the absence of cells (**Figure 2B**). The fluorochrome alone as well as *iCAL36 nearly show identical fluorescence intensity in the four buffer conditions. Curiously a slight reduction (factor 1.5 to 5) could be observed for the dye when it was coupled to the iCAL36 peptide in all buffers.

If Triton X-100 is added to the Tris buffer, we observe an increase of the fluorescence intensity compared to the Tris buffer alone especially for *MPG-iCAL36 (6x), *C6M1-iCAL36 (4x) and *WRAP5-iCAL36 (7x). Only *Tat-iCAL36 seems to be unaffected by the addition of Triton X-100. Compared to the Tris buffer alone, the fluorescence intensity of the analyzed peptides increase likewise in the Tris buffer containing SDS (*MPG-iCAL36: 7x, *C6M1-iCAL36: 9x and *WRAP5-iCAL36: 15x), with an even stronger effect of SDS compared to Tris+Triton. Addition of both detergents revealed nearly no additive effect. Only for *MPG-iCAL36 we observe a reduction of fluorescence intensity compared to the (Tris+SDS) or the (Tris+Triton) conditions.

Similar effects of detergents on a fluorescence dye were also observed by Illien *et al.* for the fluorescein-labelled CPP penetratin, especially for Triton-X100 and Nonidet 40 which are closely related detergents[27]. Triton X-100 is non-ionic whereas SDS is an anionic surfactant and therefore, it is reasonable to suppose that they will not have an important interaction with the TAMRA dye which is anionic. However, they could influence the structural behavior of the CPP-iCAL36 conjugates. In particular, SDS can interact with the cationic CPP side chains.

3.3. Changes in fluorescence intensity by detergents can be due to peptide conformation changes

To evaluate if the detergents have an effect on the CPP-iCAL36 structure and impact in this way the fluorescence intensity of the corresponding peptide, we performed circular dichroism (CD) measurements. The dichrogram of the four CPP-iCAL36 peptides alone (**Figure 3**, black line) reveal a randomly coiled structure for Tat-iCAL36 and MPG-iCAL36 and a mixed structure for C6M1-iCAL36 and WRAP5-iCAL36. Afterwards, Triton X-100 (1%) and SDS (0.1%) were separately added to the peptide solution. Unfortunately, the Triton X-100 aromatic moiety strongly absorbs in the range of 190 nm - 260 nm, making the evaluation of the peptide structuration impossible in the presence of Triton X-100. In contrast, SDS (0.1%, no SDS micelle formation at this concentration) does not absorb in this range and allows the evaluation of its effects on the peptide structure (Figure 3, grey line).

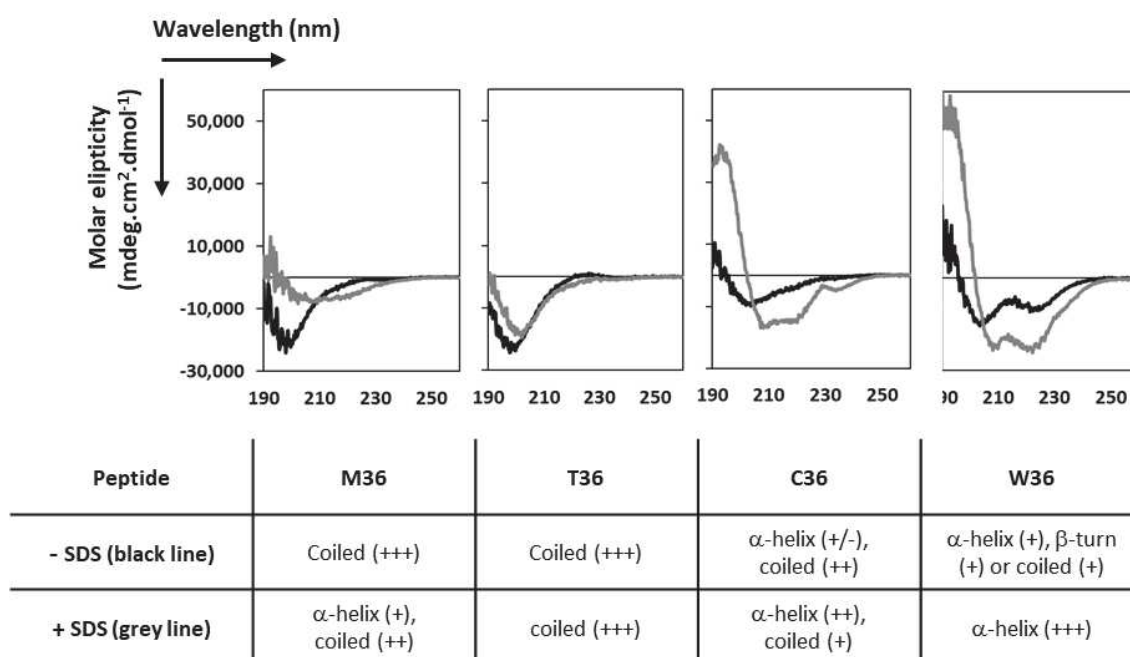


Figure 3. Characterization of the CPP-iCAL36 conformational changes in the presence of SDS.

Far-UV CD spectra of MPG-iCAL36, Tat-iCAL36, C6M1-iCAL36 and WRAP5-iCAL36 were measured in the absence (black line) or in the presence of 0.1% SDS (grey line). Relative proportion of typical structures were estimated qualitatively.

SDS has no significant effect on Tat-iCAL36 conformation and only slight ones on MPG-iCAL36. Those structuration effects are similar to those observed by Deshayes *et al* on the MPG peptide with low SDS amount[28]; additionally, the absence of structuration observed for Tat-iCAL36 mirrors the fact that the Tat peptide does not adopt any specific secondary structure in any condition[29]. However, stronger variations of peptide structure after SDS addition could be observed for C6M1-iCAL36 and WRAP5-iCAL36, resulting in an alpha helical restructuring. Similar results were obtained for C6M1-iCAL36 and WRAP5-iCAL36 in the presence of zwitterionic large unilamellar vesicles (LUVs) at a peptide/lipid molar ratio of 10:1 (**Figure S1**). These visualized conformational changes could hint a disruptive effect of SDS on intramolecular peptide interactions, influencing the position of the fluorescence dye (better accessibility) and resulting in a higher fluorescence signal. It would also imply that all tested peptides do not have the same fluorescence signal in absence of detergents, as probe hindrance could happen.

3.4. A correction factor allows to normalize some discrepancies between cytometry and spectroscopy

To get more information, we repeated the comparative measurement of the fluorescence intensity of TAMRA dye alone or coupled to the different peptides in a dose-dependent manner, but this time without detergents (Tris buffer only). **Figure 4A** shows significantly different patterns compared to **Figure 1C**. Here, the highest fluorescence intensities are observed for the dye alone or coupled to *Tat-iCAL36, while for all other TAMRA-labelled peptides an important decrease in fluorescence intensity was revealed. Interestingly, these signal decrease correlate with the presence of tryptophan residues near the dye (see **Table 1**). The aromatic core of the rhodamine dye could perform intramolecular π -stacking with the tryptophan residues, resulting in dynamic quenching of the TAMRA fluorescence.

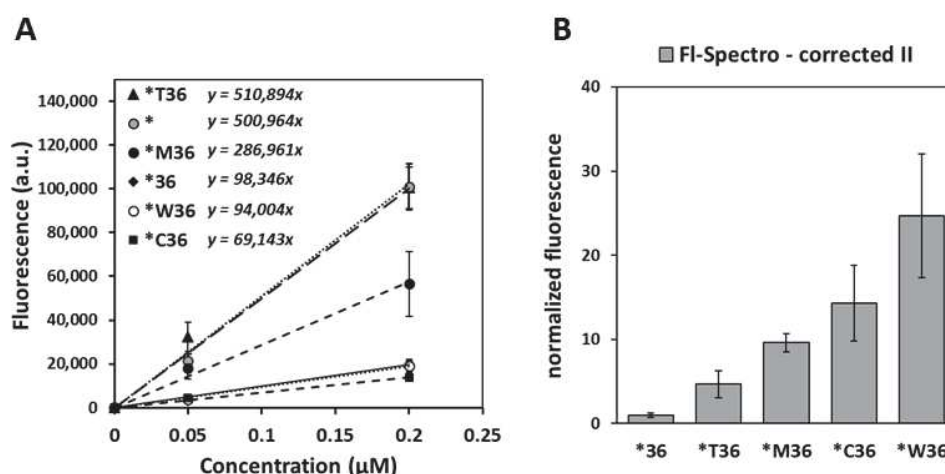


Figure 4. Determination of the correction factor to evaluate results from fluorescence spectroscopy.

(A) Dose-dependent fluorescence measurement of TAMRA alone, *iCAL36 and of the four *CPP-iCAL36 conjugates in Tris buffer (RIPA buffer without detergents) to obtain a slope as correction factor.

(B) Fluorescence values of the internalized peptide were corrected by the correction factor ($CF = \text{slope}[\text{Tris}] / \text{slope}([\text{Tris} + (\text{Triton}/\text{SDS})])$).

All graphs represent the mean $\pm$ SD from $n \geq 3$ independent experiments measured in duplicates. * indicates TAMRA alone or TAMRA-labeling of the peptide. 36 = iCAL36, T36 = Tat-iCAL36, M36 = MPG-iCAL36, C36 = C6M1-iCAL36 and W36 = WRAP5-iCAL36.

In conclusion, fluorescence intensity of the *CPP-iCAL36 peptides depends both on the peptide sequence itself and on the presence of detergents such as Triton X-100 and SDS as mentioned above. To take both factors into account, the correction factor for each peptide was adjusted by calculating the coefficient based on the slope[Tris] (**Figure 1C**) divided by the slope[Tris+(Triton/SDS)] (**Figure 4A**). After the application of the correction factor (**Figure 4B**), we obtain for *Tat-iCAL36 and *MPG-iCAL36 a much improved coherence of the fluorescence intensity profile between flow cytometry and fluorescence spectroscopy. However, fluorescence signal of *C6M1-iCAL36 and *WRAP5-iCAL36 still seem to be overestimated by fluorescence spectroscopy detection in comparison to flow cytometry, even when taking the fluorescence variation due to the detergents into account.

3.5. Visualization of the cellular internalization by confocal microscopy confirms discrepancies between the CPP-iCAL36 conjugates

Because both used methods – flow cytometry and fluorescence spectroscopy – revealed different results for *C6M1-iCAL36 and *WRAP5-iCAL36, we used a third commonly used technique to visualize the CPP-conjugate internalization: confocal laser scanning microscopy (CLSM) on living cells. Caco-2 cells were incubated with the corresponding TAMRA-labelled CPP-iCAL36 conjugates. 10 min before imaging nucleus (Hoechst) and membrane (WGA-Alexa488) labels were added for a better localization of the peptides (**Figure 5**).

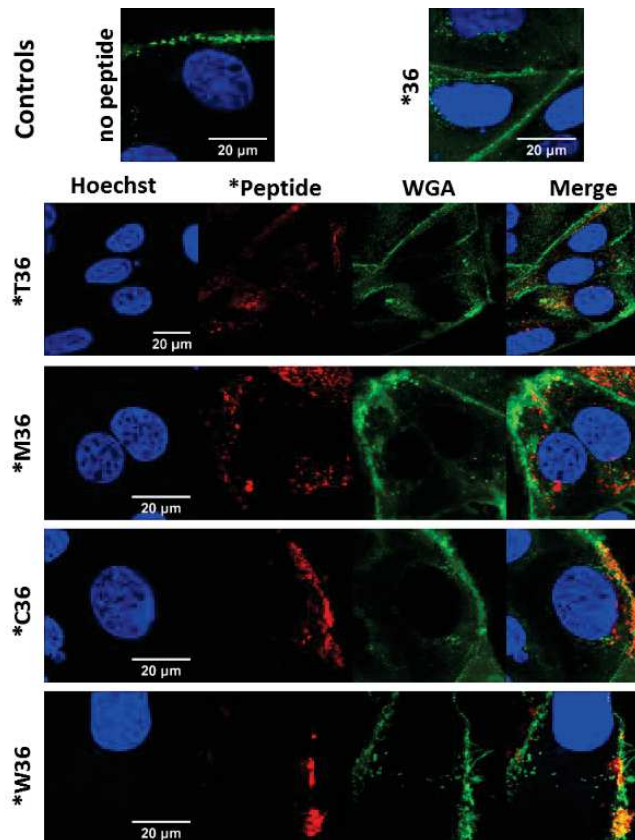


Figure 5. Cellular localization of the TAMRA-labelled CPP-iCAL36 conjugates.

Living Caco-2 cells were visualized by CLSM after 3 h incubation with the *CPP-iCAL36 conjugates (Red) in OptiMEM. 10 min before the end of the incubation, Hoechst dye (Blue) and WGA-Alexa488 (Green) were added. Cells were washed and covered with FluoroBrite before imaging. White bars represent 20 µm. 36 = iCAL36, T36 = Tat-iCAL36, M36 = MPG-iCAL36, C36 = C6M1-iCAL36 and W36 = WRAP5-iCAL36. * indicates TAMRA-labeling of the peptide.

First of all, we performed control experiments without peptide (OptiMEM) or with *iCAL36 to show that no auto-fluorescence nor *iCAL36 (without CPP) internalization are seen, respectively. For *CPP-iCAL36 conjugates, two different patterns are visible. *Tat-iCAL36 and *MPG-iCAL36 are located in a punctuated pattern in the cytoplasm of the Caco-2 cells whereas *C6M1-iCAL36 and *WRAP5-iCAL36 are mostly stuck at the plasma membrane (**Figure 5**). We observe for both peptides a co-localization with the membrane labelling of WGA-Alexa488 (orange merged color), indicating a localization of the peptides either bound at or inside the plasma membrane.

Trypsinization step is not applicable in the case of CLSM experiments, so the observed signal might involve peptide externally bound to the membrane. Furthermore, to our best knowledge the TAMRA dye could not be quenched as it is possible for fluorescein with trypan blue[19,27]. Other methods are going to be used to determine what happens with both peptides at the plasma membrane, as it would explain the divergent results obtained in flow cytometry and fluorescence spectroscopy.

3.6. Self-quenching of TAMRA dye at high peptide concentration

The arrangement of peptides bound to the plasma membrane can be approached by a two-dimensional space in which peptides are locally concentrated, and where peptide-peptide proximity interactions thus become highly prevalent[30]. It is known that rhodamine dyes such as TAMRA are able to perform self-quenching if they are in direct proximity[31]: in this context, it is likely that TAMRA/TAMRA quenching could take place on the outside of the plasma membrane.

To explore this possibility, we recorded fluorescence spectra of the TAMRA dye alone and the TAMRA-labelled Tat-iCAL36 and WRAP5-iCAL36 peptides as representative examples (**Figure 6A, B and C**). At the lowest concentration of 2 μ M, peptide spectra show a fluorescence maximum around ~570 nm for the dye alone and of ~575 nm for the *CPP-iCAL36 peptides. Increasing the concentrations of the dye or the dye-labelled peptides induce a non-linear variation of the fluorescence intensity and a red shift in fluorescence emission indicating a change in the local environment of the TAMRA dye. At the highest concentration of 200 μ M this fluorescence shift corresponds to 5 nm (569-574 nm) for the dye alone, to 9 nm (574-583 nm) for *Tat-iCAL36 and to 18 nm (575-593 nm) for *WRAP5-iCAL36.

To visualize the potential quenching phenomenon especially for *WRAP5-iCAL36, we selected the fluorescence intensity maxima and plotted the values *versus* the corresponding peptide concentration (**Figure 6D**). We observe a concentration-dependent increase of the fluorescence signal till the maximal concentration of 200 μ M for the dye alone and for *Tat-iCAL36. In contrast to these results, we observe a significant quenching effect with *WRAP5-iCAL36 even reflected by a weak decrease of the fluorescence intensity.

To further confirm these observations, we repeated the experiments with a higher concentration range (10 μ M to 10 mM) by diluting the peptides in DMSO (**Figure S2** and **Figure 6E**). We observe a concentration-dependent – while this dependence progressively deviates from linearity – increase of the fluorescence signal till a concentration of 100 μ M and thereafter, an important loss of the fluorescence signal for all compounds including the dye alone, revealing the self-quenching potential of the TAMRA dye at high concentrations. A significantly stronger quenching effect is observed with *WRAP5-iCAL36 compared to the TAMRA dye alone or to *Tat-iCAL36, indicating that while quenching of the TAMRA probe can happen for any TAMRA-labelled peptide, quenching efficiency is probably affected by the peptide sequence.

These results show that *CPP-iCAL36 are prone to TAMRA self-quenching when they are locally concentrated. The observed fluorescence decrease is accompanied by a red shift of the wavelength of maximal fluorescence emission, which is characteristic of a Förster resonance energy transfer (FRET) phenomenon[32]. π -stacking interactions between an excited fluorophore and one (or several) ground-state analog(s) lead to self-association of the probes and the formation of an excimer displaying dose-dependent red fluorescence shift[33,34].

At the outer plasma membrane, positively-charged CPPs strongly interact with extracellular membrane-associated anionic constituents (phospholipids, proteoglycans, etc.): the resulting CPP accumulation could facilitate short-range dye/dye interactions, leading to a case of template-directed excimer formation such as exploited by Van Arman and Czarnik[35]. This phenomenon would result in quantitative quenching of the dye-labeled peptide at the outside of plasma membrane, such as reported by Swiecicki *et al*[36].

However, TAMRA self-quenching cannot fully explain the discrepancies between flow cytometry and fluorescence spectroscopy for *C6M1-iCAL36 and *WRAP5-iCAL36 as: a) *WRAP5-iCAL36 is partly visible in CLSM and b) for these two methods the externally-sticking peptides are removed from the membrane by trypsinization.

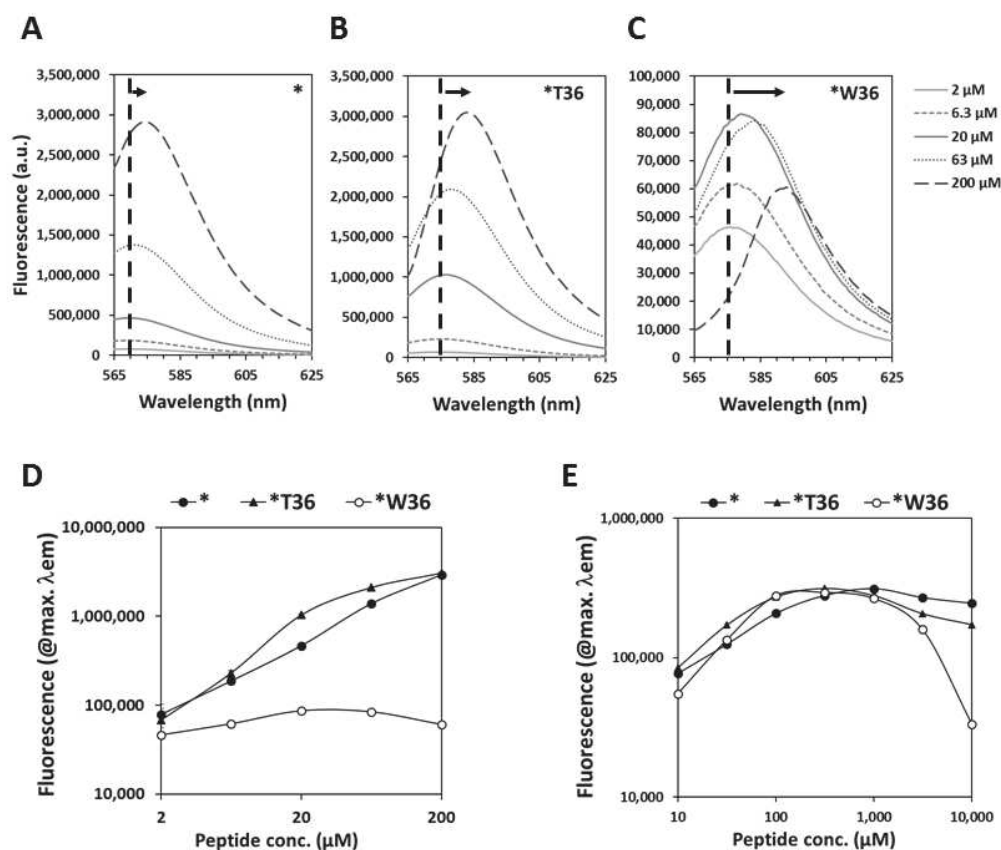


Figure 6. Evaluation of the TAMRA dye properties depending on the peptide concentration.

Representative fluorescence spectra of TAMRA alone (A), TAMRA labelled Tat-iCAL36 (B) and WRAP5-iCAL36 (C) measured in a dose-dependent manner (2 μM to 200 μM diluted in H_2O). When the fluorescence values of the maximal emission wavelength are plotted *versus* the peptide concentration (D), the fluorescence signal increase in a nearly linear dose-dependent manner for TAMRA and *Tat-iCAL36 till the highest concentration whereas the signal started to decrease at 63 μM for *WRAP5-36.

(E) Same experiments were repeated with both CPP-peptides diluted in DMSO to obtain higher concentrations (from 10 μM to 10 mM) (See also **Figure S1**). In this case, the fluorescence signal increase in a non-linear manner till a concentration of 100 μM and decrease significantly afterwards, underlining strong quenching of the TAMRA dye.

Graphs (A, B and C) represent the mean of 2 independent experiments. * indicates the TAMRA alone or TAMRA-peptide labeling. 36 = iCAL36, T36 = Tat-iCAL36 and W36 = WRAP5-iCAL36. Dotted line correspond to the fluorescence emission at the highest wavelength (max λ_{em}) for each compound at 10 μM and the arrow showed the red shift.

3.7. Interaction of the TAMRA-CPP-iCAL36 conjugates with lipidic membranes

Both TAMRA-labelled CPP-iCAL36 peptides showing an overestimated fluorescence value during fluorescence spectroscopy measurements even after a 10 min trypsinization step (**Figure 1D** and **Figure 4B**) are conjugated to a secondary amphipathic CPP, and are located at or in the cell membrane as clearly revealed by CLSM (**Figure 5**).

Assuming that during the trypsinization step all extra-cellular proteins are cleaved and washed out from the cell membranes together with externally-sticking *CPP-iCAL36 conjugates, we hypothesized that a fraction of peptide is still remaining between the lipid bilayers, and that a quenching phenomenon would prevent its

detection by flow cytometry. To consolidate this hypothesis, we incubated Caco-2 cells with the TAMRA-labelled peptides for 1.5 h followed by a 10 min trypsinization step. After centrifugation and cell suspension in a Tris buffer, the samples were analyzed by quantitative fluorescence spectroscopy, either directly from intact cell pellets or after the addition of lysis buffer (**Figure 7A**). Fluorescence values for the intact cells (without lysis buffer = w/o LB) were only normalized to *iCAL36 whereas lyzed cells (with LB) were corrected with the corresponding correction factors as described above (**Figure 4B**) then normalized to *iCAL36. For the *Tat-iCAL36 and *MPG-iCAL36 peptides, we obtained nearly the same fluorescence intensity for both measured conditions. In contrast, we obtain a 5-fold and 7-fold higher fluorescence signal from the lyzed cell pellet incubated with *C6M1-iCAL36 and *WRAP5-iCAL36 as for the non-treated one. This result seems to highlight a more important liberation of the TAMRA-labelled secondary amphipathic CPP-iCAL36 conjugates out of the lipid bilayer giving rise to a fluorescence recovery event of the TAMRA dye. The strong interaction with lipid bilayers was confirmed by a leakage assay as exemplified for the secondary amphipathic peptide WRAP5-iCAL36 compared to Tat-iCAL36 or iCAL36 alone (**Figure 7B**). Large unilamellar vesicles (LUV) encapsulating a quencher and fluorescence dye (no signal detectable) were incubated with the three peptides during a certain period. If a peptide is able to transiently destabilize the lipid membrane the fluorescence dye can escape from the LUVs resulting in an increase in measured fluorescence intensity. This is exactly observed for WRAP5-iCAL36 with a leakage of 85.6% at the endpoint of the measurement, reflecting the high efficacy of WRAP5-iCAL36 to interact with lipid membrane models and thus likely with cell membranes.

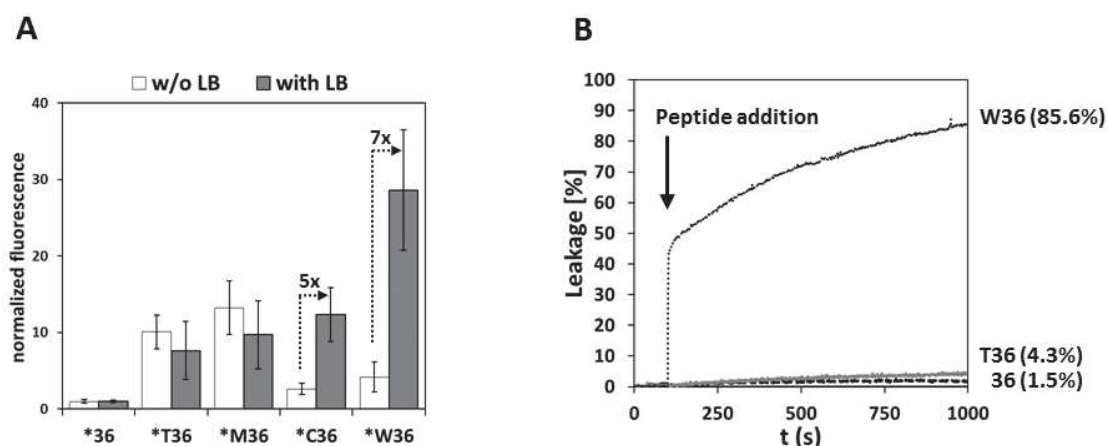


Figure 7: Evaluation of the membrane interaction of the TAMRA-labelled CPP-iCAL36 conjugates.

(A) Analysis of the TAMRA dye alone as well as the indicated TAMRA-labelled peptide at the cellular membrane. Caco-2 cells were incubated with the different compounds for 1.5 h following by a trypsinization step (10 min). Fluorescence intensities of the intact (w/o LB) and lyzed (with LB) cell pellets were measured by fluorescence spectroscopy.

* indicates TAMRA-peptide labeling. 36 = iCAL36, T36 = Tat-iCAL36, M36 = MPG-iCAL36, C36 = C6M1-iCAL36 and W36 = WRAP5-iCAL36. LB corresponds to "lysis buffer".

(B) Comparison of the leakage properties of iCAL36, Tat-iCAL36 and WRAP5-iCAL36 on LUVs [DOPC/SM/Chol (2:2:1)] encapsulating a quencher and a fluorescence dye. Peptides were injected at 100 s and the Triton (positive control = 100% leakage) at 1000 s ($n \geq 2$).

3.8. Membrane proteins but not membrane lipids can quench TAMRA-labelled peptides

The environment of the TAMRA-labelled peptides could be influenced by the cell membrane lipids, which could induce potential quenching of the dye when it is inserted in the bilayer. When cells are lysed for fluorescence spectroscopy measurement, the TAMRA-labelled peptides would be released from the bilayer,

resulting in a now detectable fluorescence. To give some evidence concerning this hypothesis, we incubated the TAMRA dye alone, *Tat-iCAL36 and *WRAP5-iCAL36 with increasing equivalents of LUVs mimicking the lipid composition of cell membranes (**Figure 8A-C**). For the first two conditions, we observe nearly no changes in the fluorescence intensity maxima. Using the *WRAP5-iCAL36 peptide, we could not measure the expected lipid-based quenching of the TAMRA dye, while a slight increase (1.3-fold) of the fluorescence values was revealed after lipid addition. This is in agreement with the previous results showing a conformational change of WRAP5-iCAL36 in the presence of SDS or LUV: it is likely that both could disrupt *WRAP5-iCAL36 intramolecular interactions, and especially intramolecular TAMRA/tryptophan interactions, and provoke a TAMRA fluorescence recovery (**Figure 3**). These results invalid our hypothesis that membrane lipids could quench *CPP-iCAL36 fluorescence.

However, besides its lipid content the cell membrane is composed of various transmembrane (TM) proteins which are particularly enriched in tryptophan residues[37,38]. The versatile molecular properties of those residues play an important role in membrane protein folding and stability: tryptophan has the largest nonpolar surface area, is the most polarizable residue, possesses an indole N-H moiety that is capable of hydrogen bond donation, and displays the greatest electrostatic potential for cation- π interactions[39]. However, beside these important roles, it has been shown that the fluorescence intensity of some fluorescence dyes such as fluorescein or TAMRA is substantially quenched by the proximity of tryptophan residues[40]: this property has notably been applied to the development of “quenchbodies”, antibodies involving an intramolecular TAMRA/tryptophan quenching which is abolished upon presentation of its antigen[41]. A hypothesis would be that fluorescence quenching happens inside the lipid bilayer at the contact of TM proteins, hence explaining why quenching could be observed for *C36 and *W36 (membrane-inserting peptides) and not for *T36 and *M36 (no membrane insertion). To highlight the potential effect of membrane tryptophan on *CPP-iCAL36 fluorescence, we titrated the TAMRA dye as well as *Tat-iCAL36 and *WRAP5-iCAL36 with increase concentrations of tryptophan as a simple model for tryptophan-rich TM proteins (**Figure 8D-F**). For the TAMRA dye and the *Tat-iCAL36 peptide, we could observe a dose-dependent decrease of the fluorescence intensity with 4-fold lower values at the highest tryptophan concentration (50 mM) compared to the starting condition without tryptophan. Curiously, we detect another pattern for the *WRAP5-iCALP36 peptide in the presence of increasing tryptophan concentration: first the fluorescence intensity increase with 0.5 mM tryptophan to a 1.4-fold higher value, then a successive scale-down is visible, reaching a 2.8 lower value at 50 mM tryptophan compared to the peptide alone. Here, we are probably observing two connected events corresponding to a peptide structuration resulting in better accessibility of the dye ($\uparrow$ fluorescence) and to TAMRA/tryptophan quenching ($\downarrow$ fluorescence). Interestingly, no red shift of the fluorescence maximum is observed, further confirming that the quenching mechanism differs from TAMRA self-quenching and would not be based on peptide proximity inside the lipid bilayer. These results confirm the likeliness of a TAMRA/tryptophan quenching happening in the lipid bilayer.

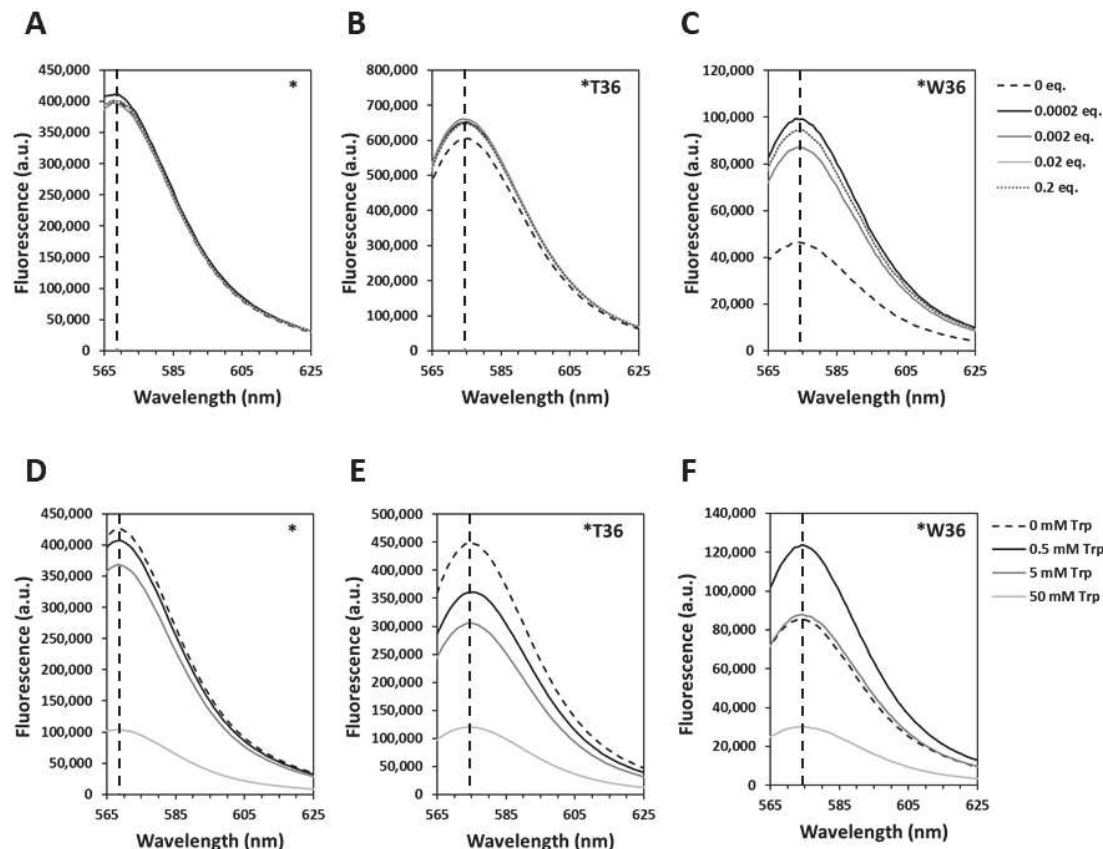


Figure 8. Effect of the addition of phospholipid vesicles or tryptophan on the fluorescence of the TAMRA residue.

(A - C) 0.5 μ M TAMRA or *CPP-iCAL36 were titrated by increasing LUV [DOPC/SM/Chol (2:2:1)] molar equivalents (0.0002 eq. - 0.02 eq.).

(D - E) 0.5 μ M TAMRA or *CPP-iCAL36 were titrated by increasing tryptophan concentrations (0.5 mM - 50 mM).

In all conditions, TAMRA fluorescence was excited at 553 nm and the emission spectrum was recorded between 565 nm and 625 nm. Graphs represent the mean of $n \geq 2$ independent experiments.

4. CONCLUSION

In the present work, we have highlighted that significantly diverging results can be obtained with different fluorescence techniques during intracellular uptake quantification of rhodamine-labeled CPP-conjugates (see **Figure 9**). In particular, tryptophan-rich CPPs can undergo both intramolecular and intermolecular dye/tryptophan interactions, consequently influencing the fluorescence intensity of the labeled peptide and biasing in the estimation of the cellular uptake.

First, within the peptide sequence, intramolecular interactions and dye/tryptophan π -stacking can affect peptide structuration and dye environment, resulting in a fluorescence quenching in Tris buffer. However, this quenching is abolished in lysis buffer upon addition of detergents, which refolds the peptide thus preventing dye/tryptophan intramolecular interactions and enhancing peptide fluorescence. While no direct effect of the detergents on the dye alone is observed, for several TAMRA-CPP-iCAL36 peptides the presence of detergents

seem to further increase peptide fluorescence. In this sense, the detergent content of lysis buffers can induce overestimated fluorescence spectroscopy values. To circumvent this bias, we reported the use of standard fluorescence curves, allowing to compare the intrinsic fluorescence of TAMRA-labeled peptide either with or without detergents and to use the resulting coefficients for value normalization.

The analysis of the cellular localization of TAMRA-CPP-iCAL36 peptides by CLSM first raised surprising concerns, as peptide signal could only be observed in the membrane region for *C6M1-iCAL36 and *WRAP5-iCAL36 and not for *Tat-iCAL36 and *MPG-iCAL36, while all positively-charged peptides are known to strongly interact with the external membrane proteins. We subsequently explained this result by proving that TAMRA-labeled CPP-conjugates undergo dye self-quenching and red shift of their fluorescence spectra when they are locally concentrated, such as at the outer cell surface where their tethering by the negatively-charged external membrane content increase their likeliness of interaction. This phenomenon prevents the observation of membrane-bound *Tat-iCAL36 and *MPG-iCAL36 in CLSM, as observed by Swiecicki *et al* for other CPPs[36]. For both tested secondary amphipathic CPPs, self-assembly have been observed with the unlabeled peptides (data not shown) probably because of peptide/peptide side chain interactions introducing conformational constraints and likely restricting the possibility of dye/dye interaction. This fact, and the intra-membrane localization of those peptides, may explain why some peptide signal is visible in the vicinity of the plasma membrane.

Finally, we demonstrated that dye-labeled CPP-conjugates that are capable of membrane insertion (typically, secondary amphipathic peptides) can be sequestered in the cell membrane by stabilizing peptide/lipid interactions and π -stacking interactions between the tryptophan content of transmembrane proteins and the CPP dye. In the latter case, TAMRA/tryptophan interactions also result in the quenching of *CPP-iCAL36 fluorescence. These interactions are abolished after membrane solubilization by detergents, and lead to an overestimation of the measured fluorescence which takes into account both cytosolic and intramembranar peptide.

Dye/tryptophan quenching phenomena are encountered for a variety of fluorescent probes apart from TAMRA[42], underlining the importance of our findings. All these results underline the need of careful multi-method analysis of CPP uptake, especially when detergents-based buffers are involved. As CLSM does not allow the visualization of intramembranar CPP fraction, the uptake of amphipathic CPPs presenting lipid membrane interaction should always be compared by several fluorescence-based methods (fluorescence spectroscopy, flow cytometry and CLSM) to avoid an overestimation of the cellular internalization.

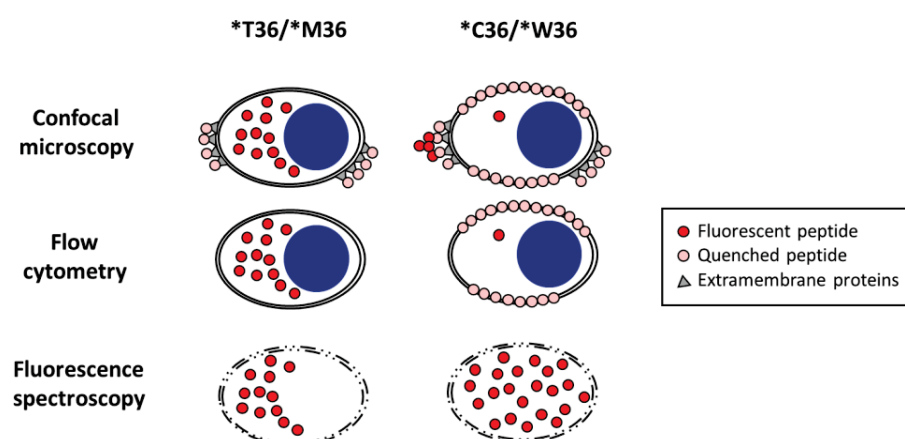


Figure 9. Model reflecting the discrepancies observed between CLSM, flow cytometry and fluorescence spectroscopy for the uptake of *CPP-iCAL36.

In confocal microscopy, both cytosolic and, if present, self-associated external peptide are visible. In flow cytometry, only cytosolic signal is quantified. In fluorescence spectroscopy, cytosolic signal and, if present, membrane-inserted peptide is quantified.

REFERENCES

- [1] J. Pae, M. Pooga, Peptide-mediated delivery: an overview of pathways for efficient internalization, *Ther. Deliv.* 5 (2014) 1203–1222. doi:10.4155/tde.14.72.
- [2] K. Cleal, L. He, P.D. Watson, A.T. Jones, Endocytosis, intracellular traffic and fate of cell penetrating peptide based conjugates and nanoparticles, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 2878–2894.
- [3] L.N. Patel, J.L. Zaro, W.-C. Shen, Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1977–1992. doi:10.1007/s11095-007-9303-7.
- [4] D. Derossi, A.H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 10444–10450.
- [5] M. Green, P.M. Loewenstein, Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein, *Cell.* 55 (1988) 1179–1188.
- [6] A.D. Frankel, C.O. Pabo, Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus, *Cell.* 55 (1988) 1189–1193.
- [7] A.T. Jones, E.J. Sayers, Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 161 (2012) 582–591. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.003.
- [8] W.B. Kauffman, T. Fuselier, J. He, W.C. Wimley, Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides, *Trends Biochem. Sci.* 40 (2015) 749–764. doi:10.1016/j.tibs.2015.10.004.
- [9] G. Guidotti, L. Brambilla, D. Rossi, Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics, *Trends Pharmacol. Sci.* 38 (2017) 406–424. doi:10.1016/j.tips.2017.01.003.
- [10] F. Milletti, Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape, *Drug Discov. Today.* 17 (2012) 850–860. doi:10.1016/j.drudis.2012.03.002.
- [11] J.D. Ramsey, N.H. Flynn, Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells, *Pharmacol. Ther.* 154 (2015) 78–86. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.07.003.
- [12] A.D. Woldetsadik, M.C. Vogel, W.M. Rabeh, M. Magzoub, Hexokinase II-derived cell-penetrating peptide targets mitochondria and triggers apoptosis in cancer cells, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31 (2017) 2168–2184. doi:10.1096/fj.201601173R.
- [13] M. Gomarasca, T.F.C. Martins, L. Greune, P.R. Hardwidge, M.A. Schmidt, C. Rüter, Bacterial-derived cell-penetrating peptides deliver gentamicin to kill intracellular pathogens, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2017) AAC.02545-16. doi:10.1128/AAC.02545-16.
- [14] J.P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M.J. Gait, L.V. Chernomordik, B. Lebleu, Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 585–590. doi:10.1074/jbc.M209548200.
- [15] D. Birch, M.V. Christensen, D. Staerk, H. Franzyk, H.M. Nielsen, Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide induces differential effects on its cellular distribution and affects cell viability, *Biochim. Biophys. Acta.* 1859 (2017) 2483–2494. doi:10.1016/j.bbamem.2017.09.015.
- [16] L. Vouilleme, P.R. Cushing, R. Volkmer, D.R. Madden, P. Boisguerin, Engineering peptide inhibitors to overcome PDZ binding promiscuity, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 49 (2010) 9912–9916. doi:10.1002/anie.201005575.

- [17] P.R. Cushing, L. Vouilleme, M. Pellegrini, P. Boisguerin, D.R. Madden, A stabilizing influence: CAL PDZ inhibition extends the half-life of $\Delta F508$ -CFTR, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 49 (2010) 9907–9911. doi:10.1002/anie.201005585.
- [18] E. Vivès, P. Brodin, B. Lebleu, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16010–16017.
- [19] J. Mueller, I. Kretzschmar, R. Volkmer, P. Boisguerin, Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 2363–2374. doi:10.1021/bc800194e.
- [20] J. Müller, J. Triebus, I. Kretzschmar, R. Volkmer, P. Boisguerin, The agony of choice: how to find a suitable CPP for cargo delivery, *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* 18 (2012) 293–301. doi:10.1002/psc.2396.
- [21] M. Jafari, W. Xu, S. Naahidi, B. Chen, P. Chen, A new amphipathic, amino-acid-pairing (AAP) peptide as siRNA delivery carrier: physicochemical characterization and in vitro uptake, *J. Phys. Chem. B.* 116 (2012) 13183–13191. doi:10.1021/jp3072553.
- [22] G.T. Dempsey, J.C. Vaughan, K.H. Chen, M. Bates, X. Zhuang, Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging, *Nat. Methods.* 8 (2011) 1027–1036. doi:10.1038/nmeth.1768.
- [23] N.O. Mchedlov-Petrosyan, V.V. Ivanov, Effect of the solvent on the absorption spectra and protonation of fluorescein dye anions, *Russ. J. Phys. Chem.* 81 (2007) 112–115. doi:10.1134/S0036024407010219.
- [24] A. Vaissière, G. Aldrian, K. Konate, M.F. Lindberg, C. Jourdan, A. Telmar, Q. Seisel, F. Fernandez, V. Viguier, C. Genevois, F. Couillaud, P. Boisguerin, S. Deshayes, A retro-inverso cell-penetrating peptide for siRNA delivery, *J. Nanobiotechnology.* 15 (2017) 34. doi:10.1186/s12951-017-0269-2.
- [25] M.J. Doughty, pH dependent spectral properties of sodium fluorescein ophthalmic solutions revisited, *Ophthalmic Physiol. Opt.* 30 (2010) 167–174. doi:10.1111/j.1475-1313.2009.00703.x.
- [26] M. Longmire, M. Ogawa, Y. Hama, N. Kosaka, C.A.S. Regino, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Determination of Optimal Rhodamine Fluorophore for In Vivo Optical Imaging, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 1735–1742. doi:10.1021/bc800140c.
- [27] F. Illien, N. Rodriguez, M. Amoura, A. Joliot, M. Pallerla, S. Cribier, F. Burlina, S. Sagan, Quantitative fluorescence spectroscopy and flow cytometry analyses of cell-penetrating peptides internalization pathways: optimization, pitfalls, comparison with mass spectrometry quantification, *Sci. Rep.* 6 (2016) 36938. doi:10.1038/srep36938.
- [28] S. Deshayes, S. Gerbal-Chaloin, M.C. Morris, G. Aldrian-Herrada, P. Charnet, G. Divita, F. Heitz, On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1667 (2004) 141–147. doi:10.1016/j.bbamem.2004.09.010.
- [29] E. Eiríksdóttir, K. Konate, Ü. Langel, G. Divita, S. Deshayes, Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1798 (2010) 1119–1128. doi:10.1016/j.bbamem.2010.03.005.
- [30] C. Aisenbrey, B. Bechinger, Molecular Packing of Amphipathic Peptides on the Surface of Lipid Membranes, *Langmuir.* 30 (2014) 10374–10383. doi:10.1021/la500998g.
- [31] A. Shiba, E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, T. Koike, TAMRA/TAMRA Fluorescence Quenching Systems for the Activity Assay of Alkaline Phosphatase, *Sensors.* 17 (2017). doi:10.3390/s17081877.

- [32] Y.H. Park, Y. Kim, H. Sohn, K.-S. An, Concentration quenching effect of organic light-emitting devices using DCM1-doped tetraphenylgermole, *J. Phys. Org. Chem.* 25 (2012) 207–210. doi:10.1002/poc.1893.
- [33] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer US, 2006. [//www.springer.com/gp/book/9780387312781](http://www.springer.com/gp/book/9780387312781).
- [34] W. Wang, J.J. Han, L.-Q. Wang, L.-S. Li, W.J. Shaw, A.D.Q. Li, Dynamic π - π Stacked Molecular Assemblies Emit from Green to Red Colors, *Nano Lett.* 3 (2003) 455–458. doi:10.1021/nl025976j.
- [35] S.A. Van Arman, A.W. Czarnik, A general fluorescence assay for enzyme catalyzed polyanion hydrolysis based on template directed excimer formation. Application to heparin and polyglutamate, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 5376–5377. doi:10.1021/ja00169a070.
- [36] J.-M. Swiecicki, F. Thiebaut, M. Di Pisa, S. Gourdin -Bertin, J. Tailhades, C. Mansuy, F. Burlina, S. Chwetzoff, G. Trugnan, G. Chassaing, S. Lavielle, How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides, *Sci. Rep.* 6 (2016) 20237. doi:10.1038/srep20237.
- [37] M. Schiffer, C.H. Chang, F.J. Stevens, The functions of tryptophan residues in membrane proteins, *Protein Eng.* 5 (1992) 213–214.
- [38] K.M. Sanchez, G. Kang, B. Wu, J.E. Kim, Tryptophan-lipid interactions in membrane protein folding probed by ultraviolet resonance Raman and fluorescence spectroscopy, *Biophys. J.* 100 (2011) 2121–2130. doi:10.1016/j.bpj.2011.03.018.
- [39] J.P. Gallivan, D.A. Dougherty, Cation- π interactions in structural biology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 9459–9464.
- [40] N. Marmé, J.-P. Knemeyer, M. Sauer, J. Wolfrum, Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 1133–1139. doi:10.1021/bc0341324.
- [41] R. Abe, H. Ohashi, I. Iijima, M. Ihara, H. Takagi, T. Hoshika, H. Ueda, “Quenchbodies”: quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 17386–17394. doi:10.1021/ja205925j.
- [42] S.E. Mansoor, M.A. Dewitt, D.L. Farrens, Distance mapping in proteins using fluorescence spectroscopy: the tryptophan-induced quenching (TriQ) method, *Biochemistry (Mosc.)* 49 (2010) 9722–9731. doi:10.1021/bi100907m.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Institutes of Health (5R01DK101541), the foundation “Vaincre la Mucoviscidose” (RF20170502030/1/1/47) and the foundation “Fonds de Recherche en Santé Respiratoire / Fondation du Souffle (2017)”. Peptide synthesis was performed with excellent technical support of the Synbio3 platform, which is supported by ITMO Cancer (Plan Cancer 2014-2019). We acknowledge the imaging facility MRI, member of the national infrastructure France-Biolmaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, “Investments for the future”).

Supplemental Information:

How to evaluate the cellular uptake of CPPs with fluorescence techniques: dissecting methodological pitfalls associated to tryptophan-rich peptides.

Quentin Seisel, Sébastien Deshayes, Prisca Boisguerin

Centre de Recherche de Biologie cellulaire de Montpellier, CNRS UMR 5237, Université Montpellier, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS:

Peptide synthesis:

Peptide synthesis was performed by LibertyBlue™ Microwave Peptide Synthesizer (CEM Corporation), an additional module of Discover™ (CEM Corporation) combining microwave energy at 2450 MHz to the fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)/*tert*-butyl (tBu) strategy. If not otherwise mentioned, all chemicals were purchased by Sigma-Aldrich or Carlo Erba.

Syntheses were conducted on a 0.25 mmol scale on a Fmoc-Ile-Wang resin (Bachem). Deprotections were performed with 20% piperidine in DMF. All coupling reactions were performed with 5 eq. of DIC in DMF (0.5 M), 5 eq. of Fmoc-protected amino acids in DMF (0.2 M) and 5 eq. of Oxyma in DMF (1 M). Each deprotection and coupling reaction were performed under microwave energy and nitrogen bubbling. Microwave cycle was characterized by one deprotection step for 60 s at 90°C, three successive washings with 5 mL DMF followed by a double 120 s coupling at 90°C. After peptide assembly, the peptide-resin was washed with DMF and CH₂Cl₂.

TAMRA labelling of the peptide was performed by overnight coupling with 1.5 eq. 5(6)-carboxytetramethylrhodamine (Novabiochem), 1.6 eq. HATU and 2 eq. DIEA (Merck) in DMF, then washing with DMF and CH₂Cl₂.

Peptide cleavage from the resin and deprotection of the amino acids side chains were carried out with TFA/H₂O/TIS solution (94:3:3 v/v/v) for 3 h at room temperature. The resins were washed with TFA and the filtrates were partially evaporated. Crude peptides were precipitated with cold diethyl ether, collected by centrifugation, dissolved in H₂O/CH₃CN then lyophilized.

Products were purified by preparative RP-HPLC (Gilson, model PLC 2050 equipped with a diode array detector, Waters) using a Atlantis Prep T3 OBD (5 µm, 100 x 19 mm) column (Waters) at 20 mL/min. Peptide identity and purity was checked by LC-MS (Waters). In both cases the solvent system used was: A (0.1 % TFA in H₂O) and B (0.1 % in CH₃CN).

Liposome preparation:

The following lipids (Avanti Polar Lipids) were used to mimic plasma membrane composition: dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) / sphingomyeline (SM) / cholesterol (Chol) (4:4:2; mol/mol/mol). Lipids were dissolved in a 3:1 chloroform/methanol mixture (v/v) at a stock concentration of 25 mg/mL and gently mixed. Lipids were mixed in a round-bottom flask then large unilamellar vesicles (LUV) were prepared by removing organic solvent (evaporation under vacuum for 45-60 min at 80°C).

For TAMRA-LUV quenching: The lipids were hydrated in milliQ water. The suspension was vigorously agitated with a Vortex (30 s), freeze-thawed 5 times and then extruded 21 times through two stacked 100 nm polycarbonate filters (Nucleopore, Whatman).

For leakage assay: The lipids were hydrated in a buffer (20 mM HEPES, 75 mM NaCl, pH 7.4) containing 12.5 mM ANTS fluorescent dye (8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid, disodium salt; Invitrogen) together with 45 mM DPX quencher (*p*-xylene-bispyridinium bromide; Invitrogen). The suspension was vigorously agitated with a Vortex (30 s), freeze-thawed 5 times and then extruded 21 times through two stacked 100 nm polycarbonate filters. Free dye and quencher were removed by gel filtration on a PD-10 desalting column (Amersham Biosciences).

LUV concentration was assessed using the LabAssay Phospholipid kit (Wako) as described by the manufacturer and LUV mean size was confirmed by dynamic light scattering (NanoZS, Malvern).

SUPPLEMENTAL FIGURES:

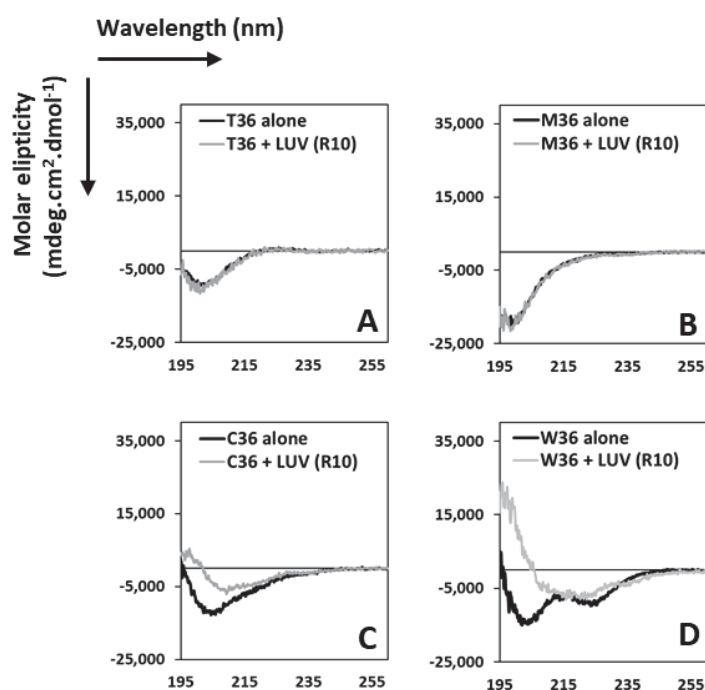


Figure S1. Characterization of the CPP-iCAL36 conformational changes in the presence of LUVs.

Far-UV CD spectra of Tat-iCAL36 (A), MPG-iCAL36 (B), C6M1-iCAL36 (C) and WRAP5-iCAL36 (D) were measured in the absence (black line) or in the presence of LUVs (molar ratio of 10) (grey line).

Secondary structures of Tat-iCAL36 and MPG-iCAL36 are not changed based on LUV addition, whereas the secondary structures of C6M1-iCAL36 and WRAP5-iCAL36 are shifted to a higher amount of alpha helical components.

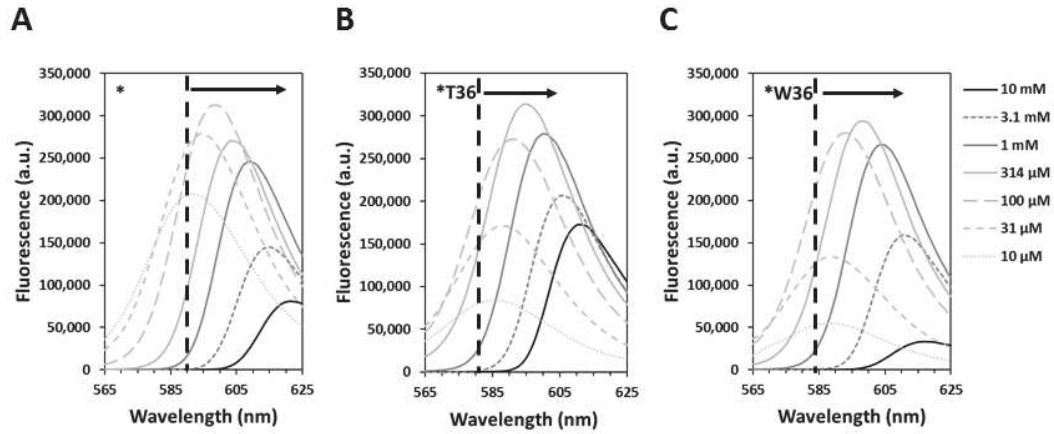


Figure S2. Evaluation of the TAMRA dye properties depending on the peptide concentration.

Representative fluorescence spectra of TAMRA dye alone (A), TAMRA labelled Tat-iCAL36 (B) and WRAP5-iCAL36 (C) measured at concentrations between 10 μ M and 10 mM.

Graphs (A, B and C) represent the mean of 2 independent experiments. * indicates the TAMRA dye alone and TAMRA-peptide labeling. T36 = Tat-iCAL36 and W36 = WRAP5-iCAL36. Dotted line correspond to the fluorescence intensity maxima for each compound at 10 μ M and the arrow showed the red shift.

Chapitre 4

-

Optimisation de l'internalisation cellulaire du peptide iCAL36 à l'aide de peptides vecteurs (CPP)

4.1. Introduction

La vectorisation intracellulaire du peptide iCAL36 (ANSRWPTSII) a tout d'abord été réalisée par le vecteur lipidique BioPorter (commercialisé par Sigma-Aldrich), mais des doses conséquentes de peptide inhibiteur ont été nécessaires pour observer un effet thérapeutique. Comme mentionné précédemment, les peptides vecteurs (CPP) constituent l'une des stratégies non-virales les plus prometteuses pour la vectorisation de peptides. Ils sont donc envisageables pour la vectorisation du peptide iCAL36, en tant que substitut au BioPorter.

De précédents résultats de l'équipe ont démontré la possibilité de vectoriser des peptides iCAL à l'aide de CPP. Une première étude de Müller *et al* a observé que la vectorisation d'iCAL35 (ANSRWQTSII) par MPG-NH₂ (fonctionnalité C-terminale amidée) par stratégie non-covalente a permis d'augmenter la délivrance d'iCAL35 dans des cellules Cos-7 d'un facteur 3,5²⁵³. Par la suite, la vectorisation des peptides iCAL36 et d'iCAL42 par MPG ou la pénétratine (Pen) par stratégie covalente a permis d'observer une efficacité de transfection multipliée par 50-100²⁸⁷, prouvant l'efficacité supérieure de cette stratégie pour la vectorisation de peptides iCAL. Les deux conjugués CPP-iCAL36 correspondants, MPG-iCAL36 (M36) et Pen-iCAL36 (P36), ont présenté des résultats encourageants notamment en termes d'activité biologique : en particulier, une hausse de 21% de l'efflux de chlorure a été observée sur des cellules CFBE-ΔF traitées par 100 μM de P36, ce qui est à comparer aux 11% d'augmentation obtenus avec 500 μM du peptide iCAL36 vectorisé par BioPorter¹⁶⁶.

Afin de poursuivre l'exploration de cette approche et d'améliorer encore ces résultats, nous avons décidé d'étendre le champ des CPP utilisés. En particulier, l'usage de CPP constitués d'acides aminés en isoforme D (AAD) pourrait mener à une meilleure résistance du peptide aux protéases. Employer des CPP capables de translocation directe pourrait également prévenir les risques de piégeage dans les endosomes et augmenter la quantité cytosolique de conjugué CPP-iCAL36.

4.1.1. Choix des CPP utilisés pour vectoriser le peptide iCAL36

Dans le cadre de nos travaux, iCAL36 est associé à divers CPP par une liaison chimique covalente entre l'extrémité N-terminale du peptide iCAL36 et l'extrémité C-terminale du CPP (H-CPP-iCAL36-OH, noté CPP-iCAL36). Pour permettre la quantification du peptide par mesure de fluorescence, les conjugués CPP-iCAL36 ont été marqués par la sonde TAMRA sur la partie N-terminale du peptide, conservant l'extrémité C-terminale libre pour l'interaction avec le domaine PDZ de la protéine CAL. Les conjugués CPP-iCAL36 choisis pour cette étude sont présentés dans le **Tableau 4.1**. Ces séquences ont été choisies de façon à pouvoir couvrir les différentes classes de CPP en termes d'amphipathicité, mais également en fonction de paramètres spécifiques tels leur mécanisme d'internalisation ou leur capacité à résister aux protéases.

- **Tat**¹⁹⁹ est probablement le CPP le plus utilisé pour la vectorisation de peptides thérapeutiques, nous avons donc choisi de l'intégrer dans le panel de CPP utilisés pour vectoriser iCAL36. Dans le but de développer des conjugués CPP-iCAL36 plus résistants aux protéases, l'énantiomère D de Tat (dTat)²⁸⁸ et sa

version *retro-inverso* (TRI)²⁸⁹ ont également été inclus : dans ce dernier cas, la séquence de Tat et l'orientation des chaînes latérales sont inversées, ce qui permet aux chaînes latérales de TRI de conserver une topologie similaire à celle de Tat tout en augmentant la stabilité métabolique du peptide.

- Les peptides **MPG** (amphipathique primaire, CPPap) et **Pénétratine** (non-amphipathique, CPPna) ont été précédemment reconnus comme étant efficaces pour le transfert d'iCAL36 dans la cellule^{166,287}, et sont donc choisis en tant que contrôles positifs.

- Enfin, les peptides **C6M1**²²⁹ et **WRAP5** sont respectivement issus des travaux de Jafari *et al* et des nôtres. Ce sont des CPP amphipathiques secondaires (CPPas) capables de former des nanoparticules en présence d'oligonucléotide et de pénétrer la cellule par un mécanisme indépendant de l'endocytose. Il est possible que cette propriété soit maintenue une fois la séquence du peptide iCAL36 couplée à l'extrémité C-terminale du CPP, ce qui permettrait d'obtenir des CPP-iCAL36 capables d'éviter un éventuel piégeage par les endosomes.

4.1.2. Objectifs du chapitre

A terme, les conjugués CPP-iCAL36 seront testés sur des épithéliums reconstitués à partir de cellules nasales de patients CF porteurs de la mutation p.Phe508del, cultivées en interface air-liquide (ALI). Ce modèle cellulaire reflète les conditions physiologiques p.Phe508del-CFTR des patients, mais il est également très fastidieux et donc inadapté à un premier criblage de composés thérapeutiques. Avant d'atteindre ce stade, il est nécessaire d'identifier les conjugués CPP-iCAL36 sur un système modèle plus flexible. Nous avons choisi d'utiliser des cultures adhérentes de cellules Caco-2 et Calu-3 pour étudier l'efficacité d'internalisation des conjugués CPP-iCAL36 : il s'agit de cellules épithéliales humaines exprimant CFTR, capables de former un épithélium semblable à celui des cellules nasales issues de patients CF.

Différents CPP ont été couplés au peptide iCAL36 et engagés dans divers essais visant à évaluer leur efficacité en tant que vecteur d'iCAL36 sur des cellules Caco-2 et Calu-3. Dans un premier temps, leur cytotoxicité a été quantifiée, puis leur efficacité d'internalisation a ensuite été évaluée par cytométrie de flux et par microscopie confocale. Le criblage a été poursuivi par des transfections des conjugués CPP-iCAL36 en présence de sérum afin de mimer de façon simple le milieu encombré du mucus des patients CF : cette étude permet d'évaluer quels seraient les CPP-iCAL36 les plus à même d'avoir une activité *in vivo*. L'efficacité de transfection des CPP-iCAL36 optimaux a pour finir été confirmée sur des cellules bronchiales de patients p.Phe508del (CFBE41o-), prouvant que leur potentiel d'internalisation n'est pas spécifique des deux lignées Caco-2 et Calu-3.

A l'issue de ce criblage, les conjugués CPP-iCAL36 les plus efficaces ont été caractérisés *in vitro* et *in cellulo*. En particulier, leur affinité et leur sélectivité pour CALP a été vérifiée en comparaison au peptide iCAL36 seul, puis leur structuration et leur mécanisme d'internalisation ont été analysés.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Synthèse peptidique et solubilisation des peptides

La synthèse et la mise en solution des peptides CPP-iCAL36 marqués ou non par la 5(6)-carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA, noté *) ont été réalisées suivant les protocoles décrits dans le chapitre 3 (*Peptide synthesis* et *Peptide solubilization*).

Tableau 4.1. Séquences et caractéristiques des peptides étudiés.

Sigle	Peptide	Séquence	Masse moléculaire (g/mol)	Nb résidus	Amphipathicité du peptide vecteur
36	iCAL36	ANSRWPTSII	1144,3	10	/
T36	Tat-iCAL36	GRKKRRQRRRPPQ-ANSRWPTSII	2843,6	23	CPPna
dT36	dTat-iCAL36	grkrrrqrrrppq-ANSRWPTSII	2843,6	23	CPPna
TRI36	TRI-iCAL36	qprrrrqrrkrg-ANSRWPTSII	2843,6	23	CPPna
P36	Pen-iCAL36	RQILWFQNRMMKWK-ANSRWPTSII	3358,9	26	CPPna
M36	MPG-iCAL36	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV-ANSRWPTSII	3972,3	37	CPPap
C36	C6M1-iCAL36	RLWRLLWRLWRLLWRLLR-ANSRWPTSII	3772,2	28	CPPas
W36	WRAP5-iCAL36	xxxxxxxxxxxxxx-ANSRWPTSII ^a	3230,9	25	CPPas

^a La séquence de WRAP5 est confidentielle suite à une procédure de dépôt de brevet.

CPPna : CPP non-amphipathique ; CPPap : CPP amphipathique primaire ; CPPas : CPP amphipathique secondaire ; TRI : séquence de Tat en isoforme retro-inverso ; Pen : pénétratine.

4.2.2. Culture cellulaire

Les cellules humaines épithéliales d'adénocarcinome colorectal (Caco-2, HTB-37, ATCC), les cellules humaines d'adénocarcinome pulmonaire (Calu-3, HTB55, ATCC) ainsi que les cellules bronchiales épithéliales issues de patients p.Phe508del (CFBE41o-) sont cultivées de façon analogue au protocole décrit dans le chapitre 3 (*Cell culture*). L'absence de mycoplasmes est régulièrement testée dans toutes les lignées.

4.2.2.1. Cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sont passées une fois par semaine et cultivées dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% CO₂, leur milieu est changé 24 h et 96 h après dissociation avec de la trypsine (0,05%, Life Technologies).

Pour les mesures d'internalisation, 2×10^5 cellules (1 mL) sontensemencées dans des plaques 24 puits pour culture cellulaire (Nunc) et 3×10^5 cellules ($1,5 \times 10^5$ cellules pour la colocalisation avec les marqueurs d'endosomes précoces ou tardifs) sontensemencées dans des boites de microscopie à fond en verre (1 mL, WPI). Pour les mesures d'activité LDH, $1,6 \times 10^4$ cellules (160 µL) sontensemencées dans des plaques 96 puits pour culture cellulaire (Nunc). Dans tous les cas, le milieu est changé après 24 h et les cellules sont utilisées 48 h après ensemencement. Les cellules ont été utilisées à un nombre de passages compris entre 9 et 32.

Milieu complet utilisé : DMEM 4.5 g/L glucose supplémenté par de l'UltraGlutamine (Lonza), 20% de sérum de veau fœtal (FBS, PAA), 1% d'acides aminés MEM non-essentiels, 1% d'antibiotiques pénicilline et streptomycine, 1% de pyruvate de sodium et 1% de bicarbonate de sodium (tous 100x, Life Technologies).

4.2.2.2. Cellules Calu-3

Les cellules Calu-3 sont passées une fois par semaine et cultivées dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% CO₂, leur milieu est changé 24 h et 96 h après dissociation avec de la trypsine (0,05%, Life Technologies).

Pour les mesures d'internalisation, 3×10^5 cellules (1 mL) sontensemencées dans des plaques 24 puits pour culture cellulaire (Nunc) et 3×10^5 cellules sontensemencées dans des boites de microscopie à fond en verre (1 mL, WPI) pré-traités pendant une nuit à 37°C, 5% CO₂ avec une solution de fibronectine de plasma bovin (50 µg/mL, Sigma). Pour les mesures d'activité LDH, $1,6 \times 10^4$ cellules (160 µL) sontensemencées dans des plaques 96 puits pour culture cellulaire (Nunc). Dans tous les cas, le milieu est changé après 24 h et les cellules sont utilisées 48 h après ensemencement. Les cellules ont été utilisées à un nombre de passages compris entre 9 et 35.

Milieu complet utilisé identique à celui des Caco-2.

4.2.2.3. Cellules CFBE41o-

Les cellules CFBE41o- sont passées après 120 h et cultivées dans un incubateur humidifié à 37°C, 5% CO₂, leur milieu est changé 72 h après dissociation avec de la trypsine (0,05%). Les flasques et plaques multi-puits sont pré-traités au moins une heure à température ambiante avec une solution de collagène de type I (Gibco) à 1% dans de l'acide acétique à 0,02 M, puis rincées deux fois avec du D-PBS (Life Technologies) avant d'ensemencer les cellules.

Pour les mesures d'internalisation, 6×10^4 cellules (1 mL) sontensemencées dans des plaques 24 puits pour culture cellulaire (Nunc). Les cellules ont été utilisées à un nombre de passages compris entre 22 et 24.

Milieu complet utilisé : MEM 4.5 g/L glucose supplémenté par de la L-Glutamine et du bicarbonate de sodium (Sigma-Aldrich), 10% de sérum de veau foetal (FBS, PAA) et 1% d'antibiotiques pénicilline/streptomycine (100x, Life Technologies).

4.2.3. *Mesure d'activité LDH*

48 h post-ensemencement, les cellules sont rincées deux fois avec du D-PBS puis incubées avec 160 µL d'une solution de peptide à 1 µM, 10 µM ou 100 µM dans de l'OptiMEM (Life Technologies) pendant 24 h à 37°C, 5% CO₂. 50 µL de surnageant sont ensuite prélevés puis analysés grâce au *Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}* (LDH, Roche, Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fournisseur.

La viabilité cellulaire dans chaque condition est normalisée au surnageant de cellules traitées par l'OptiMEM (sans peptide, 100% de variabilité) et au surnageant de cellules solubilisées par 1% de Triton X-100 (0% de viabilité).

4.2.4. *Evaluation de l'efficacité d'internalisation par cytométrie en flux*

48 h post ensemencement, les cellules sont rincées deux fois avec du D-PBS puis incubées avec 500 µL de solution peptidique aux concentrations souhaitées pendant le temps souhaité, à 37°C, 5% CO₂.

Criblage des *CPP-iCAL36. Les cellules sont incubées pendant 1,5 h avec des solutions de *CPP-iCAL36 à 1 µM ou 5 µM dans l'OptiMEM.

Transfection en présence de sérum. Les cellules sont incubées pendant 3 h avec des solutions de *CPP-iCAL36 à 1 µM ou 5 µM dans l'OptiMEM, supplémenté de 0%, 10% ou 20% de FBS.

Cinétique d'internalisation. Les cellules sont incubées pendant 1,5 h, 3 h ou 4,5 h avec des solutions de *TRI-iCAL36 (5 µM) ou *Pen-iCAL36 (1 µM) dans l'OptiMEM.

Transfection à 4°C. Les cellules sont pré-incubées pendant 30 min à 4°C (sur glace et non à 37°C, 5% CO₂) avec de l'OptiMEM, puis 1,5 h à 4°C avec des solutions de *TRI-iCAL36 (5 µM) ou *Pen-iCAL36 (1 µM).

Transfection en présence d'inhibiteurs d'endocytose ou de chloroquine. Les cellules sont prétraitées 30 min dans l'OptiMEM dans l'une des conditions suivantes : chlorpromazine (CPZ, 20 µM), nystatine (NYS, 50 µM), méthyl-β-cyclodextrine (MbCD, 5 mM), azoture de sodium/2-déoxyglucose (NaN₃/DG, 100 µM/60 µM), chloroquine (CQ, 100 µM). Les peptides (*TRI-iCAL36, 5 µM ; ou *Pen-iCAL36, 1 µM) sont ensuite ajoutés, puis les cellules sont incubées pendant 1,5 h.

A la fin de chaque incubation, les cellules sont rincées deux fois avec du D-PBS. Pour éliminer les peptides qui auraient pu adhérer aux membranes extracellulaires, les cellules sont incubées 10 min avec 100 µL de trypsine (0,05%) à 37°C, 5% CO₂. Les cellules sont transférées dans des tubes de 1,5 mL après addition de

400 μ L de D-PBS supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal (SVF), puis centrifugées (10 min, 4°C, 1.500 rpm). Les culots cellulaires sont repris dans 500 μ L de D-PBS supplémenté de 0,5% de SVF et de 0,1% de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Sigma-Aldrich), puis transférés dans des tubes de polystyrène à fond rond (Falcon) et analysés grâce à un cytomètre LSR Fortessa (Becton Dickinson ; DAPI : λ_{ex} = 405 nm / λ_{em} = 425-475 nm ; TAMRA : λ_{ex} = 561 nm / λ_{em} = 605-625 nm). Les cellules endommagées sont exclues par marquage au DAPI. Pour chaque condition 10.000 évènements sont enregistrés.

4.2.5. Observation des *CPP-iCAL36 par microscopie confocale

48h post-ensemencement dans des boîtes de microscopie à fond en verre, les cellules sont rincées deux fois avec du D-PBS puis incubées avec 1 mL de solution de *CPP-iCAL36 pendant le temps souhaité, à 37°C, 5% CO₂.

Criblage des *CPP-iCAL36. Les cellules sont incubées pendant 3 h avec des solutions de *CPP-iCAL36 à 1 μ M (*P36, *M36, *C36, *W36) ou 5 μ M (*T36, *dT36, *TRI36) dans l'OptiMEM. 10 min avant la fin de l'incubation, 10 μ L de WGA-488 (final : 1 μ g/mL, Invitrogen) sont ajoutés pour marquer les membranes cellulaires.

Transfection en présence de marqueurs d'endocytose ou de lysosomes. Les cellules sont incubées pendant 1,5 h avec des solutions de *TRI-iCAL36 (5 μ M) ou *Pen-iCAL36 (1 μ M), ainsi que l'un des marqueurs suivants : Transferrine-Alexa488 (Transferrine-488, 50 μ g/mL), Sous-unité B de la toxine du choléra-Alexa488 (CtB-488, 4 μ g/mL), Dextran-pHrodo Green (Dextran-Green, 25 μ g/mL), LysoTracker™ Green DND-26 (1 μ M) (tous fournis par Life Technologies).

Transfection en présence de marqueurs des endosomes. Les cellules (150.000 c/mL) sont prétraitées 16 h avant l'incubation des peptides dans du milieu complet avec l'un des marqueurs suivants : CellLight™ Early Endosomes-GFP, BacMam 2.0 (EE-GFP, 50 μ g/mL) ou CellLight™ Late Endosomes-GFP, BacMam 2.0 (LE-GFP, 50 μ g/mL) (tous fournis par Life Technologies). Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec du D-PBS puis incubées avec une solution de peptide (*TRI36, 5 μ M ; ou *P36, 1 μ M) dans l'OptiMEM pendant 1,5 h.

Après chaque incubation, les cellules sont rincées deux fois avec du D-PBS. 10 min avant la fin de l'incubation, 10 μ L de Hoechst 33342 (1 μ g/mL, Sigma-Aldrich) sont ajoutés pour marquer les noyaux des cellules. Les cellules sont rincées deux fois avec du D-PBS puis recouvertes de 1,5 mL de FluoroBrite (Life Technologies). Les échantillons sont ensuite observés avec un microscope confocal Leica SP5-SMD (objectif à huile Leica HCS PL Apo CS 63x/1.4 NA ; Hoechst 33342: λ_{ex} = 405 nm / λ_{em} = 415-485 nm; TAMRA: λ_{ex} = 561 nm / λ_{em} = 571-611 nm; Alexa488: λ_{ex} = 488 nm / λ_{em} = 498-548 nm). Après acquisition, les images sont traitées avec le logiciel ImageJ.

4.2.6. Expression et purification des protéines

Les protéines correspondant aux domaines PDZ de CAL, N2P1 et N2P2 ont été exprimées, purifiées et concentrées suivant la procédure décrite par Vouillème *et al*¹⁶⁵ par l'équipe du Prof. D.R. Madden. Après concentration, les protéines ont été dialysées dans les tampons de stockage suivants : 25-50 mM de Tris, pH 7,5 (N2P1, N2P2) ou 25 mM de Tris, pH 8,5 (CALP). 0,1 mM de TCEP (tris[2-carboxyéthyl]phosphine) et 0,02% de NaN₃ sont également ajoutés.

Séquence de CALP (M = 14632,2 g/mol) : **MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HM**ENLYFQGI RKVLLLKEDH
EGLGISITGG KEHGVPIILS EIHPGQPADR CGGLHVGDAL LAVNGVNLRD TKHKEAVTIL SQQRGEIEFE VVYVDPKETA
AAKFERQHMD S

Séquence de N2P1 (M = 19591,9 g/mol) : **MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HM**MAAPEPLR PRLCRLVRGE
QGYGFHLHGE KGRRGQFIRR VEPGSPAEEA ALRAGDRLVE VNGVNVEGET HHQVVQRIKA VEQTRLLVV
DQETDEELRR RQLTCTEEMA QRGLPPAHDWP WEPKPDWAHT GSHSSEAGKK DVSGPLRELR PRL

Séquence de N2P2 (M = 17671,6 g/mol) : **MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HM**PLRELRPR LCHLRKGPQG
YGFNLHSDKS RPGQYIRSVD PGSPAARSL RAQDRLIEVN GQNVEGLRHA EVVASIKARE DEARLLVVD
ETDEHFKRLR VTPTEEHVEG PLPSPVTNGT SPAQLNGGSA CSSRSDLPGS

Toutes les protéines contiennent les domaines PDZ (environ 80 acides aminés de long, gris) ainsi que des fragments de la protéine native (blanc). Le motif poly-histidine (jaune) permet la reconnaissance par les anticorps.

4.2.7. Mesures d'affinité protéine/ligand par polarisation de fluorescence

La polarisation de fluorescence a été mesurée par un lecteur de plaques PolarStar Omega (BMG Labtech) à 24°C.

Mesures de K_D . Une solution de 100 μ M de protéine (exemple : CALP) est incubée 30 min à température ambiante dans un tampon de polarisation (tampon FP : tampon de stockage sans TCEP et NaN₃, 0,1 mg/mL d'IgG bovin (Sigma), 0,5 mM de Thesit (Fluka)) contenant 500 nM de ligand fluorescent (exemple : *36). Ce mélange peptide/protéine pré-équilibré est ensuite dilué de manière sérielle dans du tampon FP contenant 500 nM de ligand fluorescent. Les solutions diluées sont incubées 15 min à température ambiante, puis 3x 20 μ L de chaque solution sont transférés vers une plaque noire à 384 puits pour la fluorescence (Falcon). La polarisation de fluorescence est mesurée (λ_{ex} : 544 nm / λ_{em} = 590 nm) puis représentée en fonction de la concentration de la protéine.

La concentration théorique en complexe protéine/ligand $[PL]_{calc}$ et la valeur de polarisation théorique P_{calc} sont calculées selon les équations suivantes :

$$(1) \quad [PL]_{calc} = 0,5 * ([L]_0 + [P]_0 + K_D - \sqrt{([L]_0 + [P]_0 + K_D)^2 - 4 * [P]_0 * [L]_0})$$

$$(2) \quad P_{calc} = P_L + (P_{PL} - P_L) * [PL]_{calc}/[L]_0$$

$[L]_0$: concentration initiale en ligand fluorescent

$[P]_0$: concentration initiale en protéine

K_D : constante de dissociation de l'interaction protéine/ligand fluorescent

P_L : polarisation du ligand seul ($[P]_0 = 0$)

P_{PL} : polarisation du complexe protéine/ligand seul ($[P]_0$ maximale)

Le K_D de l'interaction protéine/ligand fluorescent est ensuite déterminé par la méthode des moindres carrés, en faisant varier le K_D de telle sorte à minimiser l'écart entre les valeurs de polarisation expérimentales et théoriques (plugin SOLVER de Microsoft Excel).

Mesures de K_i . Une solution de protéine (exemple : CALP) est incubée 30 min à température ambiante dans un tampon de polarisation, dit tampon FP : tampon de stockage, 0,1 mg/mL d'IgG bovin (Sigma), 0,5 mM de Thesit (Fluka) et 500 nM de ligand fluorescent (exemple : *36). Une solution aqueuse de peptide compétiteur non-marqué (exemple : Pen-iCAL36) est préparée à 5 mM en présence de 25% de DMSO (Sigma-Aldrich), puis diluée de manière sérielle dans un mélange eau milliQ/DMSO 75:25. 6 μ L de chaque dilution sérielle sont ensuite mélangés à 54 μ L de mélange peptide/ligand fluorescent (final : 60 μ L, %DMSO = 2,5%). La concentration finale en protéine est de $1,8 \times K_D$. Deux solutions contenant 500 nM de ligand fluorescent et 2,5% de DMSO dans le tampon FP sont préparées : dans la deuxième solution, une quantité de protéine suffisante pour complexer entièrement le ligand fluorescent est ajoutée (voir P_{PL} , « Mesures de K_D »). Les solutions diluées sont incubées 15 min à température ambiante, puis 3x 20 μ L de chaque solution sont transférés vers une plaque noire à 384 puits conçue pour la mesure de fluorescence (Falcon). La polarisation de fluorescence est mesurée (λ_{ex} : 544 nm / λ_{em} = 590 nm) puis représentée en fonction de la concentration en peptide compétiteur.

La concentration théorique en protéine libre $[P]_{calc}$ et la valeur de polarisation théorique P_{calc} sont calculées selon les équations suivantes²⁹⁰ :

$$(3) \quad [P]_{calc} = -\frac{a}{3} + \frac{2}{3} * (\sqrt{a^2 - 3b}) * \cos\left(\frac{\theta}{3}\right)$$

$$(4) \quad \theta = \arccos\left[\frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2 * (a^2 - 3b)^{1,5}}\right]$$

$$(5) \quad a = K_D + K_i + [L]_0 + [C]_0 - P_0$$

$$(6) \quad b = K_i * ([L]_0 - [P]_0) + K_D * ([C]_0 - [P]_0) + K_D * K_i$$

$$(7) \quad c = -K_D * K_i * [P]_0$$

$$(8) \quad P_{calc} = \left(P_L + [P]_{calc} * \frac{P_{PL}}{K_D}\right) / \left(1 + \frac{[P]_{calc}}{K_D}\right)$$

$[L]_0$: concentration initiale en ligand fluorescent

$[P]_0$: concentration initiale en protéine

$[C]_0$: concentration initiale en peptide compétiteur

K_D : constante de dissociation de l'interaction protéine/ligand fluorescent

K_i : constante d'inhibition de l'interaction protéine/peptide compétiteur

P_L : polarisation du ligand seul ($[P]_0 = 0$)

P_{PL} : polarisation du complexe protéine/ligand seul ($[P]_0$ maximale)

Le K_i de l'interaction protéine/peptide compétiteur est ensuite déterminé par la méthode des moindres carrés, en faisant varier le K_i de telle sorte à minimiser l'écart entre les valeurs de polarisation expérimentales et théoriques (plugin SOLVER de Microsoft Excel). Les valeurs P_L et P_{PL} peuvent aussi être indiquées comme valeurs variables, ce qui peut permettre de renforcer l'adéquation globale entre les valeurs de polarisation expérimentales et théoriques.

4.2.8. Préparation des liposomes de type LUV

La préparation des larges vésicules unilamellaires (LUV) de composition reflétant la membrane plasmique (DOPC/SM/Chol 40:40:20), dans l'eau milliQ (pour les mesures de dichroïsme circulaire) et dans le tampon ANTS/DPX (pour les mesures de fuite), ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le chapitre 3 (*Liposome preparation*).

4.2.9. Dichroïsme circulaire

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le chapitre 3 (*Structure determination by circular dichroism*). Les données brutes sont corrigées par soustraction du signal du blanc (eau milliQ, liposomes seuls, 50% TFE) puis converties en ellipticité molaire par résidu.

Mesures en présence de LUV. Le spectre d'une solution de CPP-iCAL36 à 65 μM dans l'eau milliQ est d'abord mesuré en absence de LUV, puis les LUV sont ajoutés de telle sorte à obtenir un ratio LUV/peptide 2:1, puis 10:1. La conversion en ellipticité molaire par résidu est faite en tenant compte de la dilution provoquée par l'ajout des LUV.

Mesures en présence de TFE. 100 μL d'une solution de CPP-iCAL36 à 130 μM dans l'eau milliQ est mélangé à 100 μL de TFE (final : 65 μM en peptide), le signal du mélange résultant est mesuré.

4.2.10. Déstabilisation des membranes lipidiques par les CPP-iCAL36

Les mesures de fuite des liposomes ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le chapitre 3 (*Liposome leakage assay*).

4.3. Résultats : Criblage de vecteurs peptidiques

L'efficacité de transfection des conjugués CPP-iCAL36 a été évaluée sur des cultures adhérentes de cellules Caco-2 (côlon) et Calu-3 (poumon), qui sont des lignées humaines immortalisées exprimant la protéine CFTR à leur membrane apicale^{291,292} et qui sont donc des lignées modèles pertinentes pour étudier l'efficacité d'internalisation de molécules thérapeutiques dans le cadre de la mucoviscidose. Ces lignées ont été utilisées pour estimer la cytotoxicité, l'efficacité de transfection et la localisation cellulaire des CPP-iCAL36. Les conjugués possédant les propriétés optimales ont ensuite été utilisés sur des cultures adhérentes de cellules CFBE41o- : cette lignée est issue de patients porteurs de la mutation p.Phe508del-CFTR.

4.3.1. *Evaluation de la cytotoxicité des conjugués CPP-iCAL36*

Les conjugués CPP-iCAL36 ont pour but de normaliser les fonctions cellulaires des patients atteints de la mucoviscidose, il faut donc vérifier en priorité qu'ils n'engendrent pas d'effets cytotoxiques. Pour cela, les cellules Caco-2 et Calu-3 ont été incubées avec le peptide iCAL36 ou les conjugués CPP-iCAL36 de manière dose-dépendante (de 1 μ M à 100 μ M) pendant 24 heures. La cytotoxicité pour chaque condition est quantifiée par le taux extracellulaire de lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme libérée par les cellules endommagées (perméabilité des membranes cellulaires), à l'aide du kit *Cytotoxicity Detection Plus (LDH)*.

Le taux de LDH correspondant est ensuite normalisé par rapport à des cellules non-traitées (0% de cytotoxicité) et à des cellules lysées par 1% de Triton X-100 (100% de cytotoxicité). L'effet des peptides sur la viabilité cellulaire est présenté en **Figure 4.1**. Pour des concentrations de 1 μ M et 10 μ M en peptide, aucun effet cytotoxique significatif n'est visible ($0\% \pm 10\%$). A 100 μ M cependant, des distinctions plus marquées sont observables :

- Une cytotoxicité significative est observée pour dT36 (21% sur Caco-2, 22% sur Calu-3), P36 (26% sur Caco-2, 23% sur Calu-3) et M36 (23% sur Caco-2, 29% sur Calu-3) ;
- La viabilité n'est pas significativement affectée pour 36, T36 et TRI36, indiquant une absence de cytotoxicité même à 100 μ M ;
- Un taux de cytotoxicité significativement négatif est observé pour C36 et W36, ce qui est très surprenant.

Pour expliquer ce dernier résultat, nous avons observé les cellules au microscope (données non-présentées) : des changements morphologiques et une perte d'adhérence des cellules sont observables à 100 μ M pour dT36, P36 et M36 mais pas pour T36 ou TRI36, confirmant les mesures d'activité LDH. Avec C36 et W36, les cellules subissent un important changement morphologique et sont couvertes de précipité peptidique, ce qui peut mettre en évidence une faible solubilité de ces peptides. Notre hypothèse est que la précipitation du peptide sur les cellules séquestre la LDH et empêche sa libération dans le milieu extracellulaire, d'où des valeurs d'activité LDH plus faibles que pour les cellules non-traitées.

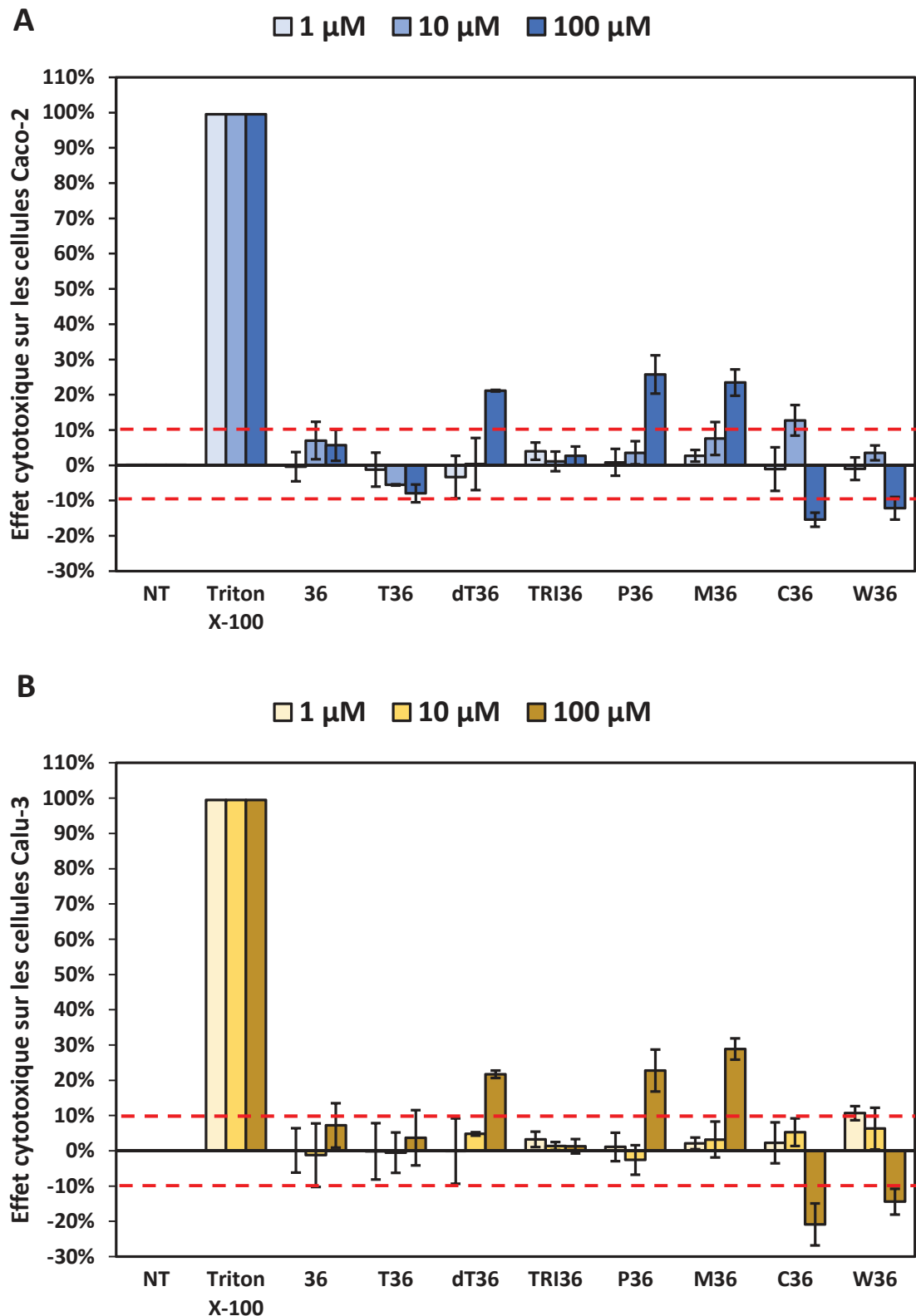


Figure 4.1. Effet des conjugués CPP-iCAL36 sur la viabilité de cellules Caco-2 et Calu-3.

Des cellules Caco-2 (A) et Calu-3 (B) ont été ensemencées dans des plaques de 96 puits puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être incubées pendant 24 h avec des solutions d'iCAL36 seul ou de CPP-iCAL36 à 1 μ M, 10 μ M ou 100 μ M dans l'OptiMEM. Les surnageants ont été collectés puis l'activité de la LDH γ a été révélée à l'aide du kit Cytotoxicity Detection Plus (LDH). Aucun effet cytotoxique du peptide iCAL36 seul ou des CPP-iCAL36 (100% $\pm$ 10%) n'a été constaté à 1 μ M et 10 μ M en comparaison avec des cellules non-traitées (NT). A 100 μ M, une cytotoxicité modérée (20-30%) est observée pour dT36, P36 et M36. T36 et TRI36 ne présentent aucun effet cytotoxique à cette concentration. C36 et W36 semblent présenter une activité LDH plus faible que les cellules non-traitées.

Il est donc possible de classer les CPP-iCAL36 suivant leur cytotoxicité à 100 μM : T36 et TRI36 sont non-cytotoxiques, dT36, P36 et M36 induisent une cytotoxicité modérée, et C36 et W36 semblent fortement cytotoxiques de par leur propension à précipiter. Ces tendances sont similaires sur les deux lignées testées.

4.3.2. *Mesure de l'internalisation des peptides par cytométrie de flux*

Il existe différentes méthodes applicables à la mesure de la quantité de molécules internalisées par les cellules²⁹³. Elles peuvent être basées sur des groupes reporteurs (fluorophores, radioisotopes, biotine...) attachés aux molécules pour permettre leur isolation et/ou leur quantification directe ; ou sur l'effet biologique de la molécule, ce qui permet une quantification indirecte de son internalisation.

Dans notre cas, les mesures d'activité de la molécule thérapeutique iCAL36 sont très lourdes à mettre en place (mesure du flux des ions de chlorure par chambre d'Ussing). Nous souhaitons donc d'abord cribler le taux d'internalisation de nos différents conjugués CPP-iCAL36 par deux méthodes simples basées sur la fluorescence du TAMRA :

- 1) La cytométrie en flux qui permet de quantifier le peptide internalisé et de mesurer la viabilité des cellules dans ces conditions ;
- 2) La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) qui est semi-quantitative, mais rend compte de la localisation du peptide.

Ces techniques permettent de quantifier l'efficacité de transfection du peptide tout en vérifiant que le peptide ne reste pas inséré dans la membrane. Cela n'est par exemple pas possible lorsque l'on quantifie uniquement l'internalisation du peptide dans des lysats cellulaires, comme par exemple par spectrométrie de masse²⁹⁴ ou par spectroscopie de fluorescence (Chapitre 3). En revanche, la quantification par spectrométrie de masse permet de se rendre compte d'une éventuelle dégradation du peptide, ce que ne permettent pas les méthodes basées sur la fluorescence.

Pour identifier les CPP-iCAL36 les plus efficaces pour la délivrance intracellulaire du peptide iCAL36, des cellules Caco-2 et Calu-3 ont été incubées avec les conjugués fluorescents *CPP-iCAL36 aux concentrations indiquées (1 μM ou 5 μM) pendant 1,5 heures. Les cellules sont ensuite trypsinées de façon à les décrocher de leur support et à éliminer la fraction de *CPP-iCAL36 associée aux protéines extramembranaires²⁵³. Les cellules sont ensuite lavées et reprises dans un tampon complété avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), qui permet de marquer les noyaux des cellules mortes. La fluorescence intracellulaire des *CPP-iCAL36 et du DAPI est ensuite quantifiée par cytométrie de flux sur les cellules vivantes (**Figure 4.2**).

On confirme tout d'abord l'hypothèse que l'usage de *CPP-iCAL36 mène à une internalisation significativement plus importante que celle du peptide iCAL36 sans vecteur (*36), et que cet effet est dose-dépendant. En parallèle, les mesures de viabilité pour chaque condition indiquent qu'aucun des *CPP-iCAL36 testés n'affecte significativement la viabilité cellulaire comparée aux cellules non-traitées (80% $\pm$ 10%), ce qui est cohérent avec les résultats obtenus par mesure d'activité LDH (**Figure 4.1**).

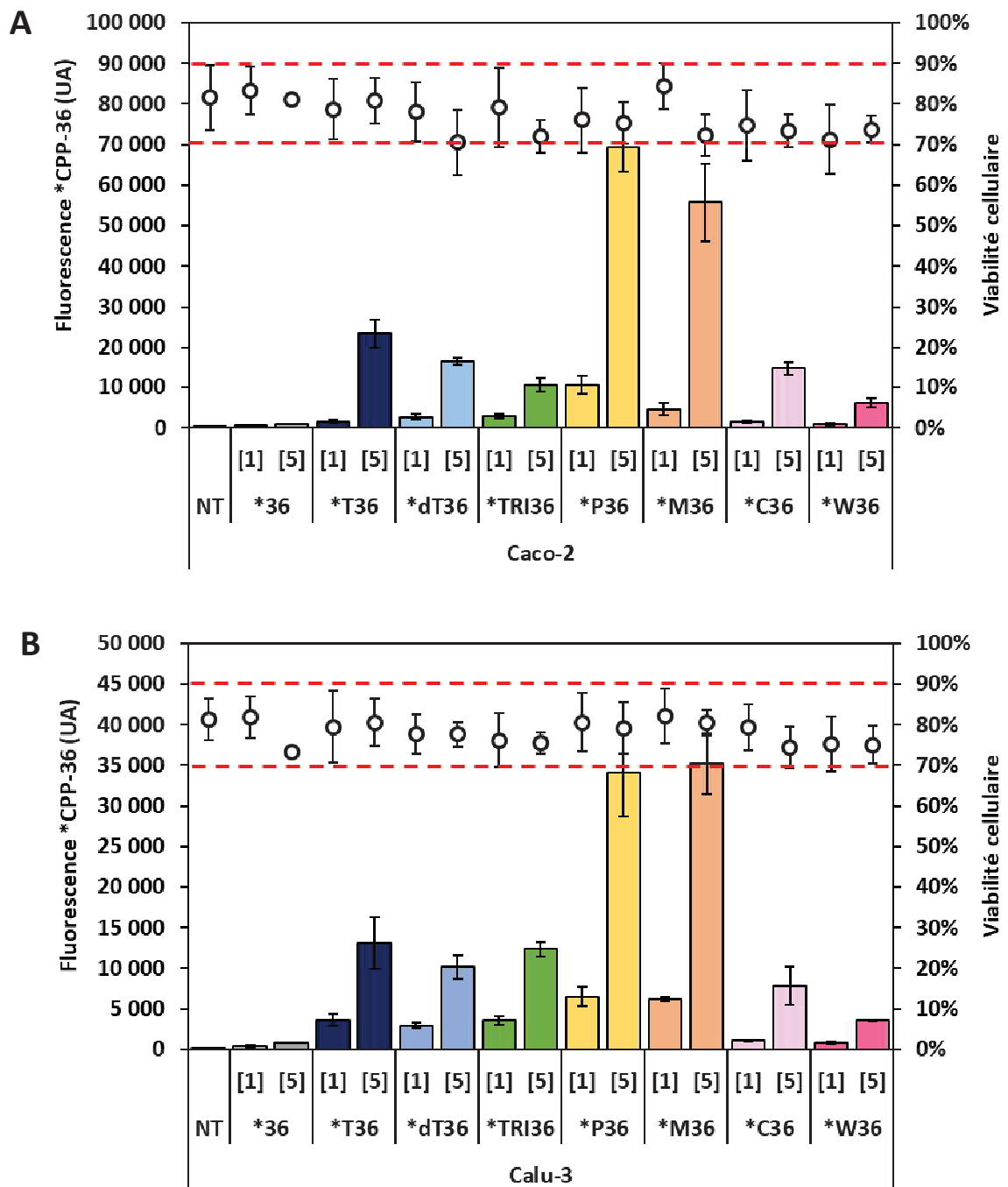


Figure 4.2. Efficacité d'internalisation des peptides *CPP-iCAL36 par des cellules Caco-2 et Calu-3.

Des cellules Caco-2 (A) et Calu-3 (B) ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 1,5 h avec des solutions de *CPP-iCAL36 à 1 µM ou 5 µM dans l'OptiMEM. Les échantillons cellulaires ont été lavés, trypsinés, centrifugés, repris dans un tampon contenant 0,1% de DAPI puis analysés par cytométrie de flux (seulement sur cellules vivantes). Aucun effet significatif des *CPP-iCAL36 sur la viabilité cellulaire n'est constaté (80% ± 10%, pointillés rouges correspondant à la variabilité des cellules non-traitées). Les peptides *CPP-iCAL36 peuvent être classifiés selon leur taux d'internalisation des deux lignées : C36/W36 < T36, dT36, TRI36 < P36, M36. NT : cellules non-traitées.

Les tendances observées sont les mêmes sur les deux types cellulaires (Caco-2 ou Calu-3), bien que de façon globale les *CPP-iCAL36 pénètrent moins efficacement les cellules Calu-3. Il est probable que cette différence soit liée à la nature des cellules Calu-3 : il a notamment été prouvé que les cellules Calu-3 polarisées sont bien moins perméables aux biomolécules (sucres, protéines...) que les cellules Caco-2 polarisées²⁹⁵.

Une analyse plus poussée des résultats obtenus sur les cellules Caco-2 permet de classer les *CPP-iCAL36 selon leur efficacité de transfection :

- Les conjugués *P36/*M36 sont respectivement 24 fois/10 fois plus efficaces que *36 à 1 μ M, et 40 fois/41 fois plus efficaces qu'iCAL36 à 5 μ M ;

- Les conjugués basés sur Tat (*T36/*dT36/*TRI36) sont respectivement 3 fois/5,9 fois/6,4 fois plus efficaces que *36 à 1 μ M ; à 5 μ M, ils sont respectivement 28 fois/20 fois/12 fois plus efficaces que *36. Leur efficacité semble donc moindre que celle de P36 ou M36, et ils pourraient nécessiter des doses plus hautes pour être efficaces ;

- Les conjugués *C36/*W36 sont respectivement 2,8 fois/1,5 fois plus efficaces que *36 à 1 μ M, et 17,8 fois/7,3 fois plus efficaces que *36 à 5 μ M. Les valeurs à 1 μ M étant assez faibles, on peut se demander s'ils sont réellement internalisés dans la cellule à cette concentration.

4.3.3. *Optimisation du temps de transfection des CPP-iCAL*

Afin de déterminer le temps de transfection optimal pour les conjugués *CPP-iCAL36 étudiés, nous avons suivi leur cinétique d'entrée dans les cellules Caco-2 et Calu-3, en sélectionnant *TRI36 et *P36 comme peptides représentatifs des conjugués *CPP-iCAL36. Les cellules ont été transfectées à 37°C, 5% CO₂ à l'aide des peptides à la concentration indiquée (1 μ M ou 5 μ M) dans l'OptiMEM entre 1,5 h et 4,5 h. Elles ont ensuite été trypsinées, traitées et analysées (**Figure 4.3**) comme indiqué plus haut.

Les tendances observées sont similaires sur les deux lignées cellulaires. On remarque tout d'abord que l'augmentation du temps d'incubation avec les *CPP-iCAL36 ne semble pas affecter significativement la viabilité cellulaire. Pour ce qui concerne leur efficacité de transfection, les deux peptides ont un comportement assez proche :

- L'internalisation cellulaire du conjugué *TRI36 (**Figure 4.3A**) semble atteindre un plateau à partir de 3 h dans toutes les conditions. Il y a une différence importante de signal entre 1,5 h et 3 h, mais pas entre 3 h et 4,5 h (30-40% du peptide rentre en 1,5 h, 60-70% rentre entre 1,5 h et 3 h).

- L'internalisation du conjugué *P36 (**Figure 4.3B**) est un peu différente de celle du conjugué *TRI36, dans le sens qu'une cinétique différente est observée selon la concentration utilisée (1 μ M VS 5 μ M). A 1 μ M il n'y a presque pas de différence d'internalisation entre 1,5 h, 3 h ou 4,5 h, mais pour la condition à 5 μ M, nous pouvons noter une augmentation du taux d'internalisation, qui ne semble pas proportionnelle au temps d'incubation (pas de doublement de la fluorescence intracellulaire entre 1,5h et 3h).

Dans les paragraphes suivants, nous avons sélectionné une durée de transfection de 3 h dans le but de maximiser le signal intracellulaire des conjugués *CPP-iCAL36 pour la microscopie confocale. En revanche, pour l'étude du mécanisme d'internalisation des *CPP-iCAL36, une durée de 1,5 h sera conservée afin de minimiser les effets secondaires, souvent toxiques, des inhibiteurs d'endocytose. Pour une meilleure comparaison, un temps d'incubation de 1,5 h sera également appliqué lors des expériences de colocalisation avec des marqueurs d'endocytose, d'endosomes ou de lysosomes. Pour de futurs essais biologiques, il serait intéressant de conserver un temps de transfection au moins égal à 3 h.

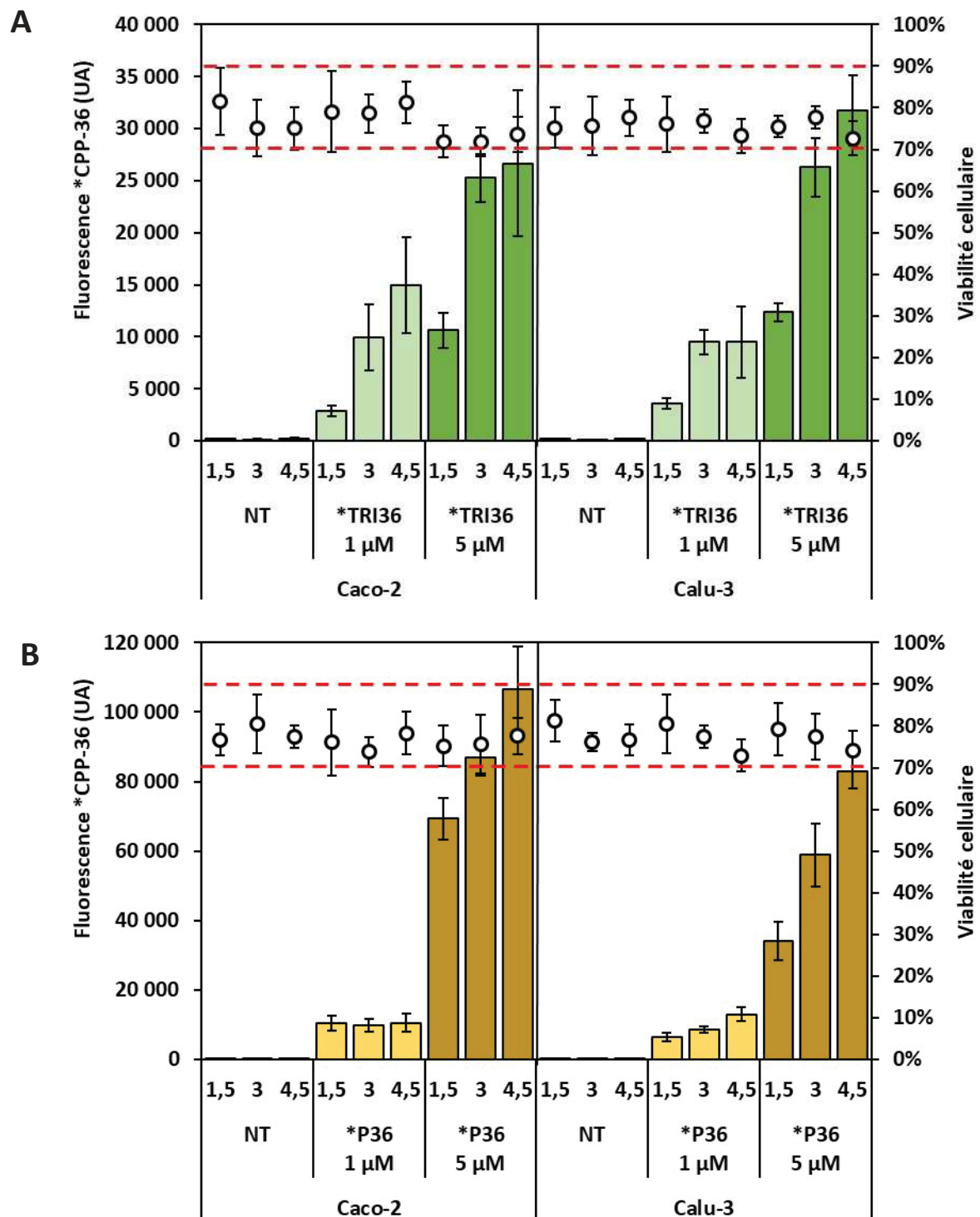


Figure 4.3. Cinétique d'entrée de *TRI36 et de *P36 dans des cellules Caco-2 et Calu-3.

Des cellules Caco-2 et Calu-3 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être incubées à 37°C, 5% CO₂ avec des solutions de *TRI36 (A) ou *P36 (B) à 1 μM ou 5 μM dans l'OptiMEM pendant des temps variables. Les échantillons cellulaires ont été lavés, trypsinés, centrifugés, repris dans un tampon contenant 0,1% de DAPI puis analysés par cytométrie de flux. NT : cellules non-traitées. Internalisation de *TRI36 : plateau atteint après 3 h (sauf à 1 μM sur les cellules Caco-2, où le plateau ne semble pas être atteint). Internalisation de *P36 : avec 1 μM, l'internalisation de P36 atteint un palier dès 1,5 h sur les cellules Caco-2 ; aucun plateau n'est constaté dans les autres cas. La viabilité cellulaire n'est pas significativement affectée par des temps d'incubation plus longs que 1,5 h.

4.3.4. Visualisation de la localisation cellulaire des *CPP-iCAL36

Pour confirmer les résultats des mesures d'internalisation et évaluer la localisation cellulaire des *CPP-iCAL36, des analyses de microscopie confocale ont été menées sur les deux lignées précédemment utilisées. Pour distinguer les fractions de peptide extracellulaires, membranaires ou cytosoliques, la membrane plasmique a été marquée par la protéine WGA (*wheat germ agglutinin*) portant une sonde Alexa-488 (WGA-488).

Sur la base des travaux précédents, les conditions expérimentales en termes d'ensemencement cellulaire, de concentration de peptides et de temps d'incubation ont été optimisées. Les résultats de l'étude cinétique (**Figure 4.3**) ont notamment permis de fixer la durée de transfection à 3 h pour tous les *CPP-iCAL36. De même, une concentration de 5 μ M a été utilisée pour *T36, *dT36 et *TRI36 (1 μ M pour les autres peptides) de façon à obtenir le meilleur rapport signal sur bruit pour chaque condition.

Les résultats obtenus sur les cellules Caco-2 (**Figure 4.4**) et Calu-3 (**Figure 4.5**) sont similaires. Les peptides utilisés ne semblent ni affecter la morphologie des cellules ni la répartition du signal du WGA-488. Aucun signal de fluorescence TAMRA correspondant au peptide iCAL36 sans vecteur (*36) n'est observé, ce qui est en accord avec les mesures de cytométrie de flux et suggère l'absence d'internalisation du peptide seul, confirmant la nécessité d'utiliser des CPP. Les peptides *T36, *dT36, *TRI36, *P36 et *M36 (rouge) apparaissent exclusivement dans le cytosol et ne montrent pas de colocalisation avec le marqueur de membrane (vert), suggérant une internalisation significative des conjugués.

En revanche, les conjugués *C36 et *W36 (rouge) apparaissent majoritairement en colocalisation avec le marqueur de membrane (vert, colocalisation en jaune) et forment des amas probablement situés à l'extérieur de la cellule. Seul un pourcentage minoritaire des peptides fluorescents apparaît dans le cytosol sous la forme de signaux ponctuels, ce qui montre que leur capacité à délivrer iCAL36 dans le cytoplasme est limitée. Ces informations, associées aux mesures de cytométrie en flux ainsi qu'aux résultats présentés dans le chapitre 3, mettent en évidence de façon claire que C6M1 et WRAP5 ne constituent pas des vecteurs efficaces pour la délivrance du peptide iCAL36.

Du point de vue de la quantité et de la localisation cellulaire, les peptides *T36, *dT36 et *TRI36 pénètrent la cellule de façon très similaire, ce qui est en accord avec les résultats de cytométrie de flux. Cependant lors des tests d'activité LDH le peptide dT36 a présenté une cytotoxicité plus élevée à 100 μ M qui nous a amené à l'écarter des prochaines expériences.

Les quatre peptides combinant à la fois une bonne efficacité de transfection et une absence de cytotoxicité sont les conjugués T36, TRI36, P36 et M36. Seuls ces peptides sont donc utilisés dans la suite des expériences.

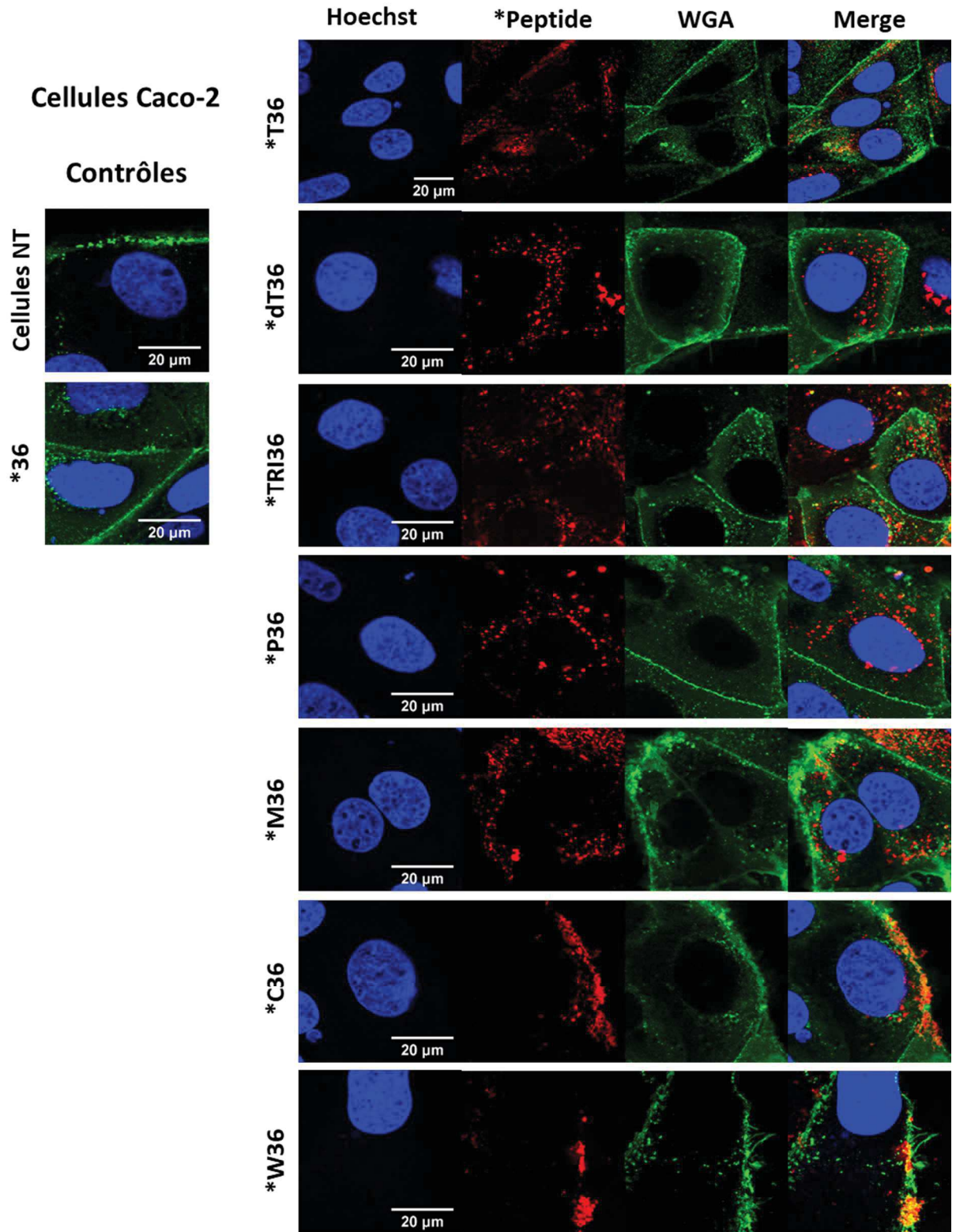


Figure 4.4. Images représentatives de l'internalisation des *CPP-iCAL36 dans des cellules Caco-2.

Les cellules Caco-2 ont étéensemencées dans des boîtes de microscopie à fond en verre (300.000 c/mL) puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂, avant d'être incubées pendant 3 h avec des solutions de *CPP-iCAL36 (rouge) à 1 μM (*36, *P36, *M36, *C36 et *W36) ou 5 μM (*T36, *dT36 et *TRI36) dans l'OptiMEM. Les membranes cellulaires ont été marquées avec du WGA-488 (vert) et les noyaux avec du Hoechst 33342 (bleu). La colocalisation entre le peptide (rouge) et le marqueur de membrane (vert) apparaît en jaune. Les conjugués *T36, *dT36, *TRI36, *P36 et *M36 apparaissent dans le cytoplasme, alors que *C36 et *W36 apparaissent majoritairement en colocalisation avec les membranes cellulaires. Cellules NT : cellules non-traitées.

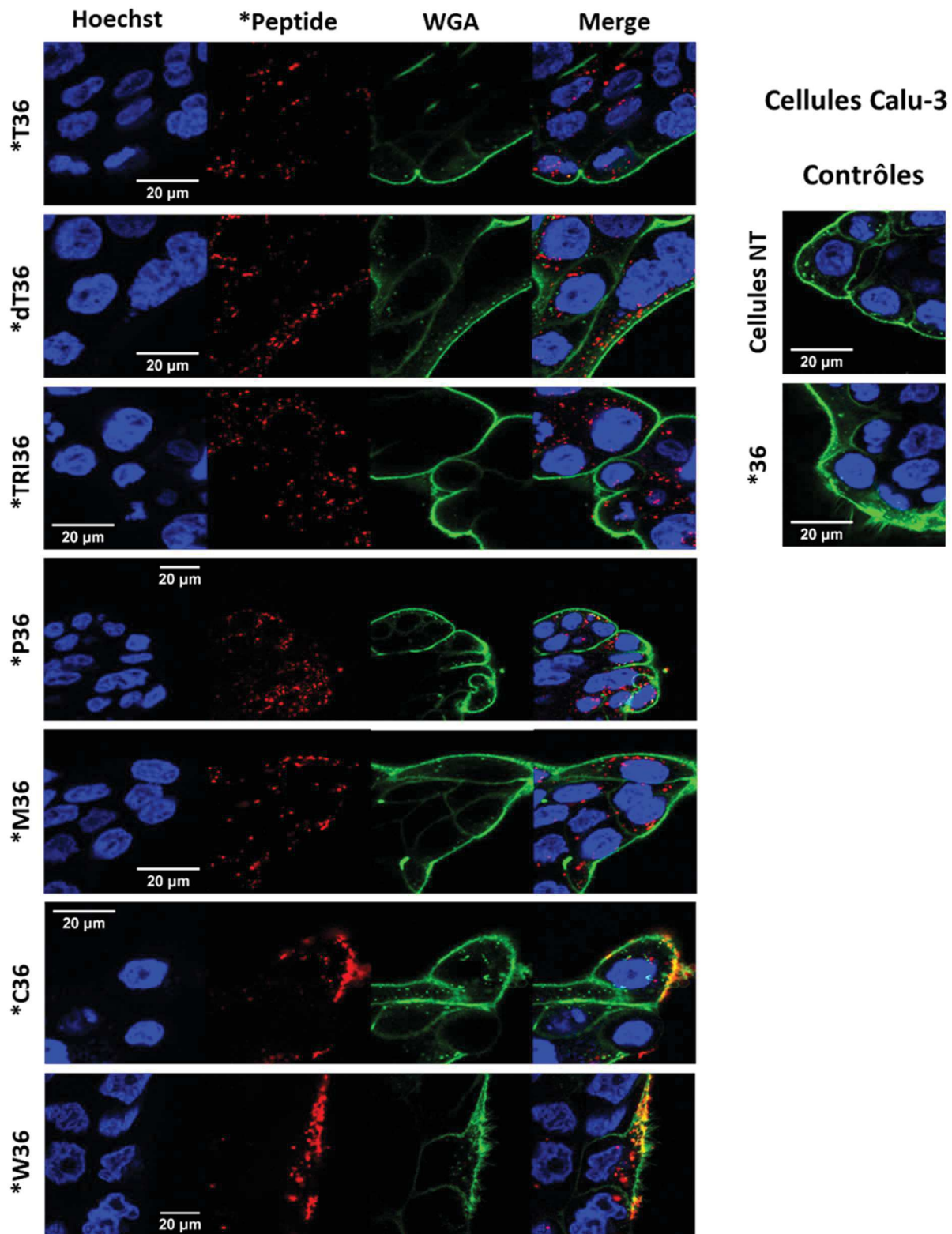


Figure 4.5. Images représentatives de l'internalisation des *CPP-iCAL36 dans des cellules Calu-3.

Les cellules Calu-3 ont étéensemencées dans des boîtes de microscopie à fond en verre (300.000 c/mL) puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂, avant d'être incubées pendant 3 h avec des solutions de *CPP-iCAL36 (rouge) à 1 μM (*36, *P36, *M36, *C36 et *W36) ou 5 μM (*T36, *dT36 et *TRI36) dans l'OptiMEM. Les membranes cellulaires ont été marquées avec du WGA-488 (vert) et les noyaux avec du Hoechst 33342 (bleu). La colocalisation entre le peptide (rouge) et le marqueur de membrane (vert) apparaît en jaune. Les conjugués *T36, *dT36, *TRI36, *P36 et *M36 apparaissent dans le cytoplasme, alors que *C36 et *W36 apparaissent majoritairement en colocalisation avec les membranes cellulaires. Cellules NT : cellules non-traitées.

4.3.5. Internalisation des conjugués *CPP-iCAL36 en présence de sérum

Pour considérer une application chez le patient par les voies aériennes (spray), il faut prendre en compte que les CPP-iCAL36 devront traverser un épais mucus avant d'atteindre les cellules épithéliales. Ce mucus contient entre autres de nombreuses protéines sur lesquelles les CPP-iCAL36 pourront rester fixés, ou des protéases qui dégraderont les CPP-iCAL36 avant leur délivrance intracellulaire. Dans le but d'estimer l'efficacité de transfection des CPP-iCAL36 dans cet environnement, des transfusions dans un milieu complété de 0% (condition identique au sous-chapitre 3.3), 10% ou 20% de sérum ont été réalisées afin de mimer un environnement très riche en protéases et autres partenaires protéiques potentiels (**Figure 4.6**).

De manière attendue, ni la présence des *CPP-iCAL36 ni l'augmentation du pourcentage de sérum dans le milieu de transfection n'affectent la viabilité cellulaire. En revanche, l'efficacité de transfection des *CPP-iCAL36 diminue de façon dose-dépendante en présence de sérum.

Cellules Caco-2 à 10% de sérum :

- A 1 μ M de peptide, les efficacités de transfection de *T36 et *P36 ne sont pas affectées, et celles de *TRI36 et *M36 diminuent respectivement de 13% et 48% (**Figure 4.6A**) ;

- A 5 μ M de peptide, les efficacités de transfection de *M36, *P36 et *T36 diminuent respectivement de 31%, 30% et 34%, alors que *TRI36 n'est pas significativement affecté (**Figure 4.6B**).

Cellules Caco-2 à 20% de sérum :

- A 1 μ M de peptide, les efficacités de transfection de *T36, *P36, *TRI36 et *M36 diminuent respectivement de 37%, 42%, 49% et 67% (**Figure 4.6A**) ;

- A 5 μ M de peptide, les efficacités de transfection de *M36, *P36 et *T36 diminuent respectivement de 46%, 48% et 55%, alors que *TRI36 est beaucoup moins affecté et ne perd que 18% de signal (**Figure 4.6B**).

Les mêmes tendances sont observées sur les deux lignées. Ce résultat tend à signifier que *TRI36 pourrait être potentiellement plus efficace *in vivo* que les autres conjugués *CPP-iCAL36. Il est envisageable qu'à 1 μ M de peptide, l'effet d'adhésion non-spécifique des *CPP-iCAL36 aux protéines sériques soit dominant par rapport à la dégradation des peptides par les protéases, d'où le fait que tous les *CPP-iCAL36 perdent de leur efficacité de transfection ; alors qu'à 5 μ M de peptide le ratio *CPP-iCAL36/protéine sérique est plus élevé, menant à la saturation de la surface d'interaction des protéines sériques et à l'apparition de l'effet de la dégradation des *CPP-iCAL36 par les protéases, contre lesquelles TRI est immunisé de par sa composition riche en AAD.

On remarque que pour les peptides utilisés à 5 μ M en présence de 20% de sérum, on peut atteindre une quantité de peptide internalisé plus forte qu'à 1 μ M en absence de sérum (sur les cellules Caco-2, facteur 2 pour *T36 et *TRI36, facteur 4,5 pour *P36 et facteur 8,5 pour *M36). Cela indique que le problème de la dégradation des conjugués CPP-iCAL36 par le sérum peut être contourné en augmentant la dose de peptide administrée.

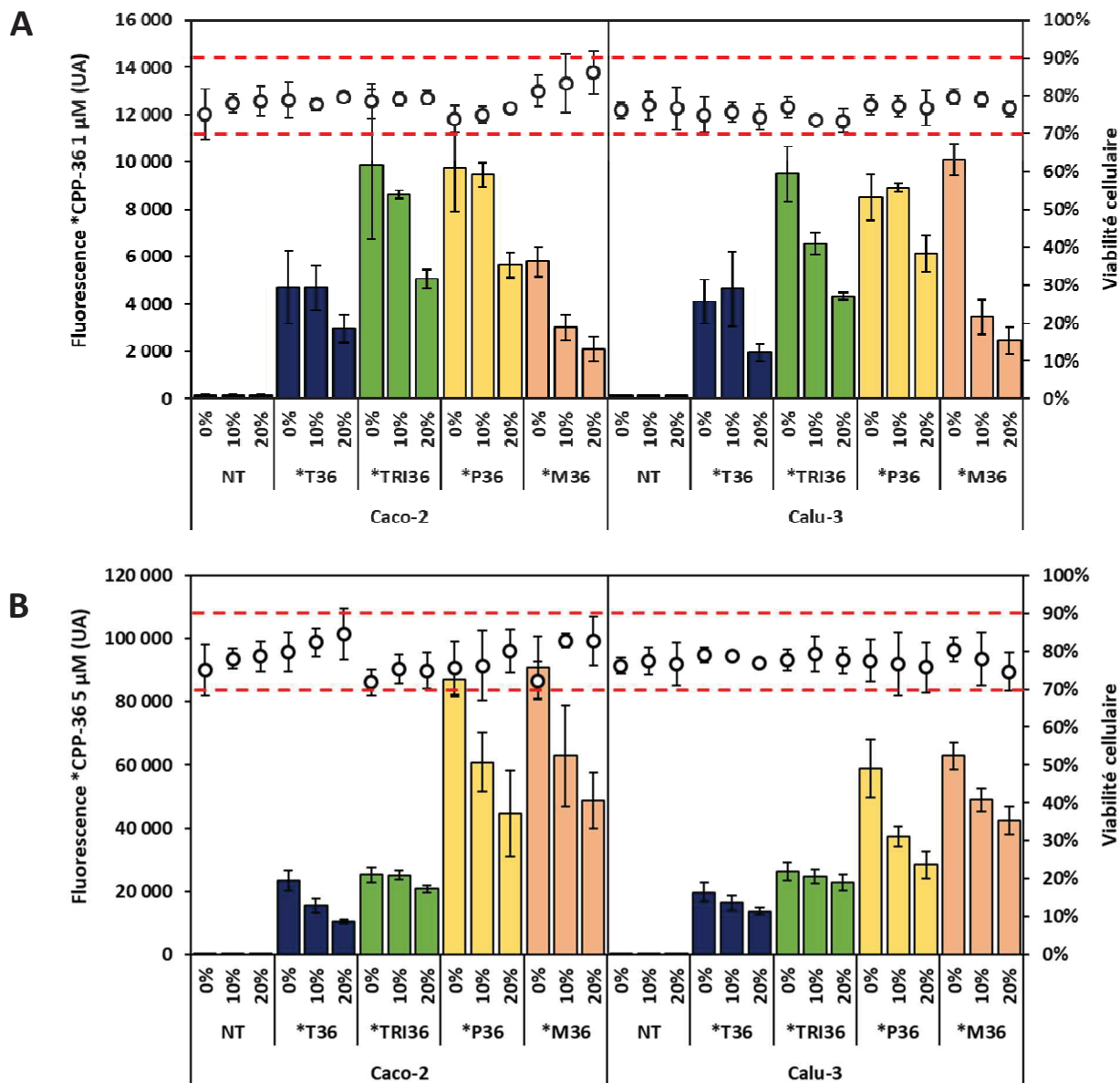


Figure 4.6. Efficacité d'internalisation des peptides *CPP-iCAL36 en présence de sérum.

Des cellules Caco-2 et Calu-3 ont été ensemencées dans des plaques 24 puits puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 3 h avec des solutions de *CPP-iCAL36 à 1 µM (A) ou 5 µM (B) dans l'OptiMEM en présence de 0%, 10% ou 20% de FBS. Les échantillons cellulaires ont été lavés, trypsinés, centrifugés, repris dans un tampon contenant 0,1% de DAPI puis analysés par cytométrie de flux. Aucun effet significatif des *CPP-iCAL36 sur la viabilité cellulaire n'est constaté (80% ± 10%, pointillés rouges). A 1 µM le signal de tous les *CPP-iCAL36 diminue de façon dose-dépendante avec le pourcentage de FBS. A 5 µM, cet effet est constaté pour tous les *CPP-iCAL36 à l'exception de *TRI36, dont l'intensité de fluorescence intracellulaire ne diminue pas même à 20% de FBS. NT : cellules non-traitées.

4.3.6. Critères de sélection des deux meilleurs candidats

Au vu des résultats obtenus dans cette partie, il apparaît que T36, TRI36, P36 et M36 permettent tous la délivrance efficace d'iCAL36 dans les cellules. Ils ont toutefois des propriétés différentes.

- T36 n'induit pas de cytotoxicité à forte dose, mais son efficacité d'internalisation à faible dose est modeste. De plus, son internalisation est plus influencée par l'ajout de sérum ;

- TRI36 a le même profil de cytotoxicité et d'efficacité d'internalisation que T36, mais présente une meilleure délivrance en présence de sérum pouvant être expliquée par la résistance potentielle aux protéases conférée par sa séquence rétro-inversée) ;

- P36 et M36 ont montré l'efficacité de pénétration cellulaire la plus élevée à faible dose (1 μ M), mais peuvent induire une réduction de la viabilité cellulaire de 20-30% à forte concentration (100 μ M). De plus, leur efficacité de transfection est significativement réduite en présence de sérum. Néanmoins, P36 à faible dose semble moins affecté que M36 dans les deux lignées cellulaires.

Au vu de ces résultats, les peptides TRI36 et P36 ont été sélectionnés pour la suite des expériences.

4.3.7. Internalisation de cellules CFBE41o- par *TRI36 et *P36

Les cellules CFBE dites parentales (CFBE41o-) constituent un modèle cellulaire pertinent pour étudier le canal p.Phe508del-CFTR sous condition physiologique. Afin de vérifier que les composés *TRI36 et *P36 ne soient pas spécifiques des lignées Caco-2 et Calu-3, leur internalisation a été évaluée sur des monocouches adhérentes CFBE41o-. Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 24 puits puis cultivées pendant 36 h jusqu'à atteindre 50% de confluence. Elles ont ensuite été transfectées à 37°C, 5% CO₂ par les conjugués *TRI36 (5 μ M) ou *P36 (1 μ M) dans l'OptiMEM pendant 1,5 h, trypsinées, traitées et analysées par cytométrie de flux (**Figure 4.7**) comme indiqué plus haut.

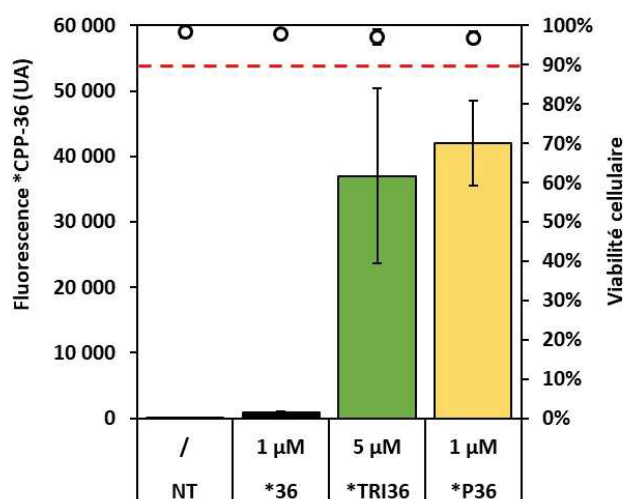


Figure 4.7. Efficacité d'internalisation de *TRI36 et *P36 par des cellules CFBE41o-.

Des cellules CFBE41o- ont étéensemencées dans des plaques 24 puits puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 1,5 h avec des solutions de *TRI36 (5 μ M) ou *P36 (1 μ M) dans l'OptiMEM. Les échantillons cellulaires ont été lavés, trypsinés, centrifugés, repris dans un tampon contenant 0,1% de DAPI puis analysés par cytométrie de flux. NT: cellules non-traitées. Aucun effet significatif des *CPP-iCAL36 sur la viabilité cellulaire n'est constaté (> 90%, pointillés rouges). Les peptides *TRI36 et *P36 présentent tous deux une délivrance intracellulaire significativement augmentée par rapport au peptide 36 seul.

Les résultats obtenus confirment que les conjugués *TRI36 et *P36 peuvent être utilisés pour le traitement de cellules CFBE41o- adhérentes. Les mesures de viabilité pour chaque condition indiquent qu'aucun des *CPP-iCAL36 testés n'affecte significativement la viabilité des cellules CFBE41o- (>90%) aux concentrations testées. *TRI36/*P36 sont délivrés de façon efficace dans la cellule : leur signal de fluorescence est respectivement 47 fois/52 fois plus élevé que celui du peptide iCAL36 seul.

L'efficacité de transfection des cellules CFBE410- est plus élevée que celle observée sur les cellules Caco-2 (4 fois plus élevée) et Calu-3 (3 fois plus élevée pour *TRI36, 6 fois plus élevée pour *P36), ce qui peut indiquer que les cellules CFBE410- sont plus perméables ou que les mécanismes permettant l'internalisation de *TRI36 et de *P36 sont plus efficaces que dans les cellules Caco-2 et Calu-3.

4.3.8. Affinité et sélectivité de TRI36 pour CALP

Avant de tester l'activité fonctionnelle des conjugués TRI36 et P36 sur l'activité de la protéine p.del508-CFTR, il est important de vérifier que la présence d'un CPP n'affecte pas l'affinité ou la sélectivité du conjugué peptidique pour CALP *versus* les domaines PDZ des protéines NHERF. Le peptide TRI36 a été choisi pour vérifier cette hypothèse : l'interaction du peptide iCAL36 et du conjugué TRI36 avec CALP, N2P1 et N2P2 a été mesurée par polarisation de fluorescence (**Tableau 4.2, Figure 4.8**). Dans un premier temps, un ligand fluorescent (*36 ou *CFTR₁₀) est titré par des quantités variables de sa protéine d'intérêt (CALP pour *36, N2P1 et N2P2 pour *CFTR₁₀). Ces mesures servent à déterminer le K_D de l'interaction ligand fluorescent/protéine. En se basant sur cette valeur, le déplacement du complexe ligand/protéine par des quantités variables de peptide non marqué (peptide compétiteur) permet, dans un second temps, d'estimer une valeur de K_i pour l'interaction peptide/protéine.

Tableau 4.2. Affinité et sélectivité d'iCAL36 et des conjugués CPP-iCAL36 pour CALP.

Protéine	Peptide	K_D (μM)	K_i (μM)
CALP	*36	$4,4 \pm 0,6$	/
	36	/	$6,9 \pm 1,7$
	TRI36	/	$1,5 \pm 0,4$
	P36	s.m.	s.m.
N2P1	*CFTR ₁₀	$2,0 \pm 0,2$	/
	36	/	> 5 000
	TRI36	/	> 5 000
	P36	s.m.	s.m.
N2P2	*CFTR ₁₀	$0,30 \pm 0,05$	/
	36	/	> 5 000
	TRI36	/	> 5 000
	P36	s.m.	s.m.

Les valeurs de K_D (constante de dissociation) correspondent à la dissociation du complexe ligand fluorescent/protéine d'intérêt. Les valeurs de K_i (constante d'inhibition) correspondent à la dissociation du complexe peptide compétiteur/protéine d'intérêt. L'extension d'iCAL36 par TRI augmente significativement l'affinité pour CALP tout en maintenant une absence d'affinité pour les domaines PDZ de NHERF2. s.m. = sans mesure. Les affinités du peptide P36 avec les protéines d'intérêt seront ultérieurement réalisées.

Le conjugué TRI36 a une affinité pour la protéine CALP modérément plus élevée que le peptide iCAL36 seul, indiquant que le couplage du CPP TRI sur l'extrémité N-terminale du peptide iCAL36 est bénéfique : au vu des précédents résultats de synthèse SPOT obtenus dans notre groupe, il est probable que cet effet soit

indépendant de la séquence peptidique et soit simplement dû à la longueur de la chaîne peptidique. Un résultat particulièrement important est l'absence d'affinité du peptide TRI36 pour NHERF2 (N2P1 et N2P2) même après extension de la séquence d'iCAL36 par TRI. Ceci, associé à de précédents résultats de l'équipe¹⁶⁶, nous laisse penser que l'usage de CPP ne devrait pas affecter négativement l'activité biologique du peptide stabilisateur iCAL36. Cette hypothèse sera confirmée dans un futur proche avec le peptide P36, qui n'a pas pu être testé suite à des problèmes rencontrés lors de la synthèse d'un nouveau lot de ce peptide (oxydation de la méthionine).

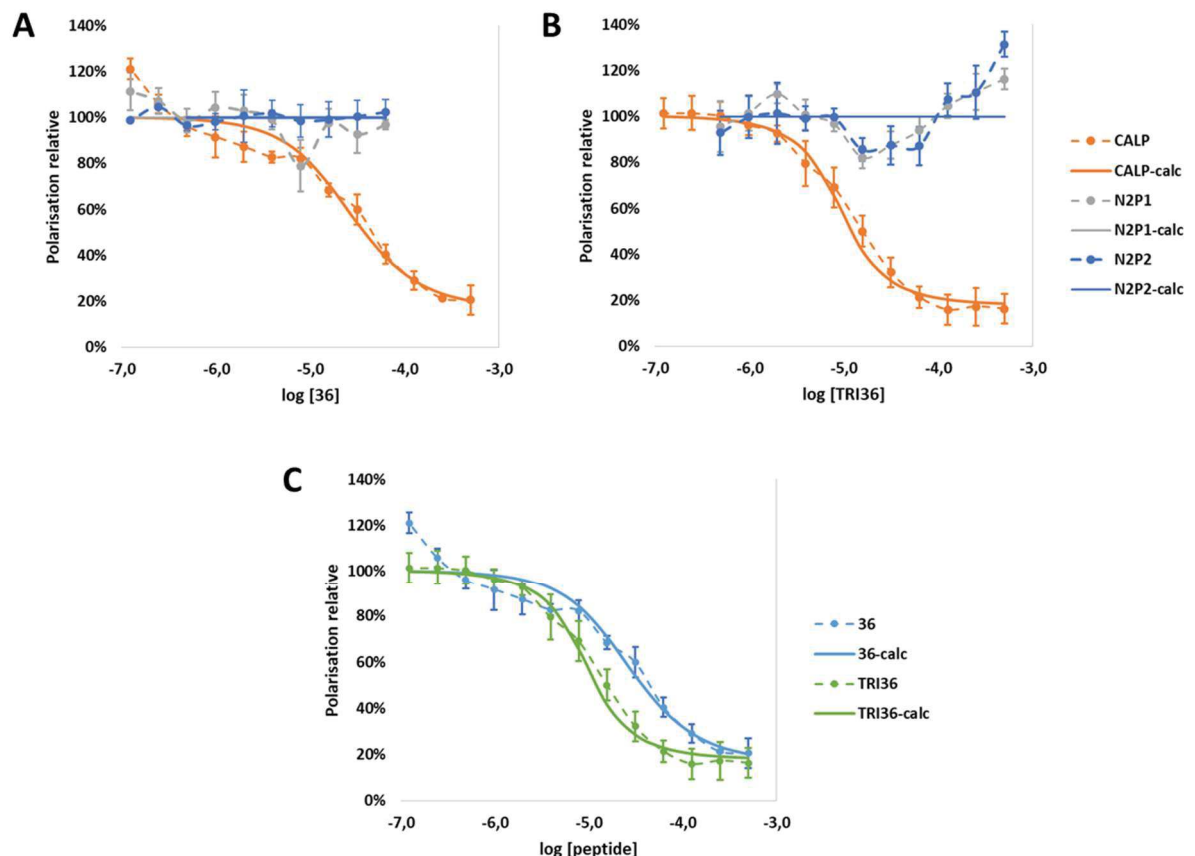


Figure 4.8. Mesure de l'affinité des peptides iCAL36 et TRI36 pour CALP, N2P1 et N2P2 par FP.

Les courbes expérimentales (en pointillé) sont fittées par une courbe de valeurs calculées (en trait plein) qui est exploitée pour le calcul de la valeur de K_i . (A) Interaction du peptide iCAL36 avec CALP (orange), N2P1 (gris) et N2P2 (bleu). (B) Interaction du peptide TRI36 avec CALP (orange), N2P1 (gris) et N2P2 (bleu). (C) Comparaison des affinités des trois peptides pour CALP. Les courbes sont représentatives d'un des réplicas techniques réalisés.

4.3.9. Conclusion

Les résultats obtenus dans cette partie nous ont permis de définir TRI36 et P36 comme les conjugués CPP-iCAL36 optimaux en termes d'efficacité de transfection sur des cellules Caco-2, Calu-3 et CFBE41o- sans effets cytotoxiques pour les cellules. La capacité de ces peptides à s'adapter à une transfection en présence de protéases représentatives du mucus des patients CF est également appréciable. Enfin, ces conjugués conservent l'affinité et la sélectivité de la séquence iCAL36 native pour la protéine CALP. Toutes ces

propriétés en font des agents thérapeutiques efficaces qui pourront être appliqués ultérieurement à la transfection de cellules épithéliales de patients p.Phe508del cultivées en ALI.

Afin de mieux comprendre les spécificités des conjugués CPP-iCAL36 ainsi que leur comportement *in cellulo*, le prochain chapitre est consacré à l'étude extensive de leur mécanisme d'internalisation.

4.4. Mécanisme d'internalisation de TRI36 et P36

4.4.1. Interaction des CPP-iCAL36 avec des bicouches lipidiques

4.4.1.1. Analyse structurale par dichroïsme circulaire

L'analyse de la structure secondaire des peptides par dichroïsme circulaire permet d'obtenir des informations cruciales sur leurs propriétés physico-chimiques mais également sur leur mécanisme d'internalisation. Par exemple, le changement de structure secondaire d'un CPP au contact de vésicules lipidiques (LUV) mimant la membrane plasmique est un indicateur d'interaction directe avec les bicouches lipidiques²⁶¹. La structure des peptides TRI36 et P36 a été mesurée dans l'eau, puis en présence de LUV (DOPC/SM/Chol 2:2:1) dont la composition lipidique reflète celle des membranes plasmiques neutres²⁶¹, ou en présence de 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) qui est un fort agent structurant²⁹⁶ (**Figure 4.9**).

L'amplitude du spectre du peptide TRI36 seul est quasiment nulle, ce qui s'explique par le fait que le peptide contient un fragment constitué de 10 acides aminés de configuration naturelle (iCAL36, isoforme L) et un fragment constitué de 13 acides aminés de configuration inverse (TRI, isoforme D). La comparaison avec les spectres de iCAL36 (*random coil* sous toutes conditions testées), de T36 et de dT36 (données non-présentées) nous laisse penser que le signal de TRI36 est le résultat de la compensation quasi-totale d'un profil *random coil* correspondant au fragment iCAL36 par un potentiel profil *random coil* correspondant au fragment TRI. Cette compensation a déjà été observée pour des mélanges équi-molaires de peptides en isoforme D et L dont l'amplitude du spectre résultant est nulle ou quasi-nulle²²⁰. Toutefois ces observations tendent à démontrer que le conjugué TRI36 est non-structuré dans l'eau. L'ajout de LUV ou de TFE donne lieu à de très légères variations de signal, qui paraissent non-significatives. Le peptide TRI36 ne semble donc pas adopter de structure particulière au contact des membranes lipidiques neutres ni même en présence d'agent structurant, ce qui a déjà été observé pour le peptide parent Tat²⁶¹.

Le peptide P36 n'est pas structuré dans l'eau ou en présence de LUV mimant la membrane plasmique, et présente les signaux typiques du *random coil* : un minimum vers 198 nm et un maximum vers 221 nm. Cependant, en présence de TFE le signal de P36 change pour présenter les caractéristiques d'une hélice α (maximum à 193 nm, minima locaux à 208 nm et 222 nm). Le peptide P36 présente donc une versatilité structurale qui n'est pas liée à l'interaction avec les membranes lipidiques neutres, et qui pourrait être provoquée par exemple par l'interaction entre les charges positives du motif Pen avec les charges négatives des protéines extramembranaires ou des GAG.

Ces résultats indiquent que les deux peptides ne changent pas de structure au contact des constituants lipidiques de la membrane plasmique, une caractéristique qui est fréquemment associée aux peptides internalisés dans les cellules par des mécanismes de translocation directe. La probabilité que ces mécanismes soient impliqués dans le mode d'entrée de TRI36 et de P36 est donc faible.

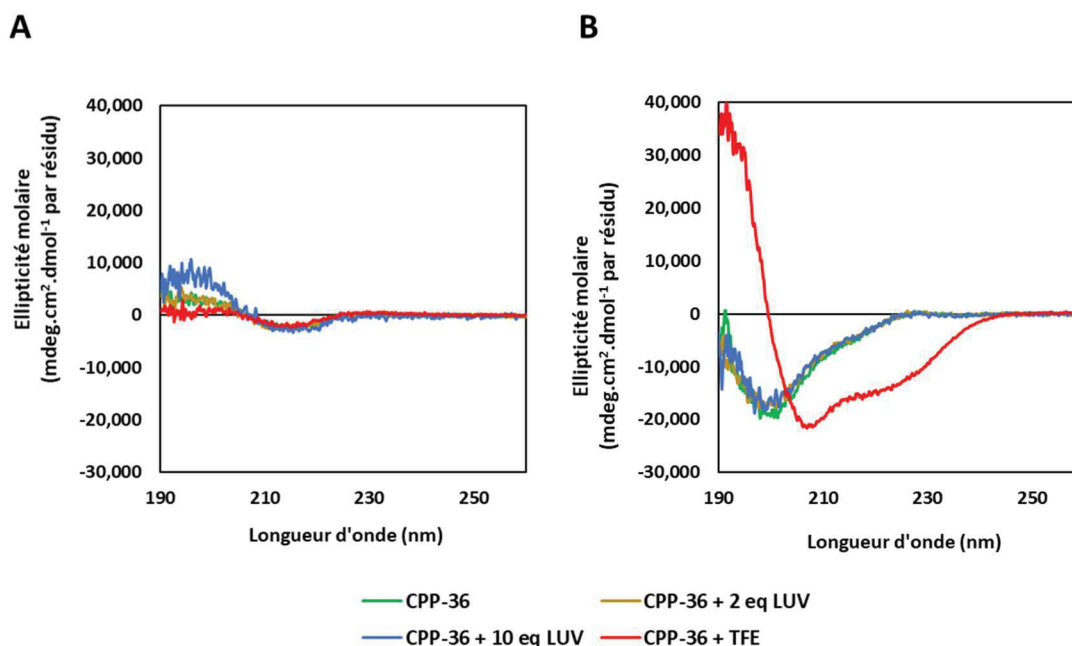


Figure 4.9. Spectres de dichroïsme circulaire représentatifs des peptides TRI36 et P36.

Le signal de TRI36 semble correspondre à la somme de composantes random coil d'une chaîne d'acides naturels et d'une chaîne d'AAD, et il n'est ni affecté par la présence de LUV ni par celle de TFE. Le signal de P36 semble indiquer une absence de structuration dans l'eau ou en présence de LUV, mais un fort changement structural sous l'action du TFE.

4.4.1.2. Potentiel de déstabilisation des bicouches lipidiques

L'étude de l'interaction des CPP-iCAL36 avec des modèles de bicouches lipidiques s'est poursuivie par des mesures de fuite (*leakage*) sur des LUV reflétant la composition lipidique de la membrane plasmique (DOPC/SM/Chol 2:2:1) encapsulant un fluorophore et un quencher. A l'intérieur des LUV, ces deux composés sont si proches que la fluorescence est totalement éteinte ; mais lorsqu'une biomolécule est capable d'interagir avec la membrane lipidique elle peut créer des pores transitoires permettant la libération et la dilution de la paire fluorophore/quencher hors des LUV, permettant ainsi la mesure d'un signal de fluorescence.

Ces LUV ANTS/DPX (100 μ M) ont été traités par des concentrations croissantes (de 0,1 μ M à 50 μ M) de TRI36, *TRI36, P36, *P36 et C36 pendant 15 min (données non-présentées). Pour les trois premiers peptides, aucune déstabilisation significative des LUV n'a été observée (< 3% de fuite). En revanche, *P36 a présenté des taux de fuite de 7%, 20%, 23% et 36% à des concentrations respectives de 0,1 μ M, 0,5 μ M, 2,5 μ M et 10 μ M, indiquant une certaine propension à déstabiliser les membranes lipidiques : ce résultat indique que la sonde fluorescente peut considérablement affecter les capacités d'interaction de P36 avec les membranes. Le peptide C36, utilisé comme contrôle positif, a quant à lui présenté des taux de fuite de 30%, 69% et 96% à des concentrations respectives de 0,1 μ M, 0,5 μ M et 2,5 μ M.

Ces résultats, associés aux mesures de dichroïsme circulaire, suggèrent que les peptides iCAL36, TRI36 et P36 n'interagissent pas avec les membranes lipidiques neutres et ne sont pas capables de les déstabiliser, et ce même à un ratio peptide/lipide très élevé. Il est donc très peu probable que leur mécanisme d'internalisation implique une translocation directe de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire.

4.4.2. *Importance relative des voies énergie-dépendantes dans le mécanisme d'internalisation de TRI36 et de P36*

Les multiples mécanismes d'internalisation cellulaire observables pour les CPP sont globalement répartis en deux classes : les mécanismes dits « d'endocytose » qui correspondent aux mécanismes cellulaires « naturels » d'entrée des biomolécules dans la cellule, et les mécanismes de translocation directe de nature physico-chimique indépendants des processus cellulaires. Les voies d'endocytose sont des mécanismes énergie-dépendants qui requièrent de l'ATP (adénosine triphosphate), ils peuvent donc être inactivés par l'absence de leurs sources d'énergie. La transfection des conjugués *CPP-iCAL36 a donc été réalisée soit à basse température (4°C), ce qui diminue le métabolisme cellulaire et désactive les voies d'endocytose, soit en présence d'azoture de sodium (NaN₃) et de 2-déoxyglucose (DG), qui provoquent respectivement la déplétion des stocks d'ATP cellulaire et le blocage de la glycolyse qui génère l'ATP. Les cellules Caco-2 ont été ensemencées dans une plaque 24 puits puis cultivées pendant 36 heures jusqu'à atteindre 50% de confluence. Elles ont ensuite été prétraitées pendant 30 min par l'une des conditions suivantes, puis transfectées par les conjugués fluorescents *TRI36 (5 µM) ou *P36 (1 µM) dans l'OptiMEM pendant 1,5 heures en maintenant les conditions bloquant l'endocytose. Elles ont ensuite été trypsinées, traitées et analysées (**Figure 4.10**).

La déplétion d'ATP (NaN₃/DG) induit une légère cytotoxicité par rapport aux cellules incubées en condition standard (37°C), qui est un peu moins observée pour TRI36, tandis que la réduction de la température à 4°C n'a pas d'atteinte significative sur la viabilité cellulaire. L'internalisation des deux peptides semble significativement réduite sous déplétion d'ATP (55% du signal à 37°C) et est quasiment perdue à 4°C (10-15% du signal à 37°C).

Il a paru étonnant que la perte de signal constatée sous déplétion d'ATP soit moins forte que celle observée à 4°C. Afin de s'assurer que l'incubation NaN₃/DG induit bien la déplétion d'ATP, une expérience contrôle a été effectuée : les cellules Caco-2 ont été co-incubées avec la protéine transferrine (marqueur spécifique de l'endocytose clathrine- et énergie-dépendante) marquée par une sonde Alexa488, en condition standard (37°C) ou en présence de NaN₃/DG. Dans cette condition, on observe une réduction significative du signal de fluorescence (60% du signal initial) après déplétion d'ATP (données non-présentées). Cela confirme que la perte partielle de signal observée en présence de NaN₃/DG est due à la déplétion d'ATP, mais que celle-ci est incomplète. Cela peut être dû aux doses de NaN₃/DG, qui sont modérées afin de ne pas induire une toxicité cellulaire trop forte.

Ces résultats, associés à l'absence d'interaction entre les peptides TRI36 et P36 et les membranes (pas de fuite liposomale *in vitro*, pas de co-localisation avec le WGA *in cellulo*), suggère que le mécanisme d'internalisation cellulaire de ces peptides est très probablement dépendant des voies d'endocytose dans nos conditions expérimentales.

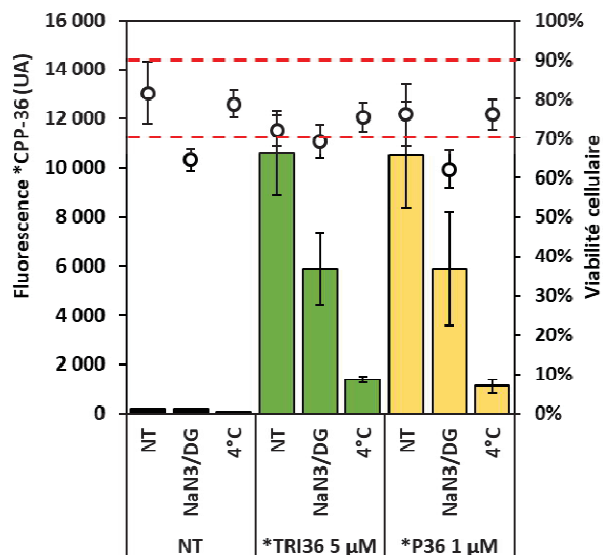


Figure 4.10. Analyse du mécanisme d'internalisation énergie-dépendant des conjugués *TRI36 et de *P36 dans des cellules Caco-2.

Des cellules Caco-2 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être prétraitées par NaN₃/DG ou refroidies à 4°C pendant 30 min, incubées dans ces conditions avec *TRI36 (5 μM) ou *P36 (1 μM) dans l'OptiMEM pendant 1,5 h. Les échantillons cellulaires ont été lavés, trypsinés, centrifugés, repris dans un tampon contenant 0,1% de DAPI puis analysés par cytométrie de flux. NT : cellules non-traitées. Le traitement par NaN₃/DG induit une légère cytotoxicité et une perte de 45% de l'efficacité de transfection des deux peptides. L'incubation à 4°C n'affecte pas la viabilité cellulaire mais induit une perte de 85-90% de l'efficacité de transfection des deux peptides.

4.4.3. Implication de voies d'endocytose spécifiques dans le mécanisme d'internalisation de TRI36 et de P36

Les CPP entrant dans la cellule par endocytose peuvent suivre trois voies principales : l'endocytose clathrine-dépendante, cavéoline-dépendante ou la macropinocytose. Afin de déterminer lesquelles de ces voies sont impliquées dans l'internalisation cellulaire des conjugués *TRI36 et *P36, nous avons réalisé des expériences de colocalisation de ces conjugués avec des marqueurs spécifiques d'endocytose. Les cellules ont été co-incubées avec les conjugués *TRI36 (5 μM) ou *P36 (1 μM) et l'un des marqueurs d'endocytose suivants dans l'OptiMEM pendant 1,5 heures (**Figure 4.11**).

- La transferrine (portant une sonde Alexa-488 : Transferrine-488) pénètre les cellules exclusivement par endocytose clathrine-dépendante ;
- La sous-unité B de la toxine du choléra (avec une sonde Alexa-488 : CtB-488) suit sélectivement l'endocytose cavéoline-dépendante ;
- Le dextran (avec marquage pHrodo Green : Dextran-Green) est un substrat sélectivement internalisé par macropinocytose.

La colocalisation de *TRI36/*P36 avec CtB-488 ou Dextran-Green est relativement forte, alors que la colocalisation avec la transferrine-488 est plus modérée. Pour confirmer la spécificité de cette colocalisation, le signal des marqueurs seuls a également été enregistré. Le signal de Transferrine-488 et de Dextran-Green est fort et homogène ; en revanche le signal de CtB-488 seul est extrêmement faible, alors qu'en présence de *TRI36/*P36 on observe un fort signal intracellulaire de CtB-488 qui colocalise avec le peptide. Ces résultats semblent indiquer que CtB-488 est internalisée par la cellule par interaction avec les conjugués *CPP-iCAL36, et que l'endocytose cavéoline-dépendante est faiblement efficace dans les cellules Caco-2. Dans ce cas, le mécanisme d'entrée des peptides ne nécessiterait pas exclusivement l'endocytose cavéoline-dépendante.

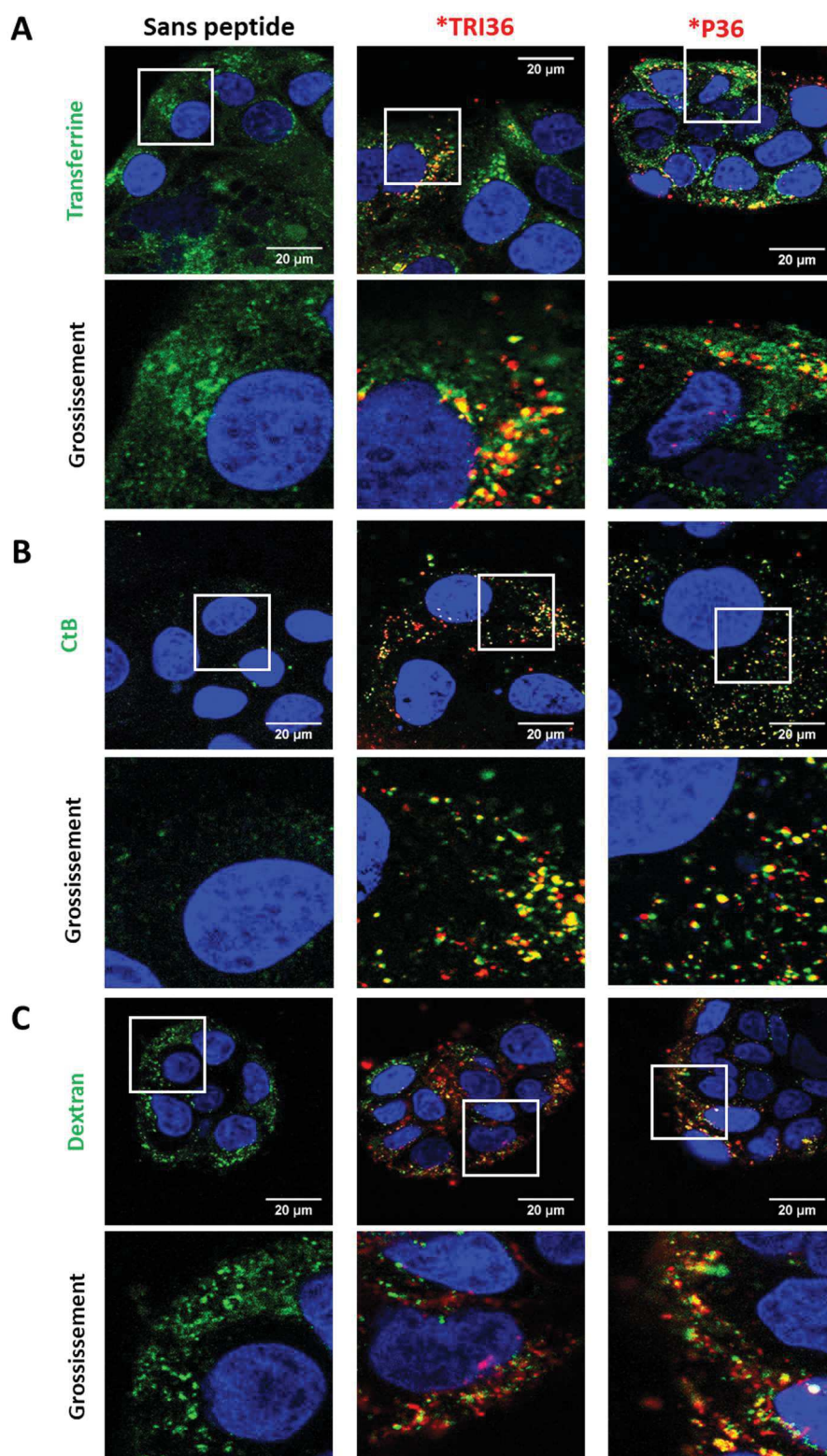


Figure 4.11. Images représentatives de la colocalisation de *TRI36 et de *P36 avec des marqueurs d'endocytose dans des cellules Caco-2.

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de microscopie à fond en verre (300.000 c/mL) puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂, avant d'être co-incubées pendant 1,5 h avec *TRI36 (5 μM) ou *P36 (1 μM) et l'un des marqueurs Transferrine-488 (A), CtB-488 (B) ou Dextran-Green (C) dans l'OptiMEM, puis marquées avec Hoechst 33342 (bleu), lavées et observées. La colocalisation entre le peptide (rouge) et le marqueur d'endocytose (vert) apparaît en jaune. De façon similaire pour les deux peptides, la colocalisation avec CtB-488 et Dextran-Green est marquée, alors que la colocalisation avec Transferrine-488 est plus modeste. Le signal de fluorescence de CtB-488 est très peu visible en absence de *CPP-iCAL36, ce qui pourrait souligner une faible efficacité de l'endocytose cavéoline-dépendante dans les cellules Caco-2.

Pour élucider cette question, des cellules Calu-3 ont été transfectées avec CtB-488 en absence et en présence des peptides *TRI36 ou *P36. En absence de peptide, CtB-488 donne un signal intracellulaire visible et homogène dans le cytosol. En présence du peptide, le signal de CtB-488 reste homogène, en contraste avec le peptide qui présente un signal ponctué et un faible degré de colocalisation avec CtB-488 (données non-présentées). Il est donc très probable que les cellules Caco-2 n'internalisent CtB-488 que lorsqu'elle est complexée aux conjugués *CPP-iCAL36, par une voie indépendante de la cavéoline.

Afin de mieux comprendre ces résultats, nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs spécifiques de ces voies d'endocytose sur l'efficacité de transfection des conjugués *TRI36 et *P36. En effet, ces mécanismes impliquent des interactions avec des partenaires spécifiques qui peuvent donc être saturés ou inhibés pharmacologiquement. L'inhibition d'une voie d'endocytose et la mesure de l'efficacité de transfection d'un CPP ou d'un CPP-conjugué dans ces conditions permettraient donc, par comparaison, d'estimer l'importance de cette voie dans le mécanisme d'entrée du peptide. Les inhibiteurs suivants ont été utilisés :

- La chlorpromazine (CPZ) est un inhibiteur sélectif de l'endocytose clathrine-dépendante²⁹⁷⁻²⁹⁹ ;
- La nystatine (NYS) permet d'inhiber sélectivement l'endocytose cavéoline-dépendante²⁹⁷ ;
- La méthyl- β -cyclodextrine (MbCD) inhibe la macropinocytose^{298,299}, mais peut aussi affecter l'endocytose cavéoline-dépendante²⁹⁷.

Les cellules Caco-2 ont été prétraitées pendant 30 min par l'un des trois inhibiteurs d'endocytose, puis les conjugués *TRI36 (5 μ M) ou *P36 (1 μ M) ont été ajoutés pour une incubation de 1,5 heures (**Figure 4.12**).

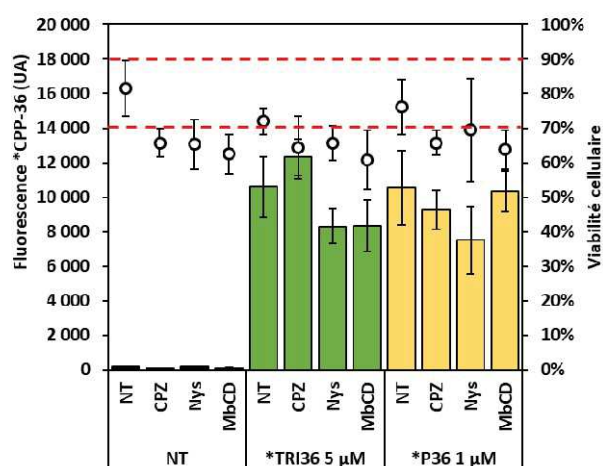


Figure 4.12. Influence de l'inhibition sélective des voies d'endocytose sur la transfection de *TRI36 et de *P36 dans des cellules Caco-2.

Des cellules Caco-2 ont été ensemencées dans des plaques 24 puits puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être prétraitées par un inhibiteur d'endocytose (CPZ, NYS ou MbCD) pendant 30 min, puis incubées dans ces conditions avec les conjugués *TRI36 (5 μ M) ou *P36 (1 μ M) dans l'OptiMEM pendant 1,5 h. Les échantillons cellulaires ont été lavés, trypsinés, centrifugés, repris dans un tampon contenant 0,1% de DAPI puis analysés par cytométrie de flux. NT : cellules non-traitées. Le traitement par les inhibiteurs d'endocytose induit une cytotoxicité significative, mais ne provoque pas de perte significative de l'efficacité de transfection des deux peptides.

Le traitement des cellules Caco-2 par CPZ, NYS ou MbCD induit une légère cytotoxicité (5-20% de perte de viabilité) par rapport aux cellules non-traitées (80% $\pm$ 10%). Toutefois, les inhibiteurs d'endocytose ne mènent à aucune variation significative de la fluorescence intracellulaire des peptides *TRI36 et *P36 : seules de légères diminutions (22-29%) non-significatives sont observables en présence de NYS pour les peptides *TRI36 et *P36, et en présence de MbCD pour le peptide *TRI36 (22%).

Il n'est donc pas possible de clairement déduire de ces résultats quelles voies d'endocytose sont empruntées par les peptides. Cependant, ces résultats peuvent aussi indiquer que lorsque l'une des voies d'endocytose est inhibée, d'autres voies peuvent alors être impliquées dans l'internalisation des peptides.

En conclusion, ces résultats semblent indiquer que les peptides *TRI36 et *P36 peuvent suivre une ou plusieurs voies d'endocytose, mais il est difficile de déterminer avec certitude lesquelles de ces voies sont employées. Il serait intéressant de tester d'autres inhibiteurs ou marqueurs de ces voies pour mieux comprendre l'implication des différentes voies d'endocytose dans le mécanisme d'internalisation des conjugués CPP-iCAL36.

4.4.4. *Trafic intracellulaire des conjugués *TRI36 et *P36*

Pour compléter l'étude du mécanisme d'internalisation des conjugués *CPP-iCAL36, nous nous sommes intéressés à leur devenir une fois à l'intérieur de la cellule. Un composé absorbé par endocytose sera encapsulé dans des endosomes (dits endosomes précoces) dont le pH sera progressivement acidifié au cours de leur parcours dans la cellule : ils deviendront des endosomes dits tardifs, puis fusionneront avec les lysosomes où les peptides seront recyclés ou dégradés. Pour observer une activité des conjugués CPP-iCAL36 entrant par endocytose, il est vital qu'ils puissent s'échapper des endosomes : il serait donc intéressant d'évaluer leur potentiel à sortir des endosomes.

Le peptide, de par son accumulation dans les endosomes, voit sa concentration locale augmenter et peut être alors partiellement soumis à un phénomène de quenching de proximité (voir chapitre 3) induisant une diminution de fluorescence globale intracellulaire. Lorsque le peptide s'échappe des endosomes, le quenching de proximité partiel est aboli, ce qui engendre une augmentation de la fluorescence intracellulaire. Pour évaluer ce phénomène, il est possible de traiter les cellules par de la chloroquine (CQ), une petite molécule pharmacologique qui bloque l'acidification des endosomes et provoque le relargage de leur contenu dans le cytosol^{300,301}. La variation de fluorescence observée permet d'évaluer qualitativement la proportion de peptide piégé dans les endosomes.

Les cellules Caco-2 ont été prétraitées pendant 30 min avec CQ, puis les conjugués *TRI36 (5 μ M) ou *P36 (1 μ M) ont été ajoutés pendant 1,5 heures toujours en présence de la CQ (**Figure 4.13A**). Le traitement des cellules Caco-2 par la CQ n'induit pas de cytotoxicité significative par rapport aux cellules non-traitées (80% $\pm$ 10%). En revanche, l'ajout de CQ double le signal de fluorescence intracellulaire des conjugués *TRI36 et *P36, ce qui met en évidence le relargage des peptides hors des endosomes. Ces résultats confirment l'implication d'un mécanisme d'endocytose et indiquent qu'une fraction non-négligeable des conjugués *CPP-iCAL36 est piégée dans les endosomes après 1,5 h de transfection. Les mêmes conclusions ont été observées sur des cellules CFBE41o- (**Figure 4.13B**), indiquant que le mécanisme d'endocytose et le piégeage par les endosomes ne sont pas spécifiques des cellules Caco-2.

Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences de colocalisation entre les conjugués *CPP-iCAL36 et des marqueurs spécifiques des endosomes précoces (EE-GFP), des endosomes tardifs (LE-GFP) et des lysosomes (LysoTracker®) (**Figure 4.14**).

Les deux peptides ne colocalisent pas avec les marqueurs des endosomes précoces. En revanche, ils présentent un degré de colocalisation modéré avec les endosomes tardifs et une colocalisation forte avec

les lysosomes. Ces résultats semblent indiquer qu'après 1,5 h d'incubation, la majorité du peptide internalisé par endocytose se retrouve dans les lysosomes. Pour obtenir plus d'informations, il serait intéressant d'observer les cellules après un temps de transfection plus réduit (15-30 minutes) ou en suivi cinétique (« *time-lapse* » en microscopie confocale).

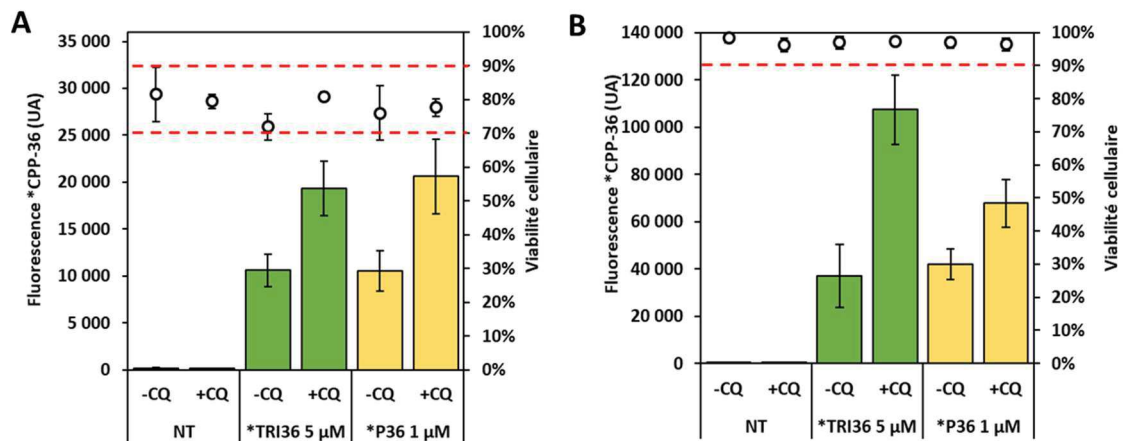


Figure 4.13. Influence du relargage des conjugués *TRI36 et de *P36 hors des endosomes suite au traitement à la chloroquine.

Des cellules Caco-2 (A) et CFBE410- (B) ont étéensemencées dans des plaques 24 puits puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ avant d'être traitées par de la chloroquine pendant 30 min, puis incubées avec *TRI36 (5 μ M) ou *P36 (1 μ M) dans l'OptiMEM pendant 1,5 h. Les échantillons cellulaires ont été lavés, trypsinés, centrifugés, repris dans un tampon contenant 0,1% de DAPI puis analysés par cytométrie de flux. NT : cellules non-traitées. Le traitement par CQ n'induit pas de cytotoxicité significative, mais provoque une hausse significative du signal de fluorescence intracellulaire des deux peptides.

En revanche, lors de transfections avec *TRI36 (5 μ M) un marquage homogène du cytosol et du noyau de certaines cellules Caco-2 a pu être observé (Figure 4.15), en opposition aux signaux ponctuels habituellement visibles (Figure 4.4, 4.5, 4.11 et 4.14). Lors d'un marquage homogène du cytosol, la colocalisation du peptide et du marqueur de lysosomes (Lysotracker) est faible ou quasi-inexistante.

Des résultats préliminaires ont également montré qu'une augmentation de la concentration de peptide administrée aux cellules (jusqu'à 20 μ M) a été associée à une plus forte proportion de cellules présentant ce marquage homogène (données non-présentées). Ceci est intéressant au regard de différents travaux mettant en évidence qu'une variation de la concentration en peptide peut engendrer un changement de mécanisme d'internalisation de certains CPP d'une part^{267,302}, et qu'au-delà d'une concentration seuil le peptide est capable de s'échapper des endosomes d'autre part³⁰³. Des expériences complémentaires devront être menées pour évaluer la pertinence de cette hypothèse comme par exemple en mesurant *in vitro* le potentiel des peptides à déstabiliser les endosomes (*endosomal leakage*).

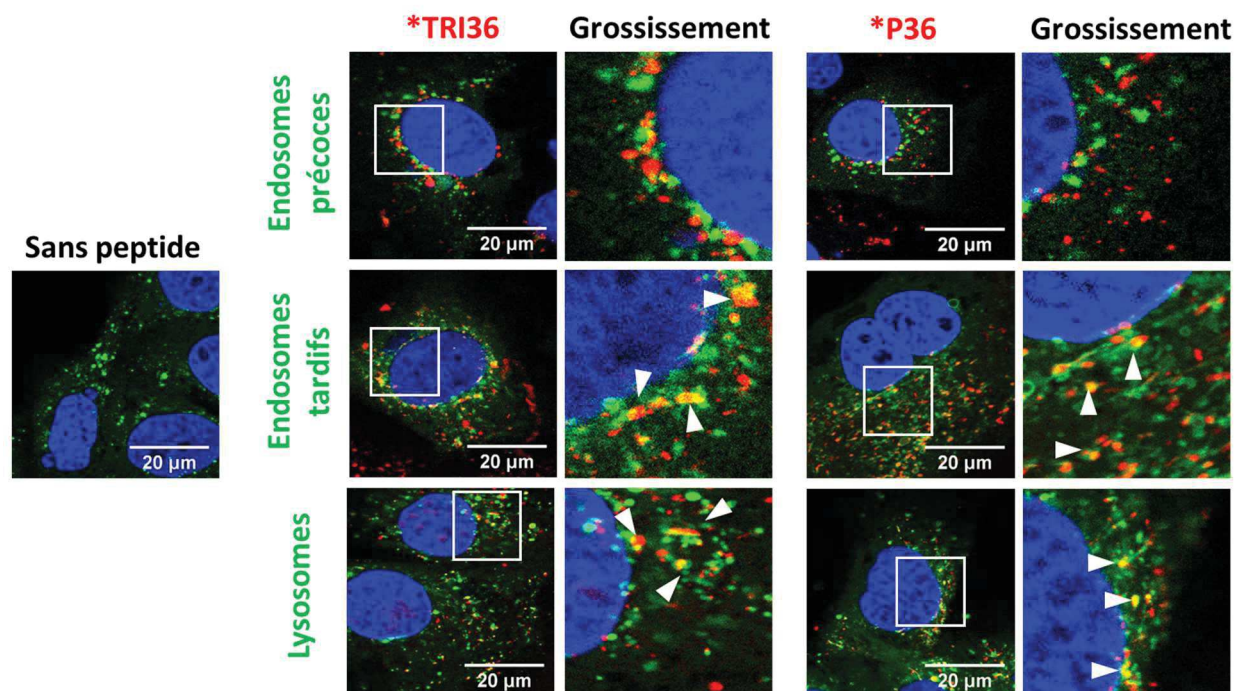


Figure 4.14. Images représentatives de la colocalisation des conjugués *TRI36 et de *P36 avec des marqueurs d'endosomes ou des lysosomes dans des cellules Caco-2.

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Petri à fond de verre (300.000 c/mL pour le marqueur de lysosomes, 150.000 c/mL pour les marqueurs d'endosomes) puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂ (dont >16 h avec les marqueurs d'endosomes), avant d'être incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 1,5 h avec *TRI36 (5 µM) ou *P36 (1 µM) dans l'OptiMEM, puis marquées avec Hoechst 33342 (bleu), lavées et observées. Pour le marquage des lysosomes, le LysoTracker® a été co-incubé avec les peptides. La colocalisation entre le peptide (rouge) et les marqueurs (vert) apparaît en jaune. De façon similaire pour les deux peptides, la colocalisation avec le marqueur d'endosomes précoces est nulle, la colocalisation avec le marqueur d'endosomes tardifs est plus intense et la colocalisation avec le marqueur de lysosomes est forte. Cela pourrait indiquer qu'au bout de 1,5 h, la fraction internalisée du peptide est soit relarguée dans le cytosol, soit déjà intégrée aux lysosomes.

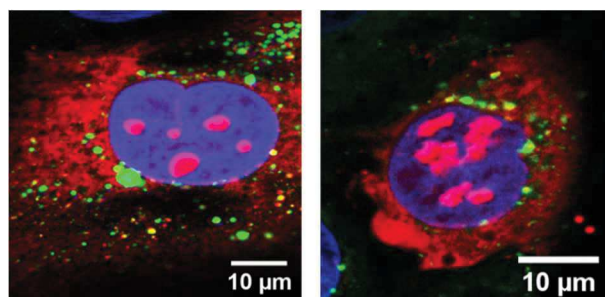


Figure 4.15. Images représentatives de cellules Caco-2 présentant un marquage homogène de peptide *TRI36.

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Petri à fond de verre (300.000 c/mL) puis cultivées 36 h à 37°C, 5% CO₂, avant d'être incubées pendant 1,5 h avec *TRI36 (5 µM) et le LysoTracker® dans l'OptiMEM, puis marquées avec Hoechst 33342 (bleu), lavées et observées. Le marquage de la cellule par *TRI36 (rouge) est homogène et observé dans le cytoplasme mais aussi dans les compartiments nucléaires. La colocalisation avec les lysosomes (vert) est faible et ne semble pas refléter une localisation du peptide dans les lysosomes.

4.4.5. Conclusion

Dans cette partie, nous avons caractérisé par différentes méthodes le mécanisme d'internalisation des conjugués *TRI36 et *P36 par les cellules Caco-2. Nous avons mis en évidence l'absence d'interaction des peptides marqués et non-marqués avec les bicouches lipidiques, puis prouvé la dépendance énergétique du mécanisme d'internalisation des peptides. Ces résultats, associés à l'étude de la localisation cellulaire des peptides, nous ont permis d'éliminer l'hypothèse d'un mécanisme de translocation directe aux concentrations étudiées. Les analyses suivantes ont fait apparaître la capacité de *TRI36 et *P36 à suivre un processus basé sur les voies d'endocytose. L'implication spécifique de ces différentes voies n'a toutefois pas pu être élucidée avec certitude. Enfin, en étudiant le devenir des peptides une fois dans la cellule, il est apparu qu'une part importante de *CPP-iCAL36 colocalise avec les lysosomes et y est probablement dégradée. Toutefois, dans certaines cellules on observe un marquage homogène du peptide associé à une colocalisation non-spécifique avec les lysosomes, ce qui pourrait indiquer une fuite des endosomes ou une translocation directe initiées à partir d'une concentration peptidique seuil. Des expériences complémentaires seront ultérieurement réalisées pour caractériser ce phénomène plus en détail.

Chapitre 5

-

**Optimisation du processus
des peptides inversés
(PIPE^{PLUS}) pour
le screening de ligands
des domaines PDZ
(Publication 2)**

Optimization of the process of inverted peptides (PIPE^{PLUS}) to screen PDZ domain ligands.

Seisel et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27(14): 3111-3116, 2017.

Les domaines PDZ constituent une classe majeure de domaines d'interaction protéine-protéine. Ils sont constitués de 80-90 résidus et interagissent avec leurs ligands selon différents modes : le plus répandu repose sur l'interaction protéine-protéine (PPI) entre l'extrémité C-terminale du ligand avec une poche hydrophobe très conservée du domaine PDZ. Ces domaines sont impliqués dans une multitude de processus biologiques dérégulés au cours de certaines pathologies (mucoviscidose, cancer...), ce qui rend le développement de peptides d'interface permettant la disruption de ces PPI extrêmement attractif.

Les PPI peuvent être criblées par des méthodes telles que le double hybride, le phage display ou la synthèse SPOT, qui a considérablement gagné en efficacité et en simplicité d'utilisation ces dernières années. Elle permet la préparation d'une librairie de peptides supportée sur une feuille de cellulose, qui peut ensuite être incubée avec une protéine d'intérêt et ainsi révéler les interactions peptide/protéine subséquentes. La chimie d'activation utilisée pour coupler les acides aminés implique que les peptides générés soient ancrés à la membrane *via* leur extrémité C-terminale, or cette dernière est requise pour l'interaction avec le domaine PDZ. Notre équipe a donc développé le processus du peptide inversé, qui permet de synthétiser les peptides en utilisant une chimie « classique » puis d'inverser l'orientation du peptide en trois étapes : l'incorporation d'une liaison acido-labile avec le carboxyle de l'acide aminé en position C-terminale, la cyclisation du peptide *via* un motif bromoacétylé N-terminal, et l'hydrolyse du motif acido-labile qui résulte en la libération de l'extrémité C-terminale du peptide (voir figure 1B de la publication ci-après). Dans le cadre de cette thèse, j'ai cherché à renforcer le pouvoir de résolution de cette procédure en optimisant ses étapes-clés.

L'efficacité chimique de ces étapes est le paramètre-clé de la qualité des signaux visibles à l'issue de l'incubation entre la banque peptidique et la protéine d'intérêt. Nous reportons dans cet article deux améliorations du protocole actuel. Nous avons pu observer que cette méthode optimisée (PIPE^{PLUS}) a un pouvoir de résolution très fortement augmenté par rapport à des résultats antérieurs, puis avons démontré qu'il était possible de synthétiser des banques peptidiques incluant des acides aminés non-naturels (NNAAs) tout en conservant ce fort pouvoir de discrimination entre différentes séquences substituées.

Dans un premier temps nous avons développé un nouveau support fonctionnalisé (membrane PUC) pour le couplage des acides aminés, issu de l'activation de la cellulose avec le 1,1-carbonyldiimidazole puis du piégeage de l'intermédiaire réactionnel correspondant par le 1,3-diaminopropane. Comparé aux méthodes précédentes (ex : membrane N-CAPE), cette fonctionnalisation ne requiert pas de conditions anhydres, de réactifs coûteux ou toxiques, et permet la formation d'un support dont la densité en fonctions amine peut être finement contrôlée en faisant varier la quantité de 1,3-diaminopropane introduit. Cette propriété permet d'optimiser la densité peptidique de la membrane selon la taille des protéines utilisées, et donc de maximiser le ratio signal/bruit lors de la révélation des PPI.

Nous avons ensuite optimisé la réaction de cyclisation permettant la connexion/déconnexion du peptide. En comparaison des conditions précédentes à base de carbonate de césium, l'incubation dans une solution aqueuse de bicarbonate de sodium permet une réaction à pH plus neutre et prévient l'apparition de réactions secondaires indésirables. Le bromoacétate de N-hydroxysuccinimide (BrAcOSu) a également été identifié comme un agent bromoacétylant plus efficace, permettant un couplage quantitatif et une

hausse de rendement de cyclisation. Il s'agit également d'un réactif commercial, contrairement à l'agent bromoacétylant précédemment utilisé dont la synthèse est plus fastidieuse.

Nous avons ensuite appliqué ce nouveau protocole (PIPE^{PLUS}) à l'analyse de substitution du peptide iCAL36 (ANSRWPTSII) par les 20 acides aminés naturels de configuration L et avons incubé la banque peptidique correspondante avec le domaine PDZ de la protéine CAL. En comparaison des résultats obtenus avec la méthode publiée en 2007, le processus PIPE^{PLUS} permet une sélection grandement renforcée entre les différentes séquences : en particulier une forte sélectivité est obtenue pour la position P⁰ du peptide, ce qui souligne mieux la préférence connue de la protéine pour les résidus hydrophobes ramifiés.

Enfin, une analyse de substitution du peptide iCAL36 utilisant un set de 12 NNAA a permis de mettre en évidence de potentiels remplacements au sein de la séquence d'iCAL36, menant à des séquences modifiées toujours capables d'interagir avec le domaine PDZ de CAL. La quantification de ces signaux a montré que ces peptides pourraient même avoir une affinité supérieure à celle d'iCAL36. Il apparaît que plusieurs signaux positifs correspondent à l'introduction d'analogues proches des acides aminés de la séquence native (exemple : remplacement de l'isoleucine en P⁰ par la norleucine ou la norvaline), ce qui souligne le rationnel des résultats ainsi que leur pertinence. Cependant, certains remplacements inattendus sont également observés et pourraient permettre la découverte de nouveaux analogues du peptide iCAL36. De plus, ces nouveaux analogues pourraient avoir une stabilité métabolique renforcée par l'introduction des NNAA, qui sont plus difficilement reconnus par les protéases.

En conclusion, nous avons optimisé la méthode du peptide inversé et renforcé ainsi son pouvoir de résolution. Outre une sensibilité améliorée, la méthode PIPE^{PLUS} permet l'introduction de NNAA dans les séquences peptidiques, ouvrant la porte à une diversité moléculaire quasi-infinie et menant au développement de peptides d'interface plus affins, sélectifs et stables. En particulier, dans le cas du traitement de la mucoviscidose, l'exploitation de la méthode PIPE^{PLUS} nous permettra d'inclure des NNAA dans la séquence d'iCAL36 et de concevoir des inhibiteurs de CAL de seconde génération. Les résultats de cette exploitation seront présentés en détail dans le chapitre 6.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



Optimization of the process of inverted peptides (PIPE^{PLUS}) to screen PDZ domain ligands



Quentin Seisel^a, Marisa Rädisch^b, Nicholas P. Gill^c, Dean R. Madden^c, Prisca Boisguerin^{a,*}

^a Centre de Recherche de Biologie cellulaire de Montpellier, CNRS UMR 5237, Université de Montpellier, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

^b Bioorganische Chemie, Universität Bayreuth, Gebäude NW 1, 95440 Bayreuth, Germany

^c Department of Biochemistry & Cell Biology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, 7200 Vail Building, Hanover, NH 03755-3844, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2017

Revised 12 May 2017

Accepted 13 May 2017

Available online 15 May 2017

Keywords:

SPOT synthesis

C-terminus

PDZ domain

Peptide array

Cellulose functionalization

ABSTRACT

PDZ domains play crucial roles in cell signaling processes and are therefore attractive targets for the development of therapeutic inhibitors. In many cases, C-terminal peptides are the physiological binding partners of PDZ domains. To identify both native ligands and potential inhibitors we have screened arrays synthesized by the process of inverted peptides (PIPE), a variant of SPOT synthesis that generates peptides with free C-termini. Here, we present the development of a new functionalized cellulose membrane as solid support along with the optimized PIPE^{PLUS} technology. Improved resolution and accuracy of the synthesis were shown with peptide arrays containing both natural and non-natural amino acids. These new screening possibilities will advance the development of active, selective and metabolically stable PDZ interactors.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

While small molecules have traditionally dominated medicinal chemistry,¹ peptides have gained interest and are now broadly used as therapeutic or diagnostic tools.² Compared to small molecules, peptides display high selectivity and potency; they often exhibit good tolerability and predictable metabolism.³ In particular, peptides show promise as inhibitors of protein-protein interactions (PPIs) that regulate a variety of cell signaling processes.⁴ A common class of PPIs is mediated by PDZ domains, which are named after the proteins in which they were first discovered: *post-synaptic density 95* (PSD-95), *disc large tumor suppressor* (DlgA), and *zonula occludens 1* (ZO-1).⁵ These domains are found in many human proteins. They are composed of 80–90 amino acids and most commonly recognize the C-terminal carboxylate and four to seven residues of peptide ligands.^{6,7} PDZ domain-mediated interactions (PDMIs) are involved in the transient assembly and localization of macromolecular complexes associated with fundamental cellular functions such as polarization, protein trafficking, tight-junction formation, and intercellular communication.^{8–10} In addition, individual PDZ domains have been implicated in many human diseases (e.g. cystic fibrosis¹¹, glioblastoma¹²) and are attractive therapeutic targets for the development of peptidyl inhibitors.

Yeast two-hybrid,¹³ phage-display,¹⁴ and SPOT synthesis¹⁵ approaches have been used to screen PPIs and develop putative peptidyl inhibitors. SPOT synthesis, which has progressively gained interest due to its accuracy and versatility, allows for the rapid synthesis of arrays of peptides grafted onto a cellulose support (Fig. 1A).¹⁶ A synthesized peptide array can be incubated with any desired protein, followed by immunoblotting to reveal novel PPI sequences.

However, in standard SPOT synthesis, the resulting peptides are C-terminally attached to the membrane, making this technique unsuitable for the screening of PDZ domain ligands. Therefore, methods for generating peptides with free carboxyl functions have been developed and improved over the years.^{17–19} In the latest version, known as the “process of inverted peptides” (PIPE), peptide orientation is inverted in three steps (Fig. 1B): 1) synthesis of the peptide with the incorporation of *p*-hydroxymethylphenoxyacetic acid (HMPA) as an acid-labile linker; 2) cyclization of the peptide chain involving an N-terminal bromoacetyl function; and 3) hydrolysis of the acid-labile bond with concomitant side-chain deprotection.

Within this PIPE protocol, several steps are crucial in determining peptide quality, which in turn governs the signal-to-noise ratio and the probability of false-positive or false-negative results. In this study, we present: 1) the development of a new amino-functionalized cellulose membrane; 2) optimization of the PIPE protocol and 3) proof-of-principle for the identification of PDZ-binding peptides containing non-natural amino acids.

* Corresponding author.

E-mail address: prisca.boisguerin@crbm.cnrs.fr (P. Boisguerin).

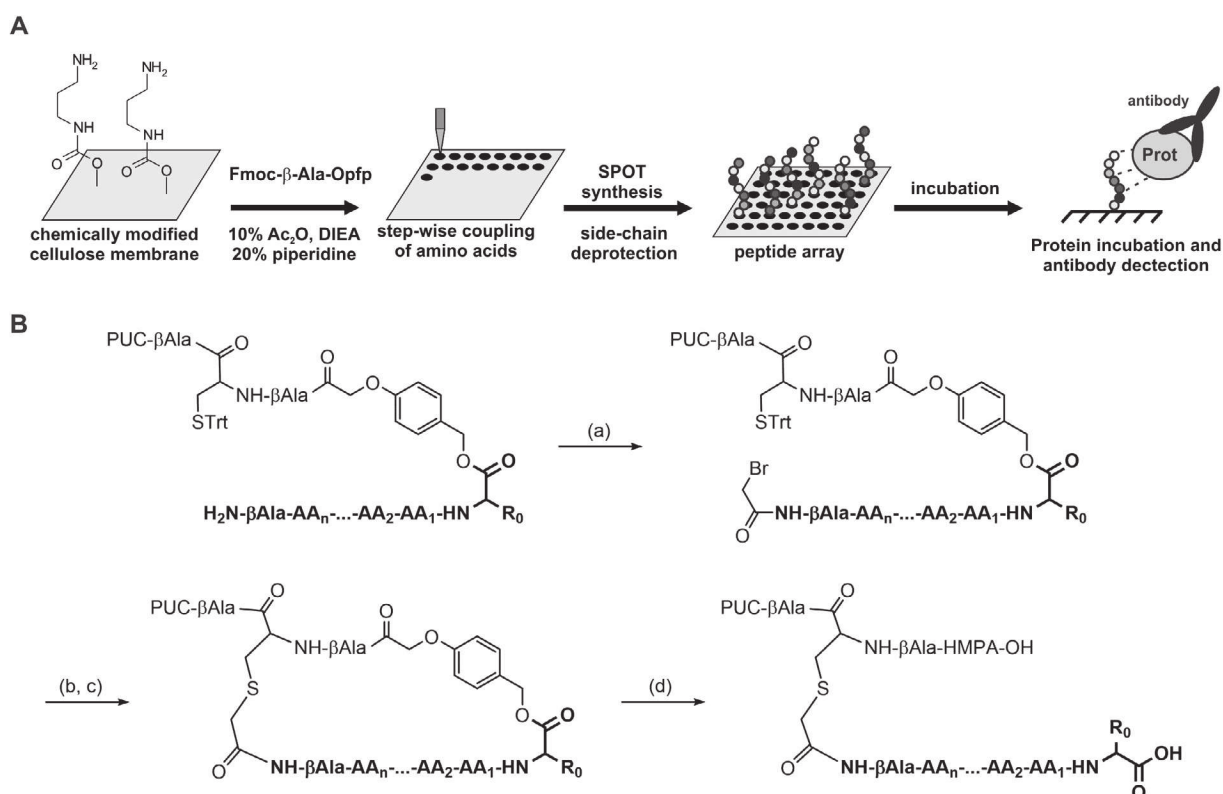


Fig. 1. SPOT synthesis and PIPE principles. (A) General concept of the SPOT synthesis. (B) Key steps of the process of inverted peptides. (a) Coupling of the bromoacetyl moiety (1 M in DMF, 4-time coupling, 15 min reaction each), (b) selective cysteine detritylation with TFA (7% in DCM), (c) macrocycle formation, (d) one-pot acid cleavage and side chain deprotection (60% TFA followed by 90% TFA).

To date, N-modified cellulose-amino-hydroxypropyl ether (N-CAPE) membranes^{18,19} have been used as supports for PDZ peptide arrays generated by the PIPE protocol.¹⁹ On N-CAPE membranes, the required amine functionalization is provided by a stable ether bond between the hydroxyl groups of the cellulose and the free amine anchors on which the peptide chain will be elongated. However, the epibromohydrin moiety used to attach the diamine functional group is light-sensitive and very hygroscopic, complicating the preparation. Hence, one of our goals was to develop a more facile synthesis of amino-functionalized membranes that would be compatible both with standard SPOT synthesis and the PIPE variant.

Along with ether formation, cellulose hydroxyl groups can also be functionalized via carbamate synthesis. Based on the work of Stöllner et al.²⁰, we activated the hydroxyl function of the cellulose membrane with 1,1-carbonyldiimidazole (CDI, 45 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$) in acetone, followed by an overnight incubation with 1,3-diaminopropane (DAP, 1 M) in carbonate buffer, leading to the propylamine urethane cellulose (PUC) membrane, as shown in Fig. 2. The PUC membrane exhibited an amine density of 900–1000 nmol.cm^{-2} , a value comparable with the amine density observed for N-CAPE membranes (200–1200 nmol.cm^{-2} ; Ref. 16).

The stability of the amino functionalization was assessed by coupling Fmoc- β Ala-OPfp (0.3 M, 2 $\times$ coupling) to a PUC membrane (1000 nmol.cm^{-2}), which was subsequently incubated with the different chemical solvents/conditions used during the PIPE process. Titration of the Fmoc group revealed no significant difference in the stability of the β -alanine linkage compared to untreated membranes (still approximately 1000 nmol.cm^{-2} , data not shown). As expected, no impairment of the PUC amine functionality is observed upon treatment with the conditions used during the SPOT or PIPE synthesis.

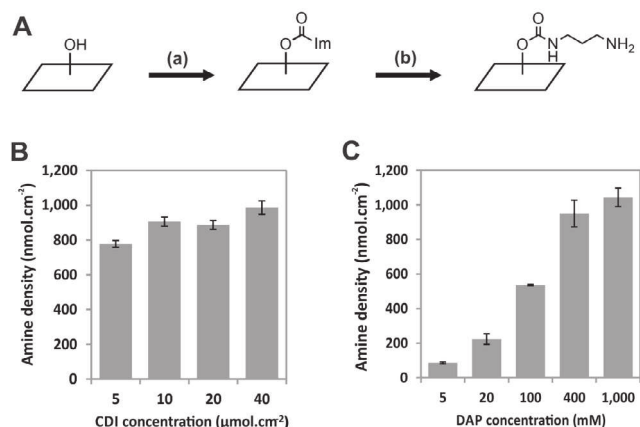


Fig. 2. Synthesis and characterization of the PUC membrane. (A) Schematic representation of the PUC membrane functionalization. (a) CDI: 1,1-carbonyldiimidazole (5–40 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$) in acetone, 4 h at room temperature. (b) DAP: 1,3-diaminopropane (5–1000 mM) pH 9.6, 3–24 h at room temperature. (B) CDI concentration modestly affects amine density (means $\pm$ SD, $n = 3$). (C) DAP concentration influences the amine density of the PUC membrane (means with ranges, $n = 2$). The extent of membrane amino-functionalization was quantified via Fmoc titration (see Materials and Methods).

Because peptide density on the cellulose membrane has an impact on the downstream protein screen (e.g., via steric hindrance), it was important to determine and control the parameters that influence the yield of amino-functionalization. Replacing the acetone by a less polar solvent such as 1,4-dioxane substantially reduced efficiency, as no amino-functionalization was observed.

We next studied the influence of the concentrations of CDI and DAP on amine density. Decreasing the CDI concentration to as little

as $5 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ did not substantially reduce amino-functionalization (Fig. 2B). However, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$ CDI yielded the most consistent amine densities both within and between membranes (Table S1), so this value was used for all subsequent experiments. In contrast to the experiments with CDI, amine density quantification revealed a clear dose-dependent effect of initial DAP concentration (Fig. 2C). As for the CDI-concentration experiments, we observed that the measured amine densities were highly reproducible at each of the DAP concentrations tested. Finally, we showed that shorter DAP incubation periods (≥ 3 h, 20 mM) are enough to obtain an amine density of $200 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ (Table S3).

These findings implied that PUC membranes can be synthesized in a reproducible and controlled fashion at amine densities ranging from 100 to $1000 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$. More importantly, this membrane functionalization does not require the anhydrous conditions that are critical for epibromohydrin coupling during N-CAPE preparation.²¹ For the following experiments designed to optimize the PIPE protocol, we selected a DAP concentration of 20 mM, which results in PUC membranes with a loading capacity of $200 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$. This value is comparable to the loading yields of the commercially available Amino-PEG₅₀₀-UC540 ($400 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$, AIMS Scientific Products GmbH) and to previously used N-CAPE membranes. Additionally, in our experience, starting the synthesis with a membrane loading capacity of $200 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$ has yielded arrays used successfully for screening a wide range of PDZ domains.^{18,19,22,23}

During the PIPE protocol, macrocycle formation is one of the most critical steps. Cyclization is a prerequisite for the inversion of the peptide at the cellulose membrane, and the efficiency of the reaction is controlled by both the reagent and conditions. Typically 2,4-dinitrophenyl bromoacetate (BrAc-DNP) and cesium carbonate are used. However, neither is ideal. BrAc-DNP is not commercially available, and cesium ions can over-activate the cyclizing cysteine (referred to as the cesium effect²⁴). Therefore, we decided to optimize the coupling method with respect to both of these reagents.

To address cyclization conditions, we compared the standard solvent mixture ($\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ 0.05/0.5/0.5 [w/v/v]) to several milder conditions such as 2x-concentrated tris-buffered saline (TBS-2X)²⁵ and aqueous sodium bicarbonate (aq. NaHCO_3 0.1 M)²⁶ (Table 1). For this purpose, short peptides were synthesized on a PUC membrane modified with HMPA- β Ala-Cys(Trt)- β Ala (HMPA-BCB), onto which we coupled *N*-hydroxysuccinimidyl bromoacetate (BrAc-OSu) as a cyclization agent. Coupling efficiency of BrAc-OSu was confirmed by mass spectrometry (Fig. S1). After peptide cyclization, residual uncyclized peptide was released by TFA cleavage (Fig. S2). The amount of released peptide was determined by UV spectroscopy (A_{280}) (see details in the Supplementary Material). To calibrate the results, Fmoc- β Ala-OPfp was coupled to peptides instead of the cyclization agent, such that after TFA cleavage the obtained peptide amount was defined as the 100% value. Cyclization yields (%) for each condition were determined as a fraction of the value obtained with the linear β Ala-peptide (see also assay scheme in Fig. S2). This indirect quantification method was performed instead of mass spectrometry, as linear soluble peptides spontaneously cyclize in aqueous conditions, preventing accurate calculation of the cyclization ratio (data not shown). The results are shown in Table 1. They confirm a substantial improvement in yield with the bicarbonate-based conditions, which were used in the following experiments.

To determine the choice of cyclization reagent, we next tested a variety of compounds in the synthesis of peptides with different lengths (3-, 6- and 10-mer) and measured cyclization yields for each reagent as described above. First attempts using bromoacetyl bromide (BrAc-Br) or bromoacetic acid (BrAc-OH) activated with *N*-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) failed

Table 1

Yields obtained with different cyclization conditions.

Peptide length ^a	Cyclization conditions	Cyclization reagent	Cyclization yield %
3-mer ^b	aq. $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{DMF}^c$ TBS-2X aq. NaHCO_3 0.1 M	BrAc-OSu	25
		BrAc-OSu	Not observed
		BrAc-OSu	56
		BrAc-DNP	n.d.
		ClAc-OH	46
		BrAc-OH	50
		MalC3	n.d.
		MalC4	n.d.
6-mer ^b	aq. NaHCO_3 0.1 M	BrAc-OSu	50
		BrAc-DNP	24
		ClAc-OH	n.d.
		BrAc-OH	n.d.
		MalC3	20
		MalC4	35
10-mer ^b	aq. NaHCO_3 0.1 M	BrAc-OSu	44
		BrAc-DNP	33
		ClAc-OH	n.d.
		BrAc-OH	n.d.
		MalC3	17
		MalC4	22

n.d. = not determined.

^a Spotted sequences: Z-[AA]*n*-HMPA-BCB-PUC, with Z = cyclization reagent.^b 3-mer: WKL; 6-mer: GLSWKL; 10-mer: GALSGLSWKL.^c 5% $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ (w/v/v).

(data not shown). Other thiophilic reagents, including BrAc-OSu, chloroacetic acid (ClAc-OH), BrAc-OH, 3-maleimidopropionic acid (MalC3), and 4-maleimidobutyric acid (MalC4), each activated with 0.5 eq. *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC), were evaluated as more promising (Table 1). For all three peptide lengths, BrAc-OSu showed the highest cyclization yield. It was also more efficient than the standard reagent BrAc-DNP when compared directly in the synthesis of 6-mer or 10-mer peptides. Finally, we confirmed the result obtained with BrAc-OSu by mass spectrometry, which revealed the expected mass of the intact macrocyclic compounds (Table S2). These findings indicate that the peptides are not affected by possible side reactions, such as tryptophan bromoacetylation.

Taken together, these experiments allowed us to develop an improved PIPE process, defined as PIPE^{PLUS}, in which BrAc-OSu serves as a cyclization reagent in the presence of aq. NaHCO_3 . Using this method, we synthesized peptide arrays on a PUC membrane, at a density of $200 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-2}$. To assess the quality of the protocol with a more diverse set of sequences, we synthesized a substitutional analysis (SubAna) array for a peptide (ANSRWPTSII, also called iCAL36) that has been extensively studied by our group.^{27–30} This peptide has been shown to modulate the trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), by inhibiting its interaction with the PDZ domain of the CFTR-associated ligand (CALP). In brief, each residue of the iCAL36 sequence was individually replaced with each of the 20 naturally occurring L-amino acids to determine the key positions that contribute to CALP binding.²⁷ A PIPE^{PLUS} SubAna array was incubated with the CALP domain and washed to remove unbound protein. The interactions between the PDZ domain and the peptides in each spot were revealed using an HRP-based antibody sandwich system (see Supplementary Material).

As shown in Fig. 3A, the SubAna signals revealed a homogeneous signal for the wild-type (wt) column. To visualize the amino-acid preferences of iCAL36, signal intensities obtained for each spot were quantified and normalized relative to the mean values of the wt-spots (Fig. 3B). To evaluate the effects of single point mutations, the following thresholds were set for sequences with significantly higher, equal, or lower levels of bound CALP than

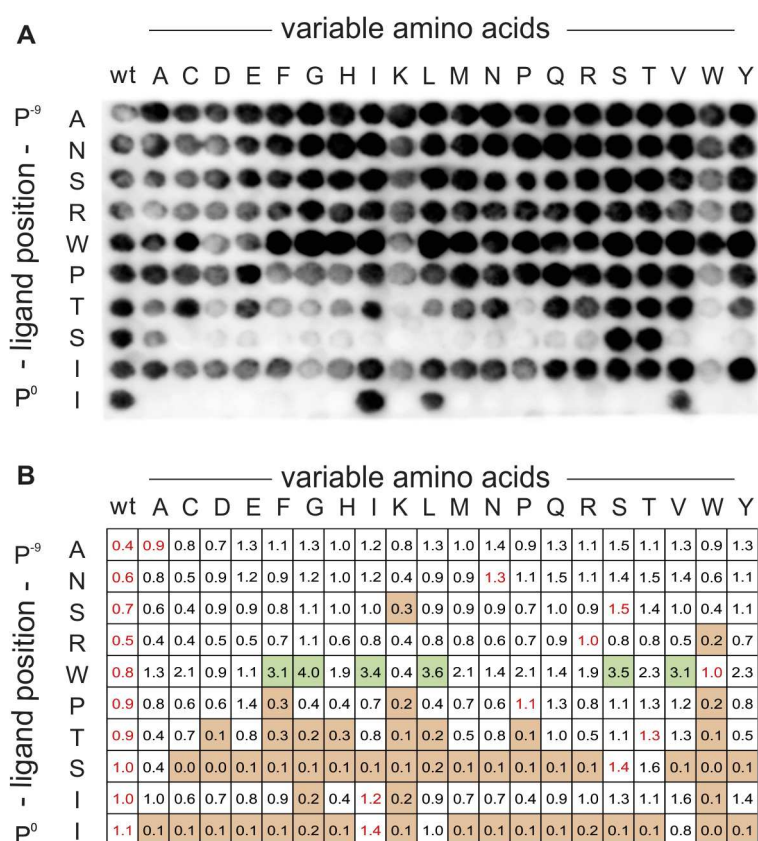


Fig. 3. Substitution analysis of the iCAL36 peptide with all natural L-amino acids. Every spot is labeled with the position of the mutation in the iCAL36 sequence (rows) and the identity of the amino-acid replacement (columns). All spots in the left-hand columns are identical and represent the wild-type (wt) peptide. (A) Chemiluminescence signals obtained after antibody incubation of the CAL PDZ incubated peptide array. (B) Quantification of the spot intensities was performed with ImageJ. Mean values of the wild-type (wt) sequences [first column and within the SubAna (written in red)] were used to normalize all values. Squares are color-coded to reflect normalized binding: green, values >1.6; white, values between 1.6 and 0.4; and orange, values <0.4.

the wt-sequence: > 1.6, 1.6–0.4, and < 0.4. CALP displayed strong preferences for I/L/V and S/T at position 0 (P⁰) and position -2 (P⁻²), respectively, where P⁰ is defined as the most C-terminal residue. These preferences are in excellent agreement with the assignment of CALP as a *bona fide* class I PDZ domain,³¹ and with our previous studies.^{27,30,32} At positions P⁻⁶ through P⁻⁹, the wt amino acids can be replaced by any other, which is typical of the relatively non-specific interactions of N-terminal residues with the PDZ domain.¹⁴

As a reference, we synthesized three iCAL36 SubAna arrays using standard PIPE synthesis.²⁷ These were independently incubated with CALP and analyzed in the same way as described above (Fig. S3). Comparison of the measured values showed overall good agreement with the PIPE^{PLUS} results. In particular, there is excellent concordance at positions P⁻¹ and P⁻². However, while the patterns are broadly consistent, there are some differences. In particular, the PIPE^{PLUS} method reveals more stringent amino-acid preferences at P⁰ (I/L/V). Furthermore, significantly stronger binding signals could be observed for replacements of Trp with a number of side chains at P⁻⁵, while those did not appear as strong in previous analyses. However, the signal intensities measured on cellulose membrane only allow relative comparison, and binding constants should be measured by other methods such as surface plasmon resonance (SPR), fluorescence polarization (FP) or isothermal titration calorimetry (ITC).

As a further refinement, we tested the compatibility of the PIPE^{PLUS} protocol with non-natural amino acids (NNAA). Such residues expand the range of chemical space available for peptide screening. They can also modulate properties, such as peptide

affinity or stability that are relevant for the development of therapeutic peptides. First of all, we analyzed the coupling efficiency of 11 Fmoc-NNAA-OH activated with CDI on the HMPA linker. Results of the Fmoc titration assays showed coupling efficiencies between 650 nmol.cm⁻² for 2-aminobutyric acid (t) and 140 nmol.cm⁻² for *tert*-butylglycine (a) (Fig. 4A). All tested Fmoc-NNAA-OH reagents thus exceeded a coupling efficiency of 100 nmol.cm⁻², which is the minimum concentration required for PIPE-related SPOT synthesis.³³ After this preliminary coupling of each NNAA, the sequence WKL was synthetically appended. The resulting spots were punched out, transferred into Eppendorf tubes, and treated with TFA for peptide release and side-chain deprotection. Crude product analyses of the precipitated peptides by RP-HPLC revealed excellent purity, with values ranging from 70% to 95% (Fig. S4).

Finally, we incorporated these NNAA in a substitution analysis of the iCAL36 peptide using the PIPE^{PLUS} method. After CALP incubation and antibody detection, we observed robust binding at several spots, and wt signals with similar baseline intensities in each row in the array (0.7–1.2) (Fig. 4B and C). Using the same signal thresholds as described for Fig. 3B, we found that the key residue serine at P⁻² could not be replaced by any of the NNAA that were tested. Interestingly, the P⁰ isoleucine appeared to be successfully replaced by hydrophobic amino acids such as norleucine (γ), cyclohexylglycine (v), norvaline (ρ), or aminobutyric acid (τ). These results are in agreement with the structure of the CAL PDZ domain, which bears a hydrophobic pocket for the C-terminal amino acids.²⁹ Quantification and comparison of the spot intensities allowed also the identification of peptide sequences with higher or equal binding signals compared to the wt-sequence. Interesting

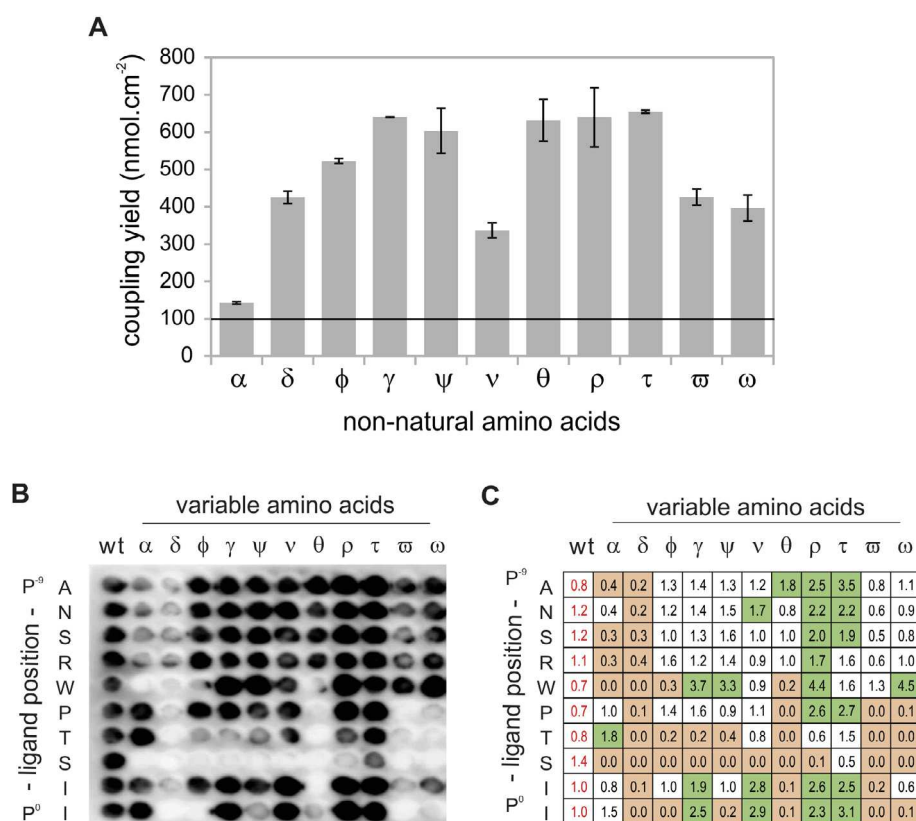


Fig. 4. Implementation of non-natural amino acids in the PIPE^{PLUS} protocol. (A) Determination of the coupling efficiency for the 11 C-terminal non-natural amino acids. Fmoc-NNAA-OH (0.2 M) were activated in DMF with CDI and coupled 4-times on a HMPA-BCB functionalized membrane. Graphical representation of the coupling yields (means with ranges) achieved by titration of the Fmoc-piperidine adduct cleaved from one spot ($n = 2$). The minimal coupling efficiency for SPOT synthesis (100 nmol.cm⁻²) is shown as a horizontal line as reported in. ³³ (B) Substitution analysis of the iCAL36 peptide using the 11 NNAAAs. Chemiluminescence signals obtained after antibody incubation of the CAL PDZ incubated peptide array. (C) Quantification of the spot intensities with ImageJ. All values were normalized relative to the mean signal intensities of the wild-type (wt) spots (written in red). Green: values >1.6, white: values between 1.6 and 0.4 and orange: values <0.4. α: *tert*-butylglycine, δ: 3-nitrotyrosine, φ: ornithine, γ: norleucine, ψ: β-thienylalanine, ν: cyclohexylglycine, θ: piperidine-4-carboxylic acid, ρ: norvaline, τ: 2-aminobutyric acid, ω: p-biphenylalanine, ω: 1-naphthylalanine.

sequences could be selected such as ANSpWPTSII [norvaline (1.7)] to inhibit arginine cleavage by endopeptidases or ANSRWPTSII [2-aminobutyric acid (3.1)] to inhibit exopeptidase-mediated degradation. Crystallographic evidence shows that CAL PDZ has additional space for binding at P⁻⁵ that is not fully occupied by tryptophan.³⁰ Thus, replacement with the voluminous 1-naphthylalanine (which has the highest binding signal: 4.5) could generate a ligand with more potency for CAL and higher specificity versus other PDZ domains.

Finally, the purity of the peptides synthesized by PIPE^{PLUS} was estimated by HPLC to be between 60% and 90% as shown in Fig. S5.

In conclusion, the optimized process of inverted peptides (PIPE^{PLUS}) is a powerful SPOT synthesis variant allowing the preparation of rationally-designed peptide arrays for the screening of PDMIs as exemplified here for the CAL PDZ domain. Three aspects of the synthesis were optimized with respect to yield and synthetic accessibility: the amino functionalization of the cellulose membrane, the cyclization conditions, and the cyclization reagent. The PIPE^{PLUS} protocol is now more widely accessible to the scientific community. All required compounds are commercially available, and the method is user-friendly and easily adaptable to any research laboratory using SPOT synthesis. PIPE^{PLUS} arrays show an improved sensitivity, reproducibility and signal-to-noise ratio compared to previous described methods. As exemplified by the substitutional analysis of the iCAL36 sequence, both natural and non-natural amino acids can be included in the synthesis, expanding the scope of peptide sequence optimization for any biological application. Looking forward, the improved chemistry of our proto-

col means that peptide substitution screening can potentially be extended to a wide variety of amino acid-like building blocks, including β-, γ- or ω-amino acids. These improvements and modifications will likely accelerate the speed and fidelity by which potent and selective peptide inhibitors of PDMIs are identified and developed.

Acknowledgments

This work was supported by the National Institutes of Health (P20GM113132, R01DK101541 and T32GM008704). We thank Dr. Bernhard Ay for technical support and fruitful discussions.

A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.045>.

References

- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46:3–26.
- Antosova Z, Mackova M, Kral V, Macek T. *Trends Biotechnol.* 2009;27:628–635.
- Fosgerau K, Hoffmann T. *Drug Discovery Today.* 2015;20:122–128.
- Pawson T, Nash P. *Science.* 2003;300:445–452.
- Kennedy MB. *Trends Biochem Sci.* 1995;20:350.
- Sheng M, Sala C. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1–29.
- Harris BZ, Lim WA. *J Cell Sci.* 2001;114:3219–3231.

8. Nourry C, Grant SGN, Borg J-P. *Sci. STKE Signal Transduct Knowl Environ.* 2003;2003.
9. Dev KK. *Nat Rev Drug Discovery.* 2004;3:1047–1056.
10. Grillo-Bosch D, Choquet D, Sainlos M. *Drug Discovery Today Technol.* 2013;10:e531–e540.
11. Cheng J, Moyer BD, Milewski M, et al. *J Biol Chem.* 2002;277:3520–3529.
12. Kegelman TP, Wu B, Das SK, et al. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114:370–375.
13. Sidhu SS, Bader GD, Boone C. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7:97–102.
14. Tonikian R, Zhang Y, Sazinsky SL, et al. *PLoS Biol.* 2008;6:e239.
15. Frank R. *Tetrahedron.* 1992;48:9217–9232.
16. Volkmer R. *ChemBioChem.* 2009;10:1431–1442.
17. Hoffmüller U, Russwurm M, Kleinjung F, et al. *Angew Chem.* 1999;111:2180–2184.
18. Boisguerin P, Leben R, Ay B, et al. *Chem Biol.* 2004;11:449–459.
19. Boisguerin P, Ay B, Radziwill G, Fritz RD, Moelling K, Volkmer R. *Chembiochem Eur J. Chem Biol.* 2007;8:2302–2307.
20. Stöllner D, Scheller FW, Warsinke A. *Anal Biochem.* 2002;304:157–165.
21. Bhargava S, Licha K, Knaute T, et al. *Mol Recognit JMR.* 2002;15:145–153.
22. Mastny M, Heuck A, Kurzbauer R, et al. *Cell.* 2013;155:647–658.
23. Weski J, Meltzer M, Spaan L, et al. *Chembiochem Eur J. Chem Biol.* 2012;13:402–408.
24. Dijkstra G, Kruizinga WH, Kellogg RM. *J Org Chem.* 1987;52:4230–4234.
25. Jakab A, Schlosser G, Feijlbrieff M, et al. *Bioconj Chem.* 2009;20:683–692.
26. Robey FA, Fields RL. *Anal Biochem.* 1989;177:373–377.
27. Vouilleme L, Cushing PR, Volkmer R, Madden DR, Boisguerin P. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49:9912–9916.
28. Cushing PR, Vouilleme L, Pellegrini M, Boisguerin P, Madden DR. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49:9907–9911.
29. Amacher JF, Cushing PR, Weiner JA, Madden DR. *Acta Crystallogr Sect F.* 2011;67:600–603.
30. Amacher JF, Cushing PR, Brooks L, Boisguerin P, Madden DR. *Structure.* 2014;22:82–93.
31. Songyang Z, Fanning AS, Fu C, et al. *Science.* 1997;275:73–77.
32. Amacher JF, Cushing PR, Bahl CD, Beck T, Madden DR. *J Biol Chem.* 2013;288:5114–5126.
33. Ay B, Landgraf K, Streitz M, Fuhrmann S, Volkmer R, Boisguerin P. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008;18:4038–4043.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Optimization of the process of inverted peptides (PIPE^{PLUS}) to screen PDZ domain ligands.

Quentin Seisel^a, Marisa Rädisch^b, Nicholas P Gill^c, Dean R. Madden^c, Prisca Boisguerin^{a*}

Affiliations:

a - Centre de Recherche de Biologie cellulaire de Montpellier, CNRS UMR 5237, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

b - Bioorganische Chemie, Universität Bayreuth, Gebäude NW I, 95440 Bayreuth, Germany.

c - Department of Biochemistry & Cell Biology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, 7200 Vail Building, Hanover, NH 03755, United States.

MATERIALS AND METHODS

1. Materials

General reagents: acetic anhydride (Ac₂O), bromoacetic acid (BrAc-OH), bromoacetyl bromide (BrAc-Br), 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), casein blocking buffer 10X, chloroacetic acid, 1,3-diaminopropane (DAP), dichloromethane (DCM), diethyl ether, monoclonal anti-His mouse antibody (Cat n°: H1029), N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC), 3-maleimidopropionic acid, 4-maleimidobutyric acid, phenol, piperidine, potassium chloride (KCl), sucrose, sodium chloride (NaCl), trifluoroacetic acid (TFA), triisopropylsilane (TIPS), trishydroxymethylaminomethane (Tris) and Tween 20 were purchased from Sigma-Aldrich. Diisopropylethylamine (DIPA), hydrochloric acid (HCl), p-hydroxymethylphenoxyacetic acid (HMPA) and sodium hydrogenocarbonate (NaHCO₃) were purchased from Merck. Acetone, dimethylformamide (DMF) and sodium carbonate were purchased from Carlo Erba. N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) was purchased from Molekula. N-hydroxysuccinimidyl bromoacetate (BrAc-OSu) was purchased from Fluorochem. Phosphate-Buffered Saline (PBS, pH 7.4) was purchased from Gibco. Anti-mouse IgG HRP (Cat n°:7076) was purchased from Cell Signaling.

Amino acids: Fmoc-Nle-OH was purchased from Polypeptide. Fmoc-Tle-OH, Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Inp-OH and Fmoc-1-Nal-OH were purchased from Iris Biotech. All natural and other non-natural Fmoc-AA-OH as well as all Fmoc-AA-OPfp amino acids were purchased from Bachem. For standard SPOT synthesis, Fmoc-AA-OPfp and Fmoc-AA-OH were used with the following side chain protection: E-, D-(OtBu); C-, S-, T-, Y-(tBu); K-(Boc); C-, N-, Q-, H-(Trt); R-(Pbf).

Cellulose membrane (Grade 50, quantitative filter paper hardened low ash) was purchased from VWR.

CAL PDZ domain (CALP16 construct, 10X His – HRV3C – CAL PDZ) was expressed and purified as described in Amacher *et al.*¹. 2,4-dinitrophenyl bromoacetate (BrAc-DNP) was a generous gift from Dr. Markus Kaiser (University of Duisburg-Essen, Germany).

TBS-10X buffer was prepared with NaCl (1.36 M), KCl (27 mM), Tris (0.5 M) dissolved in MilliQ water. The pH was adjusted to 8.0 with HCl. 5-fold and 10-fold aqueous dilutions were performed to prepare TBS-2X and TBS-1X solutions, respectively.

Blocking buffer (50 mL) was prepared with 2.5 g sucrose, 5 mL TBS-10X, 5 mL casein blocking buffer 10X and 40 mL MilliQ water.

2. Synthesis of the PUC membrane

All incubations were performed at room temperature under shaking. The cellulose membrane was washed sequentially with water, acetone/water (1:3), acetone/water (3:1) and acetone, then incubated 4 h with a solution of CDI ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$, 80 mM) in acetone in a polypropylene box with a closed lid. Then, the membrane was washed with acetone (3 x 2 min) and incubated 3 - 24 h with a solution of 1,3-diaminopropane (20 mM) in sodium carbonate/sodium bicarbonate buffer ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ pH 9.6, 1 M). Afterwards, the membrane was washed sequentially with phosphate-buffered saline (PBS) + 0.05% v/v Tween 20 (1 x 2 min), phosphate-buffered saline (2 x 2 min), H_2O (3 x 2 min), EtOH (2 x 2 min), and diethyl ether (1 x 2 min) and then air-dried. Quantification of the amino function density was performed by Fmoc titration assay (as described below).

3. Fmoc titration assay for amino function quantification

Amine density assessment was performed by grafting an Fmoc- β -alanine moiety to the PUC membrane, followed by Fmoc-cleavage by piperidine and subsequent titration of the released Fmoc-piperidine adduct by UV spectroscopy. In detail, Fmoc- β -alanine-OPfp (0.3 M, 1 μL , spot of 0.283 cm^2) was spotted twice (15 min reaction each) on four points of the membrane, washed with DMF (3 x 2 min), EtOH (2 x 2 min) and diethyl ether (1 x 2 min) and air-dried. Each spot was punched out, transferred into a 2 mL Eppendorf tube and incubated 20 min with piperidine (20% in DMF). Absorbance of the Fmoc-piperidine adduct ($\epsilon = 7800 \text{ L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$) in the supernatant was measured compared to a blank solution of piperidine (20% in DMF) at $\lambda = 301 \text{ nm}$ (Jasco V-550). The amine concentration was calculated according to the Beer-Lambert law.

4. Synthesis of membrane-bound arrays (MIP^{PLUS})

The peptides were synthesized on a PUC membrane and prepared by an AutoSpot-robot (INTAVIS Bioanalytical Instruments AG). Array design was performed with the aid of the in-house software LISA 1.71. 0.06 μL of amino acid solution were distributed per spot for spot definition and CDI coupling steps. In order to avoid the ring spot effect² and to ensure an even signal repartition within the spot, 0.10 μL of peptide solution were distributed per spot for all other coupling cycles.

In general, after each coupling of Fmoc-AA-OPfp or Fmoc-AA-OH, the membrane was washed with DMF (3 x 2 min) to remove excessive Fmoc-aminoacid. Fmoc-group was then cleaved using piperidine (20% in DMF, 20 min), and then the membrane was washed with DMF (3 x 2 min), ethanol (3 x 2 min), diethyl ether (1 x 2 min) and then air-dried. If not otherwise mentioned, the amino acids were coupled twice with a reaction time of 15 min for each coupling.

The synthesis started with spot definition (diameter: 3 mm). In short, Fmoc- β -alanine-OPfp was spotted, then the membrane was acetylated with Ac_2O (10% in DMF + 5% DIPA, 30 min) and washed with DMF (5 x 2 min). The Fmoc group was cleaved with piperidine (20% in DMF, 20 min), and the membrane was washed and air-dried. A solution of Fmoc-cysteine-(Trt)-OPfp (0.3 M in DMF) followed by Fmoc- β -alanine-OPfp (0.3 M in DMF) was then added to the nascent peptide sequence. Afterwards, a solution of 4-hydroxymethylphenoxyacetic acid (HMPA, 0.4 M in DMF) activated with *N*-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ, 1.1 eq.) was directly spotted on the membrane (4x coupling, 15 min reaction each). The membrane was washed with DMF (3 x 2 min), ethanol (2 x 2 min), and diethyl ether (1 x 2 min), and air-dried.

Solutions of Fmoc-amino acid-OH (0.4 M in DMF) activated with 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI, 3 eq.) were spotted on the membrane (4 x coupling, 15 min reaction time each). Proline, tyrosine, threonine and glutamine were activated with 1,1'-carbonyldi(1,2,4-triazole) (CDT). Activated amino acid solution should be coupled within 1 h (see Ay et al. ³). Peptide sequences were elongated as desired followed by a final N-terminal Fmoc- β -alanine-OPfp coupling.

For thioether cyclization, peptides were capped with *N*-hydroxysuccinimidyl bromoacetate (BrAc-OSu, 1 M in DMF), 4 x coupling, 15 min reaction time each. The membrane was washed with DMF (3 x 2 min) and DCM (3 x 2 min) and air-dried.

To enable cyclization the trityl side-chain protecting group of the cysteine was cleaved with a solution of TFA (7%), H₂O (2%) in DCM (1 x 5 min) followed by a solution of TFA (7%), TIPS (3%), H₂O (2%) in DCM (3 x 5 min). The membrane was washed with DCM (3 x 2 min), DMF (2 x 2 min), and H₂O (1 x 2 min). The peptides were cyclized overnight by treatment with aq. NaHCO₃ (0.1 M). After incubation, the membrane was washed with H₂O (5 x 2 min), EtOH (2 x 2 min), and diethyl ether (1 x 3 min) and air-dried.

Cycle hydrolysis and side-chain deprotection were achieved through treatment with a solution of TFA (60 %), TIPS (3%), and H₂O (2%) in DCM for 2.5 h without shaking, followed by washing steps (DCM 3 x 2 min, DMF 3 x 2 min, EtOH 2 x 2 min, diethyl ether 1 x 2 min). To ensure full deprotection, the membrane was treated with a solution of TFA (90 %), TIPS (3 %), and H₂O (2%) in DCM for 30 min without shaking. Finally, the membrane was washed with DCM (3 x 2 min), DMF (3 x 2 min), EtOH (2 x 2 min), PBS (pH 7.4, 0.1 M, 2 x 2 min), H₂O (2 x 2 min), EtOH (2 x 2 min), and diethyl ether (1 x 2 min) and then air-dried.

5. Peptide synthesis and quantification to determine cyclization yields

Peptide arrays were synthesized on a PUC membrane as described above. The following sequences were prepared: H₂N-WKL-HMPA- β Ala-C- β Ala for 3-mers, H₂N-GLSWKL-HMPA- β Ala-C- β Ala for 6-mers, H₂N-GALSWKL-HMPA- β Ala-C- β Ala for 10-mers on spots with surface of 0.283 cm². On these sequences, we coupled either a cyclization reagent to induce the cyclization or Fmoc- β Ala-OPfp as negative control.

After washing and drying the membrane, trityl cleavage of the cysteine was performed with a 7% TFA solution followed by the overnight cyclization in chosen cyclization conditions as detailed above. Spots were punched out and 2 spots were pooled in a 2 mL Eppendorf tube. TFA cleavage (200 μ L/tube) were carried out as described above. After each TFA treatment, solutions were evaporated by blowing with N₂ gas. Peptides were solubilized in 400 μ L milliQ water (shaking, 5 min) and cellulose spots were removed. Peptides were lyophilized overnight to remove TFA-salt complexes, then resolubilised in 100 μ L milliQ water.

Cyclization yields were calculated using the measured UV absorbance values obtained at λ = 280 nm (tryptophan residues) with the NanoDrop 1000 (ThermoFisher), using MilliQ water as a blank. Absorbance values obtained for Fmoc- β Ala-bearing spots were fixed to 100% uncyclized compound, and values obtained for tested cyclization agents were compared to those of the Fmoc- β Ala values. All measurements were performed at least three times ($n \geq 3$).

6. Binding studies of cellulose-bound peptides

Libraries generated via MIP^{PLUS} synthesis were incubated with EtOH (1 x 10 min), TBS-1X buffer (3 x 10 min), and blocking buffer (3 h) at room temperature (RT). Incubation of the His-tagged CAL PDZ protein was carried out overnight in blocking buffer (10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) at 4 °C. The interactions between the PDZ domain and the peptides were detected using a monoclonal anti-His mouse antibody in blocking buffer (1:1,000, 2 h at RT) and an anti-mouse IgG HRP in blocking buffer (1:1,000, 1 h at RT). Membranes were washed with TBS-1X (3 x 10 min) then incubated with Pierce ECL plus Western blotting substrate (ThermoFisher). Images were acquired with an Amersham Imager 600 and spot intensities were measured using ImageJ.

7. Analytical evaluation

HPLC analyses (Waters) were achieved using a linear solvent gradient: A, 0.05% TFA in water; B, 0.05% TFA in acetonitrile; gradient 5 - 60% B over 25 min (Figure S4) or 10 - 90% B over 20 min (Figure S5). HPLC conditions: UV detector 214 nm, RP-18 column. Peptide identity was validated by MALDI-TOF mass-spectrometry (Ultraflex III, Bruker).

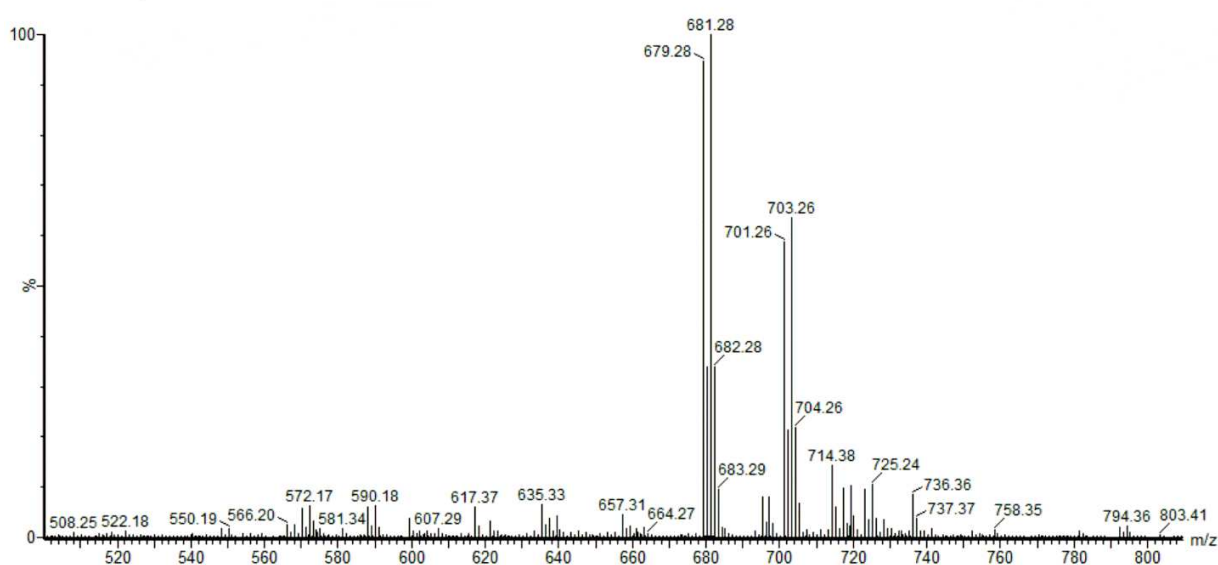


Figure S1: Mass spectrometry analysis of BrAc-WKL.

Membrane-bound LWKL peptide was bromoacetylated using BrAc-OSu (1 M in DMF, 4 x coupling, 15 min reaction time each), then washed with DMF (3 x) and DCM (3 x). Spots were punched out and 3 spots were pooled in a 2 mL Eppendorf tube. TFA cleavage (300 μL for each solution) was then carried out as described above (see 5.). The sample was then measured by MALDI-TOF mass spectrometry. The expected mass of the bromide-containing peptide was found (masses expected: 678.27/680.27, masses found: 679.28/681.28 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 701.26/703.26 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)), while no starting material could be observed (mass expected: 558.35).

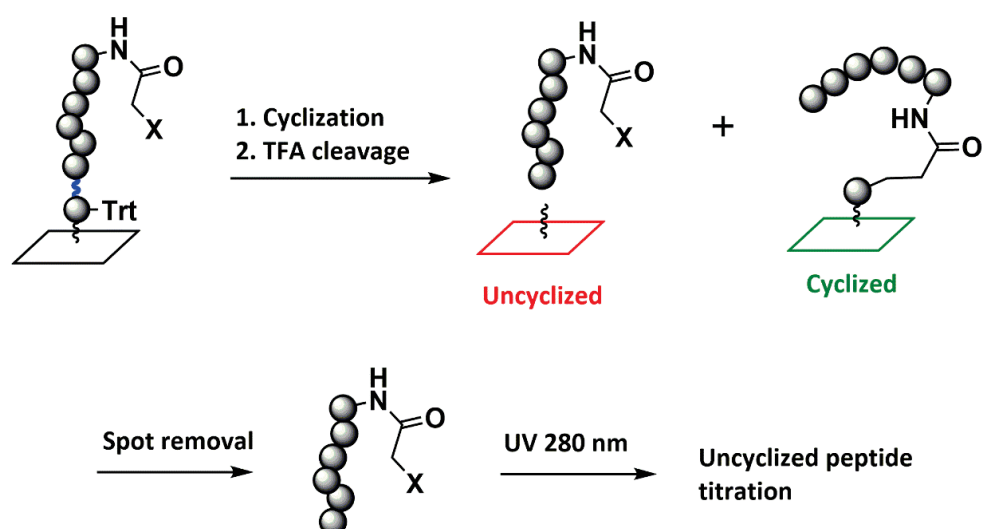


Figure S2: Illustration of the quantification method of the cyclization yields (see 5.)

Membrane-bound peptides were cyclized, then the HMPA acid-labile bond was cleaved under TFA action. After spot removal, only soluble uncyclized peptide remains in solution. Trt: trityl group borne by the reactive Cys residue.

CALP:iCAL36

		variable amino acids																				
		wt	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
P ⁹ - ligand position - P ⁰	A	0.8	1.0	1.3	0.8	0.8	1.3	0.9	0.8	0.8	0.8	1.1	0.8	0.9	0.7	0.9	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1	0.5
	N	1.1	1.1	1.3	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.9	1.0	1.2	0.9	1.1	1.0	0.7	1.2	1.2	1.2	1.0	1.1	0.5
	S	1.1	1.1	1.3	1.0	0.8	1.1	0.9	0.9	1.0	1.1	1.2	1.0	1.2	1.0	0.9	1.1	1.1	1.0	1.0	0.9	0.5
	R	1.2	1.1	0.9	0.8	0.7	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	0.8	1.1	0.9	0.8	0.7	0.7	0.3
	W	1.0	0.5	1.1	0.2	0.2	0.8	0.6	0.3	0.6	0.3	1.0	0.7	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	1.1	0.2
	P	1.1	1.0	0.8	0.4	0.9	0.7	0.4	0.6	0.7	0.8	0.9	0.9	0.7	0.9	1.2	0.7	0.9	1.0	0.8	0.3	0.3
	T	1.1	0.4	1.2	0.2	0.6	0.7	0.2	0.6	1.0	0.5	0.6	0.6	0.5	0.1	0.5	0.4	0.6	1.0	1.3	0.3	0.2
	S	1.1	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.9	0.9	0.2	0.1	0.1
	I	0.9	0.8	1.1	0.6	0.6	1.1	0.3	0.6	0.9	0.9	0.9	0.8	0.5	0.2	0.6	1.3	0.9	0.7	1.0	0.3	0.5
	I	0.8	0.9	0.8	0.3	0.3	0.6	0.6	0.2	0.8	0.4	1.6	0.6	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3	1.0	0.2	0.1

Figure S3: Evaluation of signal intensities of iCAL36 sequence (SubAna) incubated with the CAL PDZ domain.

A SubAna peptide array was synthesized using the MIP synthesis on a N-CAPE membrane as detailed in Vouilleme et al.⁴. Signal intensities of three independent SubAnas (n = 3) were quantified using ImageJ and averaged. Mean values of the wild-type (wt) sequences [first column and within the SubAna (framed and written in red)] were used to normalize all values. Grey backgrounds highlighted the values not substantially different of the wt (0.4 - 1.6), red backgrounds show mutations which induced a significant reduction of the CAL PDZ domain interaction (< 0.4) and green backgrounds those which significantly amplified the affinity to the CAL PDZ domain (> 1.6).

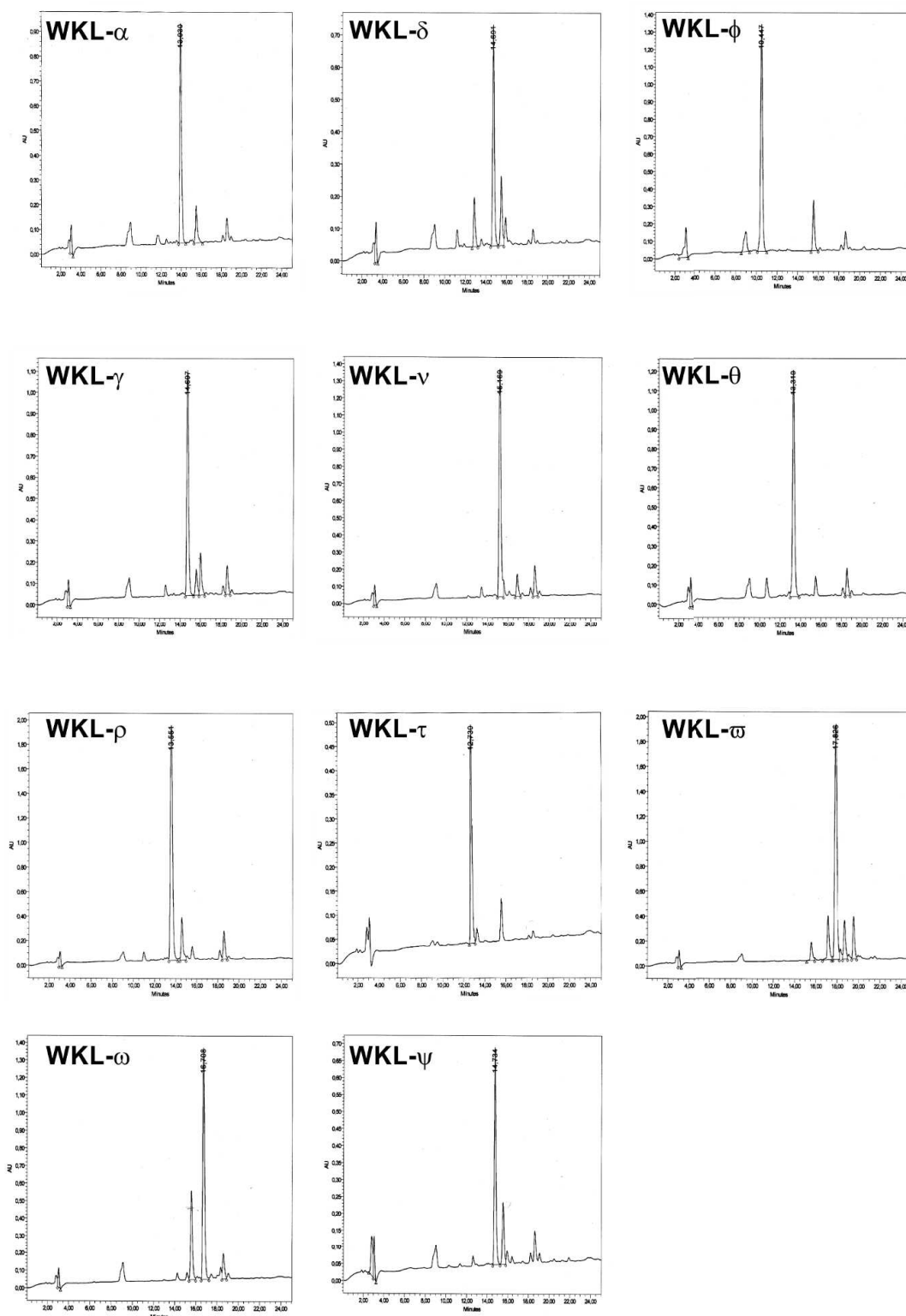
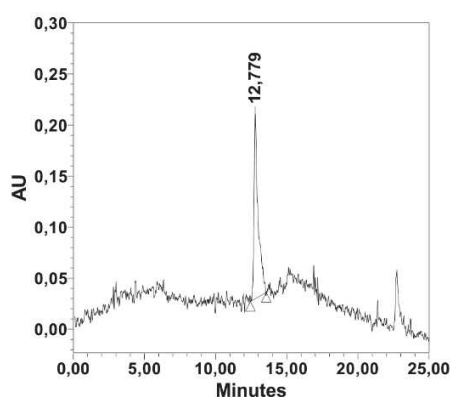
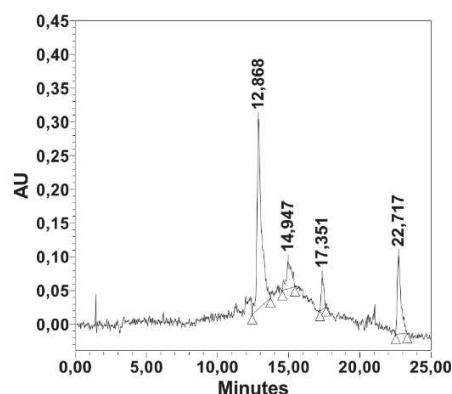


Figure S4: HPLC chromatograms of WKL peptide sequence with various C-terminal NNAA. α : tert-butylglycine, δ : 3-nitrotyrosine, ϕ : ornithine, γ : norleucine, ν : cyclohexylglycine, θ : piperidine-4-carboxylic acid, ρ : norvaline, τ : 2-aminobutyric acid, ω : p-biphenylalanine, ω : 1-naphthylalanine, Ψ : β -thienylalanine.

A - ANS_PWPTSII**B - ANSR_WPTSII****Figure S5: Example peptides synthesized by PIPE^{PLUS} and analyzed by HPLC.**

The purity of the cyclic peptides was estimated around 60-90%, which is in accordance with previously published analytical data ³.

Table S1: Influence of CDI concentrations during the pre-activation step on the PUC amine density.

CDI concentration ($\mu\text{mol.cm}^{-2}$)	Mean amine density ($\mu\text{mol.cm}^{-2}$)	Intra-membrane heterogeneity ($\mu\text{mol.cm}^{-2}$)	Inter-membrane heterogeneity ($\mu\text{mol.cm}^{-2}$)
5	0.78	0.07	0.02
10	0.91	0.07	0.03
20	0.89	0.05	0.02
40	0.99	0.06	0.04

Footnotes: Amine densities are calculated by Fmoc titration (see Materials and Methods).

For each CDI concentration, several membranes were synthesized. Inter-membrane heterogeneity corresponds to the standard deviation of the amine density between different membranes ($n \geq 3$).

For each synthesized membrane, spots from different corners of the membrane were punched out and Fmoc-titrated. Intra-membrane heterogeneity corresponds to the standard deviation of the amine density observed between different points of a same membrane ($n \geq 6$).

Table S2: Evaluation of the BrAc-OSu coupling and cyclization efficiencies.

Peptide length	Cyclization reagent	Expected [M]	Measured	
			$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$
6-mer	BrAc-OSu	845.41	846.41	844.42
10-mer		1173.56	1174.64	1172.57

Footnotes: Masses found by mass spectrometry in MALDI-TOF (positive and negative modes) and comparison to the expected masses. 3-mer: WKL, 6-mer: GLSWKL, 10-mer: GALSGLSWKL. As 3-mer peptides have no biological relevance in PDMI development, the assay was only performed on 6-mer and 10-mer peptides. Spotted sequences: BrAc-[AA]_n-C-HMPA-B-PUC.

Table S3: Amine density of the PUC membrane depending on the DAP duration.

DAP (mM)	Time (h)	Mean amine density ($\mu\text{mol.cm}^{-2}$)
20	0.5	129 $\pm$ 3
	1.75	185 $\pm$ 0
	3	204 $\pm$ 20
	24	200 $\pm$ 16

Footnotes: Hydroxyl function of the cellulose membrane were activated with 20 $\mu\text{mol.cm}^{-2}$ CDI, followed by DAP coupling at the indicated concentrations and incubation times. For each synthesized membrane, spots were punched out and amine density quantification were assessed by Fmoc titration (see Materials and Methods) (n =2).

References:

1. Amacher, J. F.; Cushing, P. R.; Weiner, J. A.; Madden, D. R. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2011**, *67*, 600–603.
2. Kramer, A.; Reineke, U.; Dong, L.; Hoffmann, B.; Hoffmüller, U.; Winkler, D.; Volkmer-Engert, R.; Schneider-Mergener, J. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* **1999**, *54*, 319–327.
3. Ay, B.; Landgraf, K.; Streitz, M.; Fuhrmann, S.; Volkmer, R.; Boisguerin, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4038–4043.
4. Vouilleme, L.; Cushing, P. R.; Volkmer, R.; Madden, D. R.; Boisguerin, P. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2010**, *49*, 9912–9916.

Chapitre 6

-

Développement d'inhibiteurs de CAL de seconde génération (iCAL-2G) incluant des acides aminés non-naturels

6.1. Introduction

6.1.1. Contexte de l'optimisation du peptide iCAL36 par des AANN

Le peptide iCAL36 est un inhibiteur sélectif du domaine PDZ de CAL ($\approx 10 \mu\text{M}$). Sa version vectorisée par la pénétratine, Pen-iCAL36, a montré lors d'essais préliminaires une augmentation de 20% de l'activité du canal CFTR dans des cellules de patients CF polarisées¹⁶⁶. Toutefois, des résultats non-publiés de notre groupe montrent qu'iCAL36 et Pen-iCAL36 sont rapidement dégradés après traitement par du sérum humain : cela peut être un problème car le peptide doit traverser un mucus riche en protéases avant d'internaliser les cellules épithéliales. Il est probable qu'avec des peptides iCAL plus stables, l'effet thérapeutique constaté soit plus fort.

Notre stratégie pour l'amélioration de la séquence peptidique d'iCAL36 implique l'inclusion d'acides aminés non codés génétiquement, permettant d'augmenter la stabilité métabolique mais aussi l'affinité et la sélectivité du peptide. Dans un premier temps, nous avons montré que l'inclusion d'acides aminés de configuration D (AAD) dans la séquence d'iCAL36 n'est pas tolérée pour les positions C-terminales du peptide (chapitre 1.2.3.2., **Figure 1.17**). Nous avons donc choisi d'utiliser des acides aminés non-naturels (AANN) également reconnus pour leur résistance aux protéases. De plus, par leur importante diversité de chaînes latérales, l'inclusion d'AANN pourrait également rendre les peptides iCAL plus affins et sélectifs pour le domaine PDZ de la protéine CAL.

En parallèle, nous souhaitons abolir l'interaction d'iCAL36 avec la protéine TIP-1 qui est impliquée dans la régulation de l'expression des protéines membranaires. La substitution du tryptophane en position P⁻⁵ par une leucine mène à un peptide (ANSRLPTSII : iCAL42) présentant une sélectivité totale pour le domaine PDZ de la protéine CAL, mais dont l'affinité est 3 fois plus faible que celle d'iCAL36. De façon similaire, le remplacement du tryptophane ou d'autres résidus par des AANN pourrait empêcher l'interaction TIP-1/iCAL tout en maintenant une affinité correcte voire améliorée.

6.1.2. Objectifs du chapitre

Dans cette partie, nous présentons les résultats du criblage d'analogues d'iCAL36 contenant un ou plusieurs AANN. Nous avons employé une stratégie itérative à deux méthodes consistant à identifier par synthèse SPOT de nouvelles séquences présentant une augmentation d'affinité et/ou de sélectivité pour CALP, puis de confirmer ces caractéristiques par polarisation de fluorescence (FP) et d'utiliser les données acquises pour effectuer un nouveau criblage. *In fine*, nous espérons développer ainsi des peptides de seconde génération (iCAL-2G) plus stables, plus affins et plus sélectifs pour la protéine CAL, le régulateur négatif du canal CFTR dans le cadre de la mucoviscidose.

6.2. Matériels et méthodes

6.2.1. Description des acides aminés utilisés

Les acides aminés naturels de configuration L ou D ont été achetés chez Bachem ou Iris Biotech. Tous les acides aminés non-naturels (AANN) chiraux utilisés sont de configuration L. La (triméthylsilyl)alanine (E), la di(triéthylsilylpropyl)glycine (Φ) et la silaproline (X) ont été préparées selon des procédures précédemment décrites^{304–306} et mises à disposition par l'équipe du Dr. Florine Cavelier (IBMM, Montpellier). Tous les autres AANN ont été achetés chez Bachem, Iris Biotech ou Polypeptide.

Tableau 6.1. AANN utilisés dans ce chapitre.

Code	Acide aminé	M [g/mol]	Analogues naturels
α	<i>t</i> -leucine	131,17	Ile/Leu/Val
δ	3-nitrotyrosine	226,19	Tyr
φ	ornithine	132,16	Lys
γ	norleucine	131,17	Ile/Leu/Val
ψ	β-thiénylalanine	171,22	His
ν	cyclohexylglycine	157,21	Ile/Leu/Val
θ	acide 4-pipéridinecarboxylique	129,16	Pro
ρ	norvaline	117,15	Ile/Leu/Val
τ	acide 2-aminobutyrique	103,12	Ala/Ile/Leu/Val
ω	<i>p</i> -(phényl)phénylalanine	241,29	Phe
ω	1-naphtylalanine	215,25	Trp
χ	3-benzothiénylalanine	221,28	Trp
ε	4-hydroxyproline	131,13	Pro
η	(aminooxyméthylcarboxyl)aminoalanine	117,17	/
ι	sarcosine	89,09	Gly
κ	2-naphtylalanine	215,25	Trp
π	acide 6-aminohexanoïque	131,17	/
σ	acide 8-aminooctanoïque	159,23	/
β	β-alanine	89,09	Gly/Ala
O	acide 4-aminobutyrique	103,12	/
Δ	acide 5-aminovalérique	117,15	/
X	silaproline	159,21	Pro
E	(triméthylsilyl)alanine	161,28	Ile/Leu/Val
Φ	di(triéthylsilylpropyl)glycine	387,76	/
H	homoarginine	188,23	Arg

Les masses indiquées correspondent aux AANN sans protection de leur chaîne latérale et de leur extrémité N-terminale.

6.2.2. Synthèse peptidique et solubilisation des peptides

La synthèse sur résine (réalisée sur la plateforme SynBio3, Montpellier) et la mise en solution des peptides iCAL36, Tat-iCAL36, TatRI-iCAL36 (chapitre 4, **Tableau 4.1**) et iCAL-2G ont été réalisées suivant les protocoles décrits dans le chapitre 3 (voir paragraphes « *Peptide synthesis* » et « *Peptide solubilisation* »).

6.2.3. Quantification du couplage des acides aminés non-naturels

Préparation de la membrane fonctionnalisée H-βAla-PUC. Une membrane PUC (300 nmol.cm^{-2}) a été préparée suivant le protocole décrit dans le chapitre 5 (*Synthesis of the PUC membrane*). Les spots ont été définis par double couplage de $1 \mu\text{L}$ de solution de Fmoc-βAla-OPfp ($0,3 \text{ M}$ dans le DMF) sur la membrane (diamètre : 6 mm), acétylation par un mélange DMF/Ac₂O/DIEA 85:15:5 pendant 30 min, lavage (DMF 3 x 2 min), traitement avec une solution de pipéridine (20% dans le DMF) pendant 20 min puis lavage (DMF 3 x 2 min, EtOH 3 x 2 min, éther 1 x 2 min) et séchage comme détaillé dans le chapitre 5 (« *Synthesis of membrane-bound arrays* »).

Couplage des AANN en position C-terminale (P^0). Une solution de Fmoc-Cys(Trt)-OPfp ($0,3 \text{ M}$ dans le DMF) est couplée sur chaque spot de la membrane H-βAla-PUC. Après traitement avec une solution de pipéridine (20% dans le DMF), lavage (DMF 3 x 2 min, EtOH 3 x 2 min, éther 1 x 2 min) et séchage, une solution de Fmoc-βAla-OPfp ($0,3 \text{ M}$ dans le DMF) est couplée sur chaque spot. Après traitement avec une solution de pipéridine (20% dans le DMF), lavage (DMF 3 x 2 min, EtOH 3 x 2 min, éther 1 x 2 min) et séchage, une solution d'acide 4-hydroxyméthylphénoxyacétique (HMPA, $0,4 \text{ M}$ dans le DMF) activée avec du N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ, 1.1 eq.) est couplée sur chaque spot ($1 \mu\text{L}$ par spot, 4 x 15 min). La membrane a été lavée (DMF 3 x 2 min, EtOH 2 x 2 min, éther 1 x 2 min) puis séchée à l'air (membrane HO-HMPA-βAla-Cys(Trt)-βAla-PUC). Des solutions de Fmoc-AANN-OH ($0,4 \text{ M}$ dans le DMF) activées avec du 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI, 3 eq.) ont ensuite été couplées sur la membrane ($1 \mu\text{L}$ par spot, 4 x 15 min). Les solutions ainsi activées doivent être utilisées dans l'heure suivante.

Couplage des AANN sur une fonction amine. Des solutions de Fmoc-AANN-OH ($0,4 \text{ M}$ dans le DMF) activées avec de l'EEDQ (1,1 eq.) ont été directement couplées sur une membrane H-βAla-PUC ($1 \mu\text{L}$ par spot, 2 x 15 min).

Réactivité de l'extrémité N-terminale des AANN. Des solutions de Fmoc-AANN-OH ($0,4 \text{ M}$ dans le DMF) activées avec du N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ, 1,1 eq.) ont été couplées sur une membrane H-βAla-PUC ($1 \mu\text{L}$ par spot, 2 x 15 min). La membrane est ensuite lavée avec du DMF (3 x 2 min), traitée par une solution de pipéridine (20% dans le DMF), puis lavée (DMF 3 x 2 min, EtOH 3 x 2 min, éther 1 x 2 min) puis séchée à l'air (membrane H-AANN-βAla-PUC). Une solution de Fmoc-βAla-OPfp ($0,3 \text{ M}$ dans le DMF) est ensuite couplée sur chaque spot ($1 \mu\text{L}$ par spot, 2 x 15 min).

Quantification du groupe Fmoc. Chaque spot fonctionnalisé est perforé et transféré vers un eppendorf de 2 mL , puis incubé avec 1 mL de solution de pipéridine (20% dans le DMF). L'absorbance de l'adduit Fmoc-pipéridine ($\lambda = 7800 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) dans le surnageant est mesurée en comparaison à la solution de pipéridine seule à 301 nm (Jasco V-550). La concentration d'AANN ou de βAla couplé est alors dérivée de la loi de Beer-Lambert.

6.2.4. Expression et purification des protéines

Les protéines correspondant aux domaines PDZ de CAL, N2P2 et TIP-1 ont été exprimées, purifiées et concentrées suivant les procédures décrites par Vouillème *et al*¹⁶⁵ et Amacher *et al*¹⁷³ par l'équipe du Prof. D.R. Madden. Après concentration, les protéines ont été dialysées dans les tampons de stockage suivants :

25 mM de Tris, pH 7,5 (N2P2) ou 25 mM de Tris, pH 8,5 (CALP, TIP-1). 0,1 mM de TCEP et 0,02% de NaN₃ sont également ajoutés.

Séquence de CALP (M = 14632,2 g/mol) : **MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HM**ENLYFQGI RKVLLKEDH
EGLGISITGG KEHGVPIIS EIHPGQPADR CGGLHVGDAI LAVNGVNL RD TKHKEAVTIL SQQRGEIEFE VVYVDPKETA
AAKFERQHMD S

Séquence de N2P2 (M = 17671,6 g/mol) : **MGHHHHHHHH HHSSGHIEGR HM**PLRELPR LCHLRKGPQG
YGFNLHSDKS RPGQYIRSDV PGSPAARSL RAQDRLIEVN GQNVEGLRHA EVVASIKARE DEARLLVVDV
ETDEHFKRLR VTPTEEHVEG PLPSPVTNGT SPAQLNGGSA CSSRSDLPGS

Séquence de TIP-1 (M = 16081,2 g/mol) : **MGHHHHHHHH HHLEVLFGM** SYIPGQPVT A VVQRVEIHKL
RQGENLILGF SIGGGIDQDP SQNPFSEDKT DKGIVTRVS EGGPAEIAL QIGDKIMQVN GWDMTMVTHT
QARKRLTKRS EEVRLLVTR QSLQKAVQQS MLS

Toutes les protéines contiennent les domaines PDZ (environ 80 acides aminés de long, gris) ainsi que des fragments de la protéine native (blanc). Le motif poly-histidine (jaune) permet la reconnaissance par les anticorps.

6.2.5. Préparation des banques peptidiques par synthèse SPOT

La synthèse de la membrane PUC et la préparation des banques peptidiques ont été réalisées suivant les protocoles décrits dans le chapitre 5 (voir paragraphe « *Synthesis of the PUC membrane* » et « *Synthesis of membrane-bound arrays* »). Les acides aminés non-naturels sont utilisés sous la forme Fmoc-AANN-COOH (0,4 M) et sont activés par l'EEDQ (1,1 eq.) avant couplage.

6.2.6. Révélation des interactions peptide/domaine PDZ sur membrane

L'incubation des banques peptidiques avec les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1 (portant une séquence poly-histidine en position N-terminale) et la révélation des interactions peptide/domaine PDZ ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le chapitre 5 (« *Binding studies of cellulose-bound peptides* »).

Les membranes peptidiques sont respectivement incubées avec les protéines CALP-polyHis (10 µg/mL), N2P2-polyHis (10 µg/mL) et TIP-1-polyHis (100 µg/mL) dans un tampon TBS contenant 10% de Casein Blocking Buffer 10X (Sigma-Aldrich) et 50 mg/mL de saccharose. Les interactions peptide/domaine PDZ sont détectées par le biais d'un anticorps monoclonal anti-histidine de souris (1:2000, anticorps H1029, Sigma-Aldrich, 2 h à température ambiante dans le tampon de blocage) et d'un anticorps monoclonal anti-souris IgG HRP (1:2000, anticorps #7076, Cell Signaling, 2 h à température ambiante dans le tampon de blocage). Les membranes sont lavées avec du tampon TBS (3 x 10 min) puis incubées avec le substrat SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoFisher). Les images sont acquises sur un imageur de

chimiluminescence (Amersham Imager 600) et les intensités de spot ont été quantifiées à l'aide de la macro « *Protein Array Analyzer* » du logiciel ImageJ.

6.2.7. Mesures d'affinité protéine/ligand par polarisation de fluorescence

Les mesures de constantes de dissociation (K_D) et d'inhibition (K_i) des interactions peptide/protéine ont été réalisées suivant le protocole décrit dans le chapitre 4 (Mesures d'affinité protéine/ligand par polarisation de fluorescence).

6.3. Analyse de substitution d'iCAL36 par des AANN

6.3.1. Validation du couplage des AANN sur la membrane PUC

Avant de procéder à la synthèse SPOT d'analogues d'iCAL36 incluant des AANN, il est primordial de confirmer que les AANN peuvent être couplés sur les chaînes peptidiques en croissance. Lors de la synthèse SPOT, l'AANN est couplé soit avec du CDI (couplage sur le motif HMPA-OH, position P^0 du peptide) soit avec de l'EEDQ (couplage sur un acide aminé quelconque, couplage avec un $-NH_2$). Ces deux cas de figure ont été respectivement testés sur des membranes fonctionnalisées HO-HMPA- β Ala-Cys(Trt)- β Ala-PUC (**Figure 6.1A**) ou H- β Ala-PUC (**Figure 6.1B**, barres vert foncé). Après couplage du Fmoc-AANN activé, le groupement Fmoc est clivé par la pipéridine et l'adduit Fmoc-pipéridine résultant est quantifié par spectrophotométrie, ce qui permet de quantifier indirectement l'AANN couplé sur la membrane.

Les analyses menées semblent confirmer que la quasi-intégralité des AANN testés peut se coupler sur la membrane avec l'EEDQ ou le CDI avec un rendement supérieur à 100 nmol/cm², ce qui est la valeur minimale nécessaire pour la suite de la synthèse^{307,308}. On note quelques exceptions : la *tert*-leucine (α) ne peut pas être couplée efficacement en présence de CDI, la (triméthylsilyl)alanine (E) est difficile à coupler en présence d'EEDQ, et la di(triéthylsilylpropyl)glycine (Φ) ne peut être couplée avec aucun de ces réactifs. L'encombrement stérique de ces AANN peut être une explication à cette faible réactivité. Dans la suite des expériences, nous utiliserons tous les AANN cités à l'exception de la di(triéthylsilylpropyl)glycine (Φ).

Etonnamment, certains AANN présentent une efficacité de couplage largement supérieure à la densité de fonctions amine de la membrane PUC (> 400 nmol/cm²). Dans le cas du couplage des AANN avec le CDI qui est un activateur fort, ces valeurs peuvent être liées au couplage de l'AANN sur les motifs hydroxyle non fonctionnalisés de la cellulose. Avec l'EEDQ, qui est un activateur doux, cette réaction ne devrait pas avoir lieu : on observe cependant que les AANN présentant une efficacité de couplage supérieure à 400 nmol/cm²

sont tous aromatiques (à l'exception de η). Nous supposons l'existence de phénomènes de π -stacking entre les AANN couplés sur la membrane et des AANN libres, ce qui retient les AANN libres sur la membrane malgré les lavages et peut mener à une surestimation de l'efficacité de couplage. Alternativement, il est possible que les motifs aromatiques de ces AANN absorbent au voisinage de 301 nm et surestiment l'absorbance mesurée.

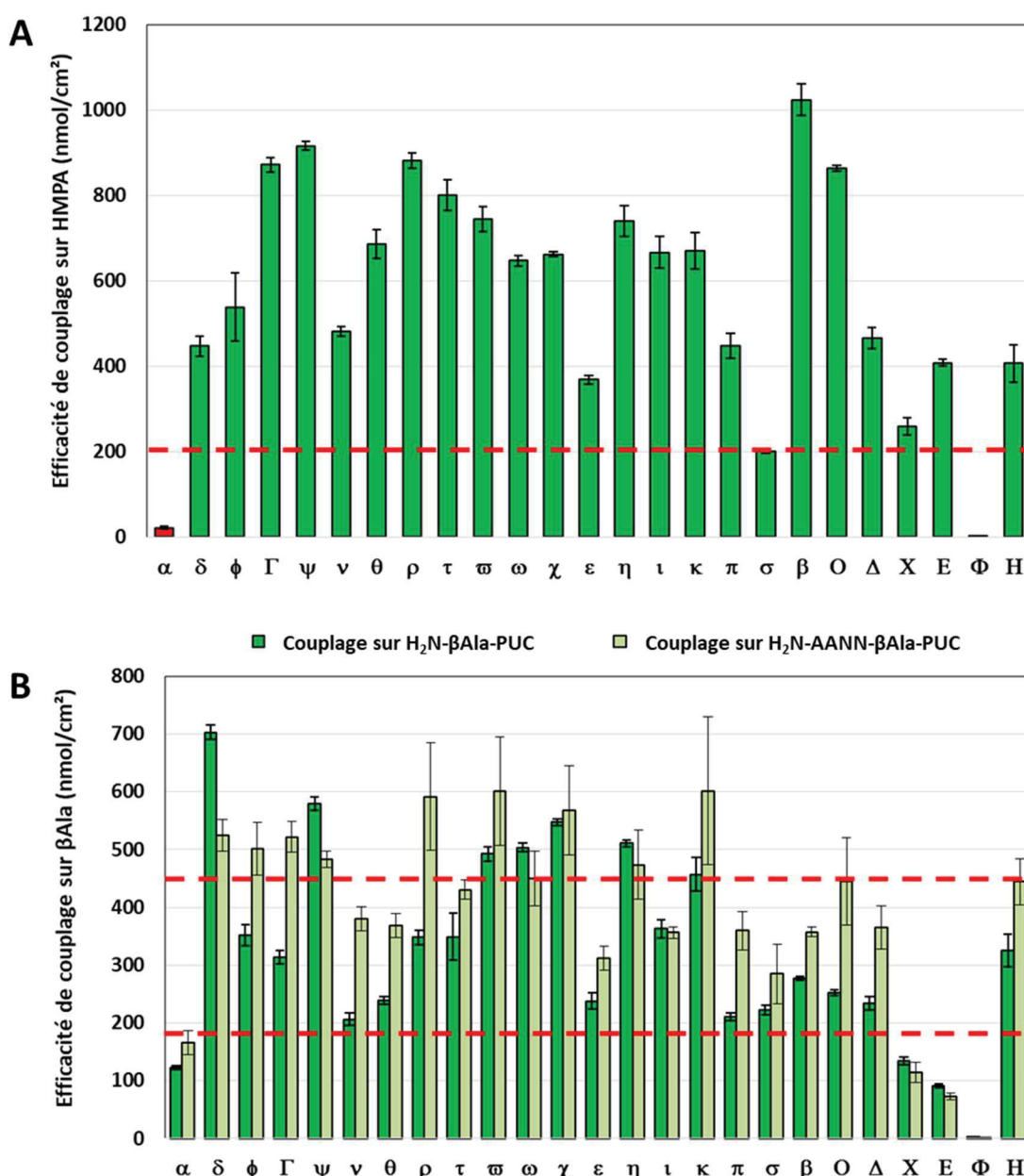


Figure 6.1. Efficacité de couplage de l'extrémité C-terminale des AANN sur HMPA et sur β Ala, et de leur extrémité N-terminale avec β Ala.

Des Fmoc-AANN activés par le CDI ou l'EEDQ ont été couplés sur des membranes PUC respectivement fonctionnalisées par HMPA ou par β Ala. L'efficacité du couplage a été mesurée par traitement avec une solution de pipéridine (20% dans le DMF) puis titrage spectrophotométrique ($\lambda = 301$ nm) de l'adduit Fmoc-pipéridine résultant. (A) : couplage des AANN sur HO-HMPA- β Ala-Cys(Trt)- β Ala-PUC. (B) : couplage des AANN sur H- β Ala-PUC (vert foncé) et couplage d'un motif β Ala sur H-AANN- β Ala-PUC (vert clair). Moyennes et écarts-types réalisés sur 3 répliques. L'efficacité de couplage minimale requise pour une synthèse optimale est de 100 nmol/cm² (ligne pointillée basse). Les efficacités de couplage d'AANN supérieures à 400 nmol/cm² (ligne pointillée haute) sont très probablement surestimées à cause des propriétés d'absorbance et de π -stacking des groupes aromatiques.

Le couplage d'acides aminés sur l'extrémité N-terminale des AANN est également mesuré en couplant un motif Fmoc-βAla sur un spot fonctionnalisé (H₂N-AANN-βAla-PUC) et en quantifiant la quantité de βAla couplée par la même méthode de quantification de l'adduit Fmoc-pipéridine (**Figure 6.1B**, barres vert clair). Aucune diminution significative de l'efficacité de couplage n'est observée par rapport à l'efficacité du couplage de l'AANN, indiquant que le couplage de la βAla sur l'AANN est quantitatif et que l'extrémité N-terminale des AANN testés est suffisamment réactive.

6.3.2. Analyse de substitution d'iCAL36 par des AANN

Dans le but d'identifier des remplacements avantageux de certains résidus du peptide iCAL36, une analyse de substitution (SubAna) utilisant 24 AANN différents a été menée. Trois SubAna identiques ont été synthétisées (méthode PIPE^{PLUS}) en parallèle sur une membrane PUC, puis ont été incubées avec les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1, permettant la révélation des interactions peptide/protéine (**Figure 6.2**). Les séquences ayant une affinité pour les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1 sont respectivement représentées en rouge, bleu ou vert. Dans le cas d'une séquence affine pour plusieurs protéines, un signal correspondant à la superposition des couleurs correspondantes est obtenu.

Chaque analyse de substitution possède une colonne *wild-type* représentant la séquence initiale. Cette colonne sert de contrôle interne de la synthèse SPOT. Néanmoins, il existe des cas où cette colonne est peu ou non visible : lorsque des interactions très fortes (spots très intenses) sont visibles pour certains analogues de la séquence à optimiser, la colonne *wild-type* peut disparaître car l'interaction du peptide *wild-type* est négligeable par rapport à celle de ces analogues.

1- iCAL36 interagit avec CALP ($K_i \approx 10 \mu\text{M}$) et la colonne *wild-type* est toujours apparente, bien que les dix spots n'aient pas une intensité identique : cela laisse suggérer que les spots substitués (en rouge) les plus intenses sont associés à une hausse modérée d'affinité pour CALP.

2- iCAL36 n'interagit pas avec N2P2 ($K_i > 5 \text{ mM}$), d'où le fait que la colonne *wild-type* ne fasse apparaître aucun spot. De fait, les spots substitués (en bleu) les plus intenses indiquent une hausse sensible d'affinité pour N2P2.

3- iCAL36 interagit fortement avec TIP-1 ($K_i \approx 1 \mu\text{M}$), or la colonne *wild-type* est très peu apparente : cela indique que tous les spots substitués (en vert) sont probablement associés à une forte hausse d'affinité pour TIP-1 (probablement inférieure à $1 \mu\text{M}$), rendant les spots de faible affinité invisibles.

Analyse de l'effet d'une mono-substitution de la séquence (P⁻⁹-ANSRWPTSII-P⁰)

- Position P⁰ (I) : des remplacements permettant une interaction favorable avec la protéine CALP sont observés notamment pour la norvaline (p) et la (triméthylsilyl)alanine (E) mais ces derniers font également apparaître une interaction pour la protéine N2P2 (E) ou pour la protéine TIP-1 (p).

- Position P⁻¹ (I) : certains AANN tels la norleucine (γ), la β-thiénylalanine (Ψ) et la cyclohexylglycine (v) sont des remplacements permettant de maintenir une affinité pour la protéine CALP. En particulier, la cyclohexylglycine (v) à cette position ne donne pas de signal pour la protéine N2P2 et donne un signal faible pour la protéine TIP-1. La norleucine (γ) permet également d'observer une légère sélectivité.

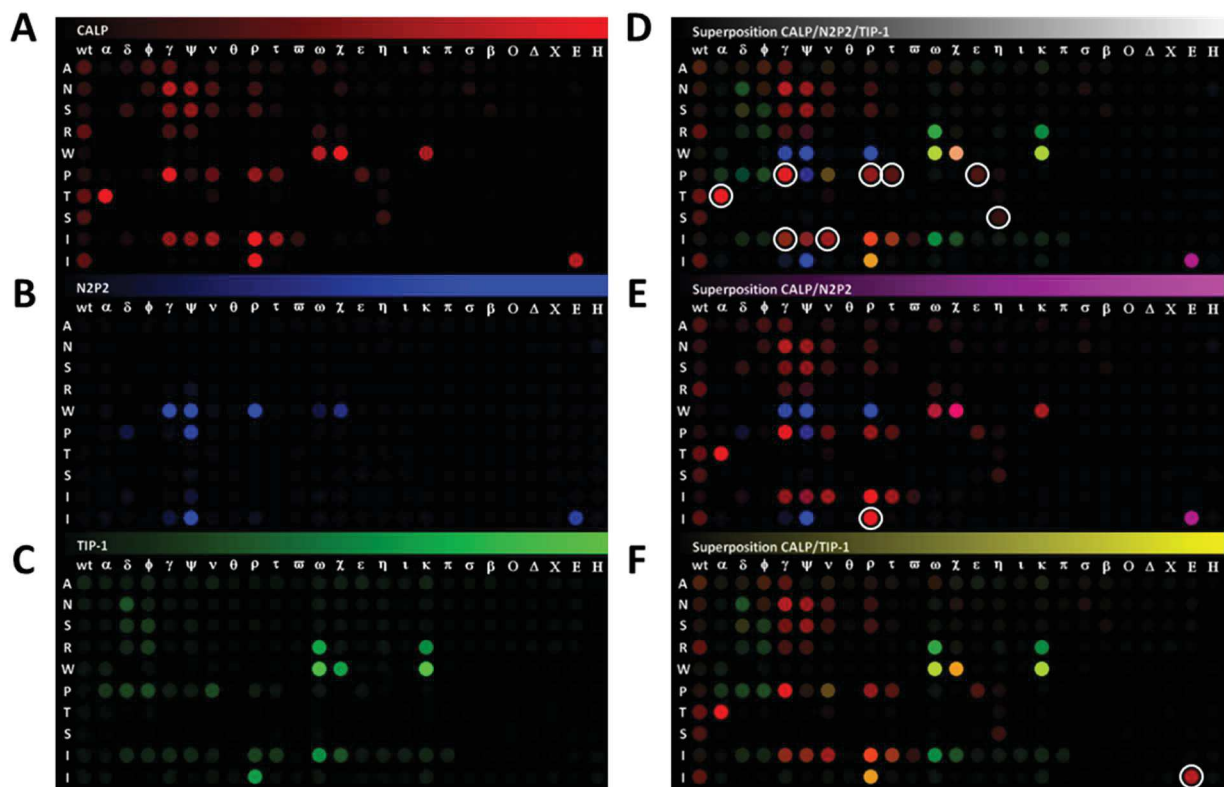


Figure 6.2. Introduction d'AANN dans la séquence d'iCAL36 en mono-mutation : effets sur l'interaction avec les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1.

Des membranes portant des analogues de substitution mono-mutationnelle d'iCAL36 par des AANN ont été synthétisées puis incubées avec CALP, N2P2 ou TIP-1. Les intensités relatives des spots sont corrélées avec l'intensité de l'interaction peptide/protéine. (A) Profil d'interaction peptide/CALP (rouge). (B) Profil d'interaction peptide/N2P2 (bleu). (C) Profil d'interaction peptide/TIP-1 (vert). (D) Superposition des trois profils. (E) Superposition des profils CALP et N2P2. (F) Superposition des profils CALP et TIP-1. Les spots rouges indiquent des séquences affines pour CALP mais qui n'interagissent pas avec N2P2 ou TIP-1. Les remplacements d'intérêt sont entourés en blanc.

- Position P⁻² (S) : un signal est observé pour la protéine CALP pour l'(aminooxyméthylcarboxyl) aminoalanine (η). Ce signal est faible, mais il n'est pas du tout observé pour les protéines N2P2 ou TIP-1.
- Position P⁻³ (T) : la *tert*-leucine (α) est un remplacement très favorable pour la thréonine, car il donne un fort signal pour la protéine CALP sans en donner pour les protéines N2P2 ou TIP-1.
- Position P⁻⁴ (P) : plusieurs AANN comme la norleucine (γ), la norvaline (ρ), l'acide 2-aminobutyrique (τ) ou la 3-hydroxyproline (ε) sont des remplacements possibles, permettant de conserver l'affinité pour la protéine CALP tout en ayant une affinité faible avec les protéines N2P2 ou TIP-1.
- Position P⁻⁵ (W) : la 1-naphtylalanine (ω), la 3-benzothiénylalanine (χ) ou la 2-naphtylalanine (κ) sont des remplacements menant à une forte hausse d'affinité pour la protéine CALP. Cependant, ils augmentent de façon considérable l'affinité pour la protéine TIP-1. Le remplacement par la 1-naphtylalanine (ω) et la 3-benzothiénylalanine (χ) donne également un signal pour la protéine N2P2.
- Position P⁻⁶ à P⁻⁹ : comme constaté précédemment pour des substitutions par des acides aminés naturels¹⁶⁵, ces positions n'affectent pas significativement l'affinité ou la sélectivité du peptide. On note que la présence de la norleucine (γ) ou de la β-thiénylalanine (Ψ) en position P⁻⁸ semble être légèrement préférable à celles d'autres AANN.

Cette première incubation nous a permis de constater qu'il est difficile de trouver des séquences iCAL-2G totalement sélectives pour la protéine CALP avec un seul AANN. Il semble qu'il y ait des remplacements avantageux pour les positions P⁻⁴ à P⁻¹ : ANSRWεαηνI (iCAL-Q1) serait par exemple une séquence envisageable.

Nous avons donc décidé de poursuivre le criblage de banques peptidiques en incluant simultanément deux AANN dans la séquence d'iCAL36, afin d'identifier d'éventuels effets synergiques suivant les changements d'acides aminés. Dans un premier temps, nous allons introduire l'AANN p en P⁰ (sélectivité pour la protéine CALP contre N2P2) puis cribler les positions P⁻¹, P⁻⁴ ou P⁻⁵ en cherchant à augmenter l'interaction pour la protéine CALP (augmentation du signal de chimiluminescence).

6.4. Criblage des positions P⁰, P⁻¹, P⁻⁴ et P⁻⁵ du peptide iCAL36

6.4.1. Criblage des positions P⁰ et P⁻¹ de la séquence ANSRWPTSII

Les résultats obtenus par analyse de substitution ont démontré l'importance des positions P⁰ et P⁻¹ pour la sélectivité envers N2P2. Une banque de peptides ANSRWPTS-P⁻¹-P⁰ a été réalisée pour cribler plus en détail les spécificités de ces positions (les positions P⁻¹ et P⁰ ont été chacune remplacée par les 24 AANN testés en analyse de substitution) (**Figure 6.3**).

Analyse détaillée de l'effet d'une double substitution de la séquence (ANSRWPTS-P⁻¹-P⁰) par des AANN

- Position P⁰ (I) : Différents AANN tels la norvaline (γ), l'acide 2-aminobutyrique (τ) ou la (triméthylsilyl)alanine (E) permettent d'observer une forte interaction avec la protéine CALP, tout comme la norleucine (γ) et la cyclohexylglycine (v) dans une moindre mesure. La norvaline (ρ), l'acide 2-aminobutyrique (τ), la norleucine (γ) et la cyclohexylglycine (v) sont sélectifs de la protéine CALP, alors que la (triméthylsilyl)alanine (E) mène également à une forte interaction pour la protéine N2P2.

- Position P⁻¹ (I) : une variété d'AANN hydrophobes tels que la norleucine (γ), la cyclohexylglycine (v), la norvaline (ρ) ou l'acide 2-aminobutyrique (τ) permet d'observer une interaction pour la protéine CALP, tout comme l'homoarginine (H). En particulier, la cyclohexylglycine (v) et l'homoarginine (H) en position P⁻¹ donnent des signaux forts, et la cyclohexylglycine (v) donne un très faible signal pour la protéine N2P2 (même avec la (triméthylsilyl)alanine (E) en position P⁰).

Les remplacements avantageux identifiés lors de cette analyse combinatoire correspondent à ceux observés en analyse de substitution (**Figure 6.2**). Seul l'acide 2-aminobutyrique (τ) en position P⁰ et

l'homoarginine (H) en position P^{-1} donnent des signaux précédemment non-observés. Plusieurs séquences semblent particulièrement intéressantes :

- ANSRWPTS**v** ρ (**iCAL-Q2**) donne un fort signal pour la protéine CALP et un signal quasi-inexistant pour la protéine N2P2 ;

- ANSRWPTS **τ** (**iCAL-Q3**) donne un signal correct pour la protéine CALP et un signal quasi-inexistant pour la protéine N2P2 ;

- ANSRWPTS**H** τ (**iCAL-Q4**) et ANSRWPTS**v****E** (**iCAL-Q5**) donnent un fort signal pour la protéine CALP et un faible signal pour la protéine N2P2.

Dans un premier temps, nous nous intéressons à la paire (**v**, **ρ**).

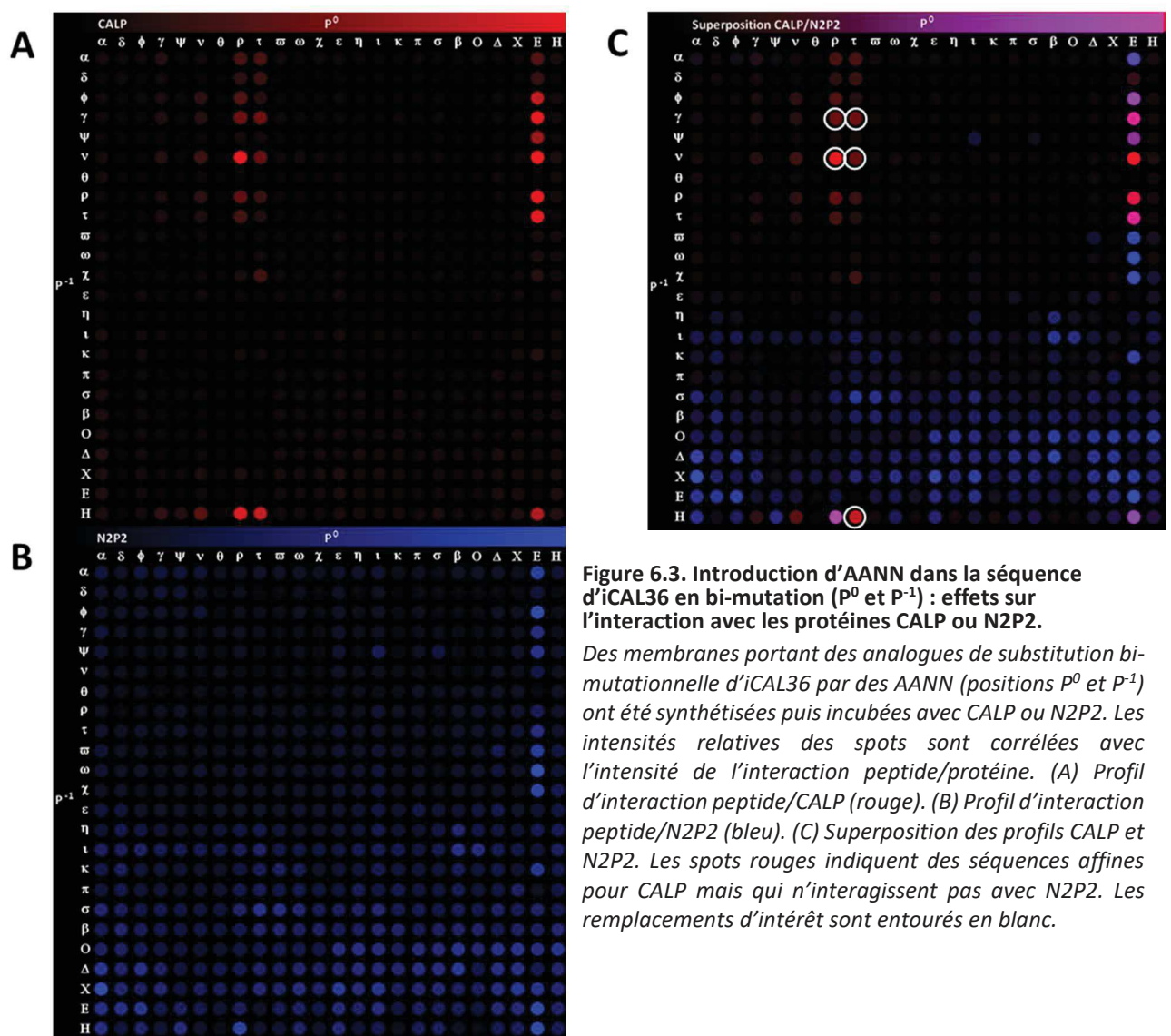


Figure 6.3. Introduction d'AANN dans la séquence d'iCAL36 en bi-mutation (P^0 et P^{-1}) : effets sur l'interaction avec les protéines CALP ou N2P2.

Des membranes portant des analogues de substitution bi-mutationnelle d'iCAL36 par des AANN (positions P^0 et P^{-1}) ont été synthétisées puis incubées avec CALP ou N2P2. Les intensités relatives des spots sont corrélées avec l'intensité de l'interaction peptide/protéine. (A) Profil d'interaction peptide/CALP (rouge). (B) Profil d'interaction peptide/N2P2 (bleu). (C) Superposition des profils CALP et N2P2. Les spots rouges indiquent des séquences affines pour CALP mais qui n'interagissent pas avec N2P2. Les remplacements d'intérêt sont entourés en blanc.

6.4.2. Criblage des positions P⁴ et P⁵ de la séquence ANSRWPTSvp

Après l'optimisation des positions P⁰ et P¹, les positions P⁴ et P⁵ semblent être celles laissant le plus de marge de manœuvre pour la découverte de nouveaux remplacements. Une nouvelle analyse combinatoire a donc été réalisée sur le peptide iCAL-Q2 (ANSR-P⁵-P⁴-TSvp) pour cribler plus en détail les spécificités de ces positions (**Figure 6.4**).

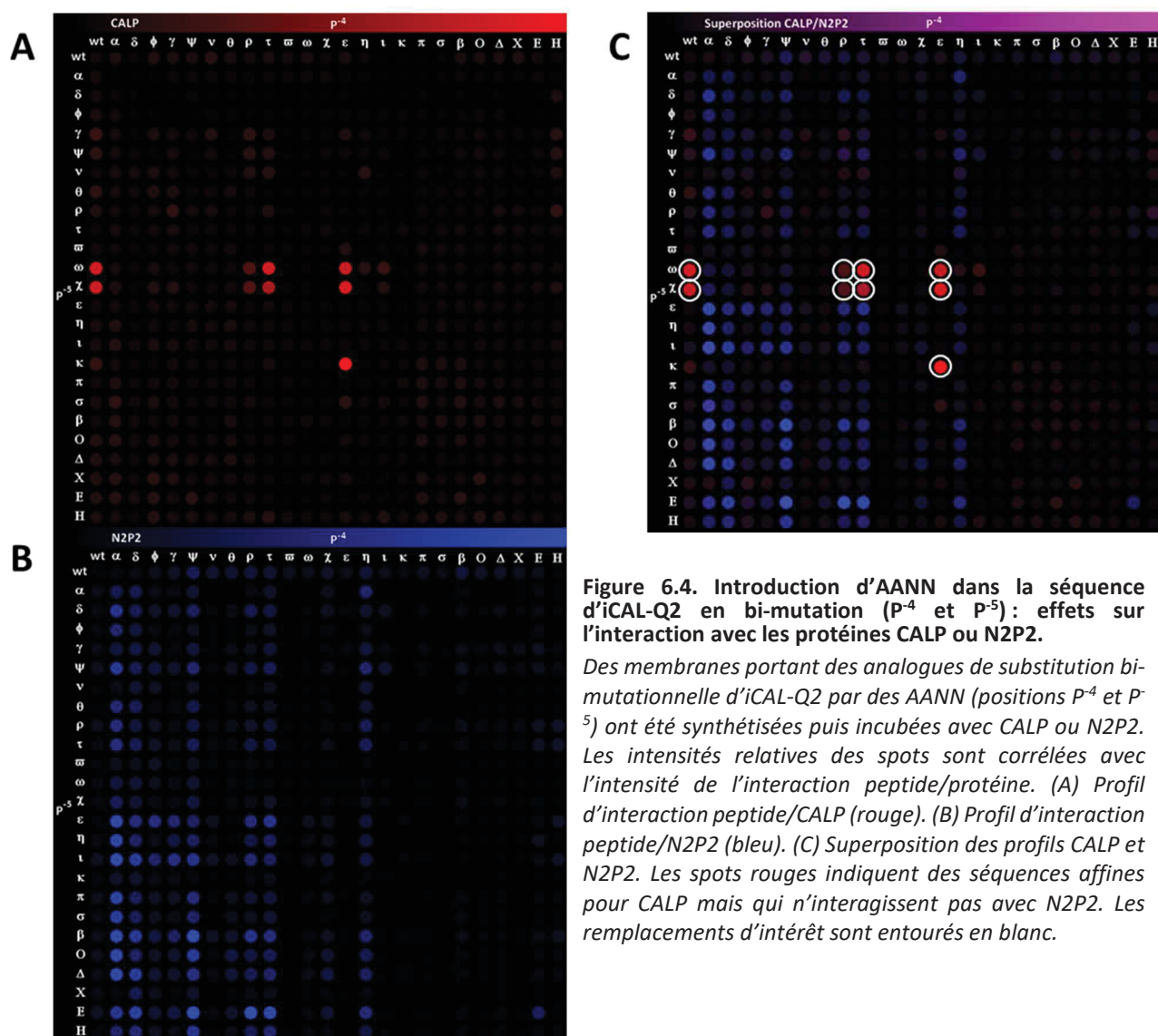


Figure 6.4. Introduction d'AANN dans la séquence d'iCAL-Q2 en bi-mutation (P⁴ et P⁵): effets sur l'interaction avec les protéines CALP ou N2P2.

Des membranes portant des analogues de substitution bi-mutationnelle d'iCAL-Q2 par des AANN (positions P⁴ et P⁵) ont été synthétisées puis incubées avec CALP ou N2P2. Les intensités relatives des spots sont corrélées avec l'intensité de l'interaction peptide/protéine. (A) Profil d'interaction peptide/CALP (rouge). (B) Profil d'interaction peptide/N2P2 (bleu). (C) Superposition des profils CALP et N2P2. Les spots rouges indiquent des séquences affines pour CALP mais qui n'interagissent pas avec N2P2. Les remplacements d'intérêt sont entourés en blanc.

Analyse de l'effet d'une double substitution de la séquence (ANSR-P⁵-P⁴-TSvp) par des AANN

- Position P⁴ (P) : certains AANN tels que l'acide 2-aminobutyrique (τ) ou la 3-hydroxyproline (ε) donnent des signaux équivalents à la proline initiale tout comme la norvaline (ρ) dans une moindre mesure. Cependant, aucune mutation en P⁴ ne renforce significativement le signal pour la protéine CALP par rapport à la colonne *wild-type*.

- Position P⁵ (W) : en association avec certains résidus P⁴ bien définis, les résidus aromatiques analogues au tryptophane comme la 1-naphtylalanine (ω), la 3-benzothiénylalanine (χ) et la 2-naphtylalanine (κ)

mènent à une forte augmentation de l'interaction avec la protéine CALP en comparaison de la séquence iCAL-Q2 Cet effet est associé à une absence de signal pour la protéine N2P2, ce qui en fait des résidus très intéressants.

Les résidus ω , χ et κ mènent à un renforcement de l'interaction pour la protéine CALP, ce qui avait déjà été observé en analyse de substitution (**Figure 6.2**). En revanche, l'interaction avec la protéine N2P2 précédemment observée pour ces résidus n'est plus visible : il est possible que les résidus modifiés aux positions P^0 et P^{-1} permettent de maintenir la sélectivité pour CALP.

ANSR $\omega\epsilon$ TSvp (iCAL-Q6), ANSR $\chi\epsilon$ TSvp (iCAL-Q7), ANSR $\kappa\epsilon$ TSvp (iCAL-Q8), ANSR $\omega\tau$ TSvp (iCAL-Q9), ANSR $\chi\tau$ TSvp (iCAL-Q10), ANSR ω PTSvp (iCAL-Q11) et ANSR χ PTSvp (iCAL-Q12) donnent toutes un fort signal pour CALP et un signal virtuellement inexistant pour N2P2. Ces séquences semblent équivalentes, nous choisissons donc arbitrairement la paire (ω , ϵ), définissant la séquence **iCAL-Q6 : ANSR $\omega\epsilon$ TSvp**.

6.4.3. Quantification de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL-Q6

Pour confirmer les résultats obtenus par synthèse SPOT, iCAL-Q6 (ANSR $\omega\epsilon$ TSvp) a été synthétisé sur résine, puis son affinité pour les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1 a été mesurée par FP et comparée aux caractéristiques d'iCAL36 (**Tableau 6.2**, **Figure 6.5**).

Tableau 6.2. Comparaison in vitro de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL36 et d'iCAL-Q6.

Protéine	CALP	N2P2	TIP-1
Ki iCAL36 (μ M)	$6,89 \pm 1,75$	$> 5\ 000$	$0,41 \pm 0,25$
Ki iCAL-Q6 (μ M)	$1,13 \pm 0,30$	$> 1\ 000$	$< 0,05$

Les valeurs de K_i (constante d'inhibition) correspondent à la dissociation du complexe peptide compétiteur/protéine d'intérêt. Moyennes et écarts-types réalisés sur 2 mesures indépendantes.

Comparativement à iCAL36, iCAL-Q6 présente une affinité renforcée d'un ordre de grandeur pour la protéine CALP ($1,13\ \mu$ M VS $6,89\ \mu$ M). L'affinité pour N2P2 reste de l'ordre du millimolaire, confirmant que le peptide iCAL-Q6 n'a pas d'interaction croisée avec cette protéine. Le peptide iCAL-Q6 constitue donc une preuve de concept et valide la possibilité d'atteindre une meilleure affinité pour CALP par incorporation d'AANN dans la séquence d'iCAL36, et ce sans affecter la sélectivité envers la protéine N2P2.

Cependant, l'affinité d'iCAL-Q6 pour la protéine TIP-1 est très élevée ($K_i < 50\ \text{nM}$), plus encore que celle d'iCAL36 ($K_i = 410\ \text{nM}$). Ce résultat était prévisible au vu de l'analyse de substitution. Toutefois il n'est pas possible d'estimer précisément le K_i de l'interaction TIP-1/iCAL-Q6 car l'interaction est trop forte par rapport au ligand fluorescent utilisé (*36), ce qui empêche un ajustement (*fitting*) correct de la courbe expérimentale, en particulier au niveau de la pente et du palier inférieur (valeurs négatives). Pour obtenir une valeur précise, il faudrait utiliser le peptide iCAL-Q6 marqué (ou un peptide présentant une affinité équivalente pour la protéine TIP-1) en tant que ligand fluorescent. En parallèle, il serait souhaitable de reprendre le criblage de séquences peptidiques afin d'identifier des peptides pour lesquels l'affinité pour TIP-1 est plus faible.

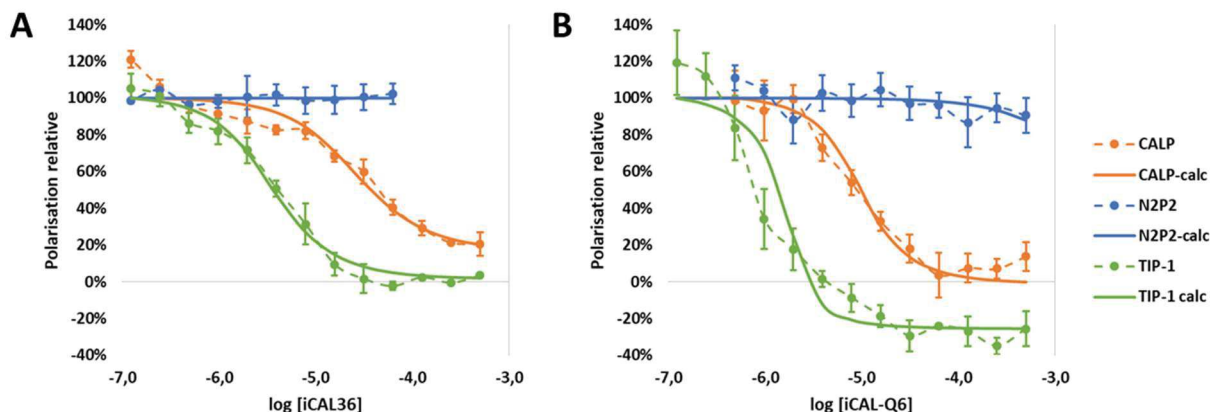


Figure 6.5. Affinité des peptides iCAL36 et iCAL-Q6 pour CALP, N2P2 et TIP-1 par FP.

Les courbes expérimentales (en pointillé) sont fittées par une courbe de valeurs calculées (en trait plein) qui est exploitée pour le calcul de la valeur de K_i . (A) Interaction du peptide iCAL36 avec CALP (orange), N2P2 (bleu) et TIP-1 (vert). (B) Interaction du peptide iCAL-Q6 avec CALP (orange), N2P2 (bleu) et TIP-1 (vert). Les courbes sont représentatives d'un des réplicas réalisés.

6.4.4. Criblage des positions P^5 et P^4 de la séquence ANSRWPTS γ

En comparaison avec les séquences ANSRWPTS ν p (iCAL-Q2), ANSRWPTS H t (iCAL-Q4) et ANSRWPTS ν e (iCAL-Q5), la séquence ANSRWPTS γ t (iCAL-Q3), identifiée lors de l'optimisation conjointe des positions P^1 et P^0 (Figure 6.3), présente un signal légèrement plus faible pour la protéine CALP mais montre une absence de signal quasi-totale pour la protéine N2P2. De plus en analyse de substitution, les résidus norleucine (γ) en P^1 et acide 2-aminobutyrique (τ) en P^0 donnent respectivement des signaux faible et nul pour TIP-1. Cette séquence est donc choisie comme point de départ pour le développement d'un peptide iCAL-2G présentant une absence d'affinité pour N2P2 et une affinité diminuée pour TIP-1.

Une analyse combinatoire a été réalisée sur le peptide ANSRWPTS γ t (ANSR- P^5 - P^4 -TS γ t) (Figure 6.6).

Analyse de l'effet d'une double substitution de la séquence (ANSR- P^5 - P^4 -TS γ t) par des AANN

- Position P^4 (P) : comme pour la séquence ANSRWPTS ν p, la 3-hydroxyproline (ϵ) (et l'acide 2-aminobutyrique τ dans une moindre mesure) donne des signaux équivalents à la proline initiale, mais aucun remplacement en P^4 ne permet d'élever significativement l'intensité du signal pour la protéine CALP en comparaison avec la colonne *wild-type*.

- Position P^5 (W) : les résidus aromatiques 1-naphtylalanine (ω), la 3-benzothiénylalanine (χ) et la 2-naphtylalanine (κ) mènent à une forte augmentation de l'interaction avec CALP en comparaison de la séquence ANSRWPTS γ t, tout en maintenant une absence d'affinité pour N2P2. Le résidu norleucine (γ) en P^5 semble également mener à une hausse d'affinité sélective de la protéine CALP, ce qui n'avait pas été observé pour la séquence ANSRWPTS ν p.

La norleucine (γ) est un analogue de la leucine présente dans iCAL42 (ANSRLPTSII), il est donc possible que l'introduction de γ en position P^5 abolisse l'interaction avec TIP-1 comme pour iCAL42.

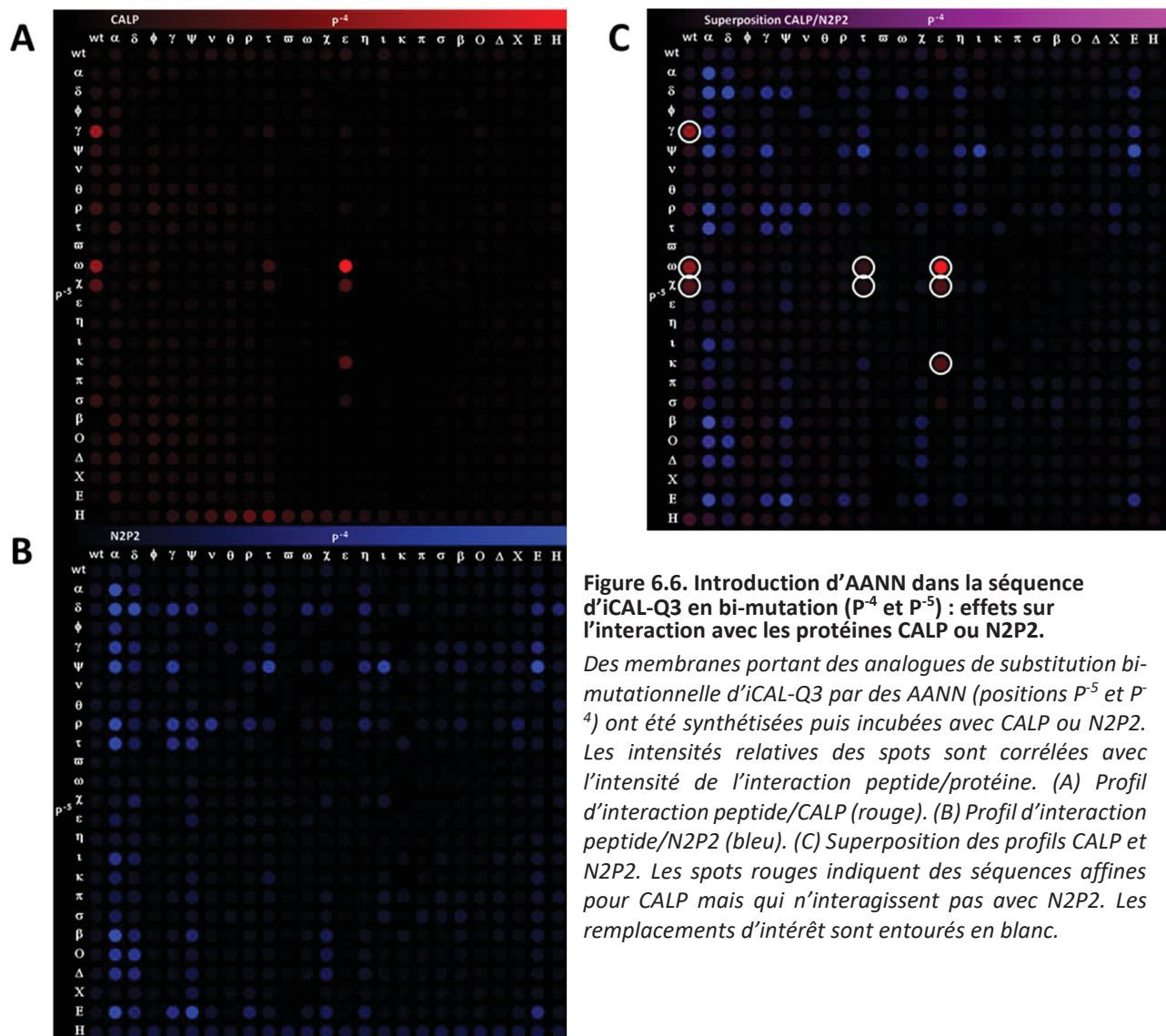


Figure 6.6. Introduction d'AANN dans la séquence d'iCAL-Q3 en bi-mutation (P⁴ et P⁵) : effets sur l'interaction avec les protéines CALP ou N2P2.

Des membranes portant des analogues de substitution bi-mutationnelle d'iCAL-Q3 par des AANN (positions P⁵ et P⁴) ont été synthétisées puis incubées avec CALP ou N2P2. Les intensités relatives des spots sont corrélées avec l'intensité de l'interaction peptide/protéine. (A) Profil d'interaction peptide/CALP (rouge). (B) Profil d'interaction peptide/N2P2 (bleu). (C) Superposition des profils CALP et N2P2. Les spots rouges indiquent des séquences affines pour CALP mais qui n'interagissent pas avec N2P2. Les remplacements d'intérêt sont entourés en blanc.

Suite à ce criblage plusieurs séquences spécifiques pour la protéine CAL peuvent être sélectionnées : ANSR γ PTS γ T (iCAL-Q13), ANSR ω PTS γ T (iCAL-Q14), ANSR χ PTS γ T (iCAL-Q15), ANSR ω T γ T (iCAL-Q16), ANSR χ T γ T (iCAL-Q17), ANSR χ ET γ T (iCAL-Q18), ANSR κ ET γ T (iCAL-Q19) et ANSR χ PTS γ T (iCAL-Q20) donnent toutes un fort signal pour CALP et un signal virtuellement inexistant pour N2P2.

Nous choisissons la séquence **iCAL-Q13 (ANSR γ PTS γ T)** car toutes les séquences proposées semblent avoir une interaction équivalente avec la protéine CALP, mais la présence d'un résidu non-analogue au tryptophane dans la séquence **iCAL-Q13** laisse augurer d'un effet sur l'interaction avec la protéine TIP-1.

6.4.5. Quantification de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL-Q13

Pour confirmer les résultats obtenus par synthèse SPOT, iCAL-Q13 (ANSR γ PTS γ T) a été synthétisé sur résine, puis son affinité pour les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1 a été mesurée par FP et comparée aux caractéristiques d'iCAL36 (Tableau 6.3, Figure 6.7).

Tableau 6.3. Caractérisation in vitro de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL-Q13.

Protéine	CALP	N2P2	TIP-1
Ki iCAL36 (μM)	$6,89 \pm 1,75$	$> 5\ 000$	$0,41 \pm 0,25$
Ki iCAL-Q6 (μM)	$1,13 \pm 0,30$	$> 1\ 000$	$< 0,05$
Ki iCAL-Q13 (μM)	$63,8 \pm 24,0$	$> 1\ 000$	$62,2 \pm 26,0$

Les valeurs de K_i (constante d'inhibition) correspondent à la dissociation du complexe peptide compétiteur/protéine d'intérêt. Moyennes et écarts-types réalisés sur 2 mesures indépendantes.

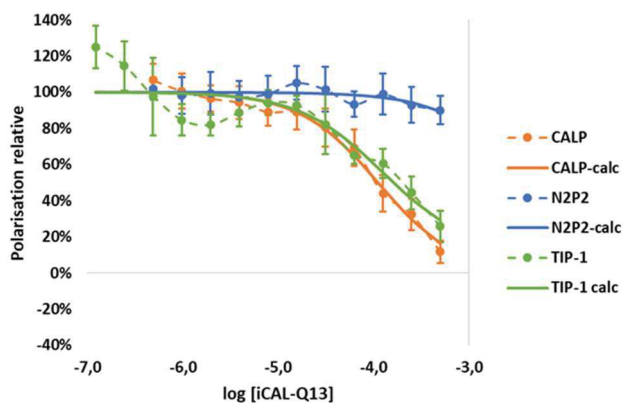


Figure 6.7. Affinité du peptide iCAL-Q13 pour CALP, N2P2 et TIP-1 par FP.

Les courbes expérimentales (en pointillé) sont fittées par une courbe de valeurs calculées (en trait plein) qui est exploitée pour le calcul de la valeur de K_i . Interaction du peptide iCAL-Q13 avec CALP (orange), N2P2 (bleu) et TIP-1 (vert). Les courbes sont représentatives d'un des réplicas réalisés.

L'affinité du peptide iCAL-Q13 pour la protéine TIP-1 est beaucoup plus basse que celle d'iCAL36 ($62,2\ \mu\text{M}$ VS $410\ \text{nM}$) : il semblerait donc que l'une des positions optimisées ait permis d'affecter significativement l'affinité pour TIP-1. L'affinité pour N2P2 augmente mais reste de l'ordre du millimolaire, confirmant que le peptide iCAL-Q13 n'a pas d'interaction croisée avec cette protéine. Afin de pouvoir définir précisément quelle position est responsable de cette perte d'affinité, il faudrait synthétiser et mesurer d'autres peptides présentant une mono-mutation de la séquence iCAL-Q13. Néanmoins, en quelques étapes, nous avons donc réussi à développer un peptide iCAL-2G non-affin pour la protéine N2P2 et présentant une affinité pour la protéine TIP-1 significativement réduite, même s'il serait probablement nécessaire de la diminuer davantage.

Cependant, en comparaison avec le peptide iCAL36, iCAL-Q13 présente une affinité beaucoup plus faible pour CALP ($63,8\ \mu\text{M}$ VS $6,9\ \mu\text{M}$), ce qui le rend moins efficace en tant qu'inhibiteur thérapeutique de CALP. Il apparaît au premier abord délicat de développer un peptide à la fois affin pour la protéine CALP et non-affin pour la protéine TIP-1, au vu de leurs préférences très similaires en termes de la composition en acides aminés de leur ligand.

En conclusion, nous avons été capables d'identifier deux nouvelles séquences dérivées d'iCAL : iCAL-Q6 présente une affinité pour la protéine CALP améliorée ($1,13\ \mu\text{M}$ VS $6,89\ \mu\text{M}$) mais également une forte affinité pour la protéine TIP-1. iCAL-Q13 est un peptide sélectif de la protéine CALP, qui n'interagit pas avec N2P2 et interagit 150 fois moins avec TIP-1 : par contre son interaction avec CALP est plus faible ($63,8\ \mu\text{M}$ VS $6,89\ \mu\text{M}$). En gardant à l'esprit les structures de ces deux peptides, et afin de comprendre de façon plus précise quels sont les déterminants de la sélectivité envers TIP-1 sur les positions P^{-1} et P^{-5} , une analyse combinatoire sera réalisée sur ces positions. Cette étude permettra potentiellement l'identification de nouveaux iCAL-2G affins pour la protéine CALP mais pas pour celle de TIP-1. Nous nous intéresserons également au rôle des positions P^0 et P^{-4} .

6.5. Déterminants de la sélectivité envers TIP-1

6.5.1. Criblage des positions P^{-1} et P^{-5} de la séquence ANSRWPTSIt

Une analyse combinatoire a été réalisée sur le peptide ANSRWPTSIt (ANSR-P-5-PTS-P-1- τ) (Figure 6.8). L'acide 2-aminobutyrique (τ) en position P^0 a été choisi plutôt que la norvaline (ρ) pour son interaction plus faible avec la protéine TIP-1 en analyse de substitution (**Figure 6.2**). De plus, un set restreint d'AANN a été utilisé pour les positions P^{-5} et P^{-1} (les 24 AANN utilisés excepté δ , θ et η).

Comme observé précédemment, les résidus aromatiques tels que la 1-naphtylalanine (ω), la 3-benzothiénylalanine (χ) ou la 2-naphtylalanine (κ) sont avantageux en position P^{-5} pour l'interaction avec la protéine CALP. Ces résidus promeuvent également une forte affinité pour la protéine TIP-1 : toutefois pour quelques doublets P^{-5}/P^{-1} , une perte d'affinité pour celle-ci est constatée.

- Pour les séquences ANSR ω PTSvt (**iCAL-Q21**) et ANSR χ PTS ρ t (**iCAL-Q22**), l'interaction pour la protéine CALP est forte alors que celle pour TIP-1 est faible ;

- Pour les séquences ANSR ω PTSHt (**iCAL-Q23**), ANSR χ PTS α t (**iCAL-Q24**) ou ANSR χ PTSvt (**iCAL-Q25**) le signal pour la protéine TIP-1 est fortement atténué alors que la diminution du signal de la protéine CALP est moindre, en comparaison avec les deux séquences précédentes.

- Les séquences ANSR ω PTSvt (**iCAL-Q26**) et ANSR ω PTSvt (**iCAL-Q21**) présentent une affinité similaire pour la protéine CALP mais dans le premier cas l'affinité pour TIP-1 est plus forte : cela semble indiquer que la cyclohexylglycine (v) est un meilleur remplacement de la position P^{-1} que la norleucine (γ).

D'après le criblage SPOT, il semblerait que l'interaction de la séquence ANSR ω PTSvt (**iCAL-Q21**) avec la protéine TIP-1 soit faible, ce qui est au premier abord étonnant car celle de la séquence ANSR ω ETSvp (**iCAL-Q6**) est très élevée ($K_i < 50$ nM). Cela indiquerait un effet soit de la position P^0 , soit de la position P^{-4} .

6.5.2. Criblage des positions P^{-1} et P^{-4} de la séquence ANSRWPTSIt

Afin d'étudier le rôle d'un remplacement de la proline en position P^{-4} par la 3-hydroxyproline (ϵ), un set de 4 séquences de type ANSRW- P^{-4} -TS- P^{-1} - τ incluant d'une part soit la proline soit la 3-hydroxyproline (ϵ) en position P^{-4} , et d'autre part soit la cyclohexylglycine (v) soit l'homoarginine (H) en position P^{-1} a été synthétisé sur cellulose puis incubé avec la protéine TIP-1 (**Figure 6.9**).

Pour les deux séquences étudiées, le remplacement de la position P^{-4} par ϵ ne semble pas affecter l'interaction avec la protéine TIP-1. Cela pourrait indiquer qu'entre les séquences ANSR ω ETSvp et ANSR ω PTSvt, la position affectant l'affinité pour la protéine TIP-1 serait plutôt la position P^0 , ce qui est en accord avec l'analyse de substitution (**Figure 6.2**).

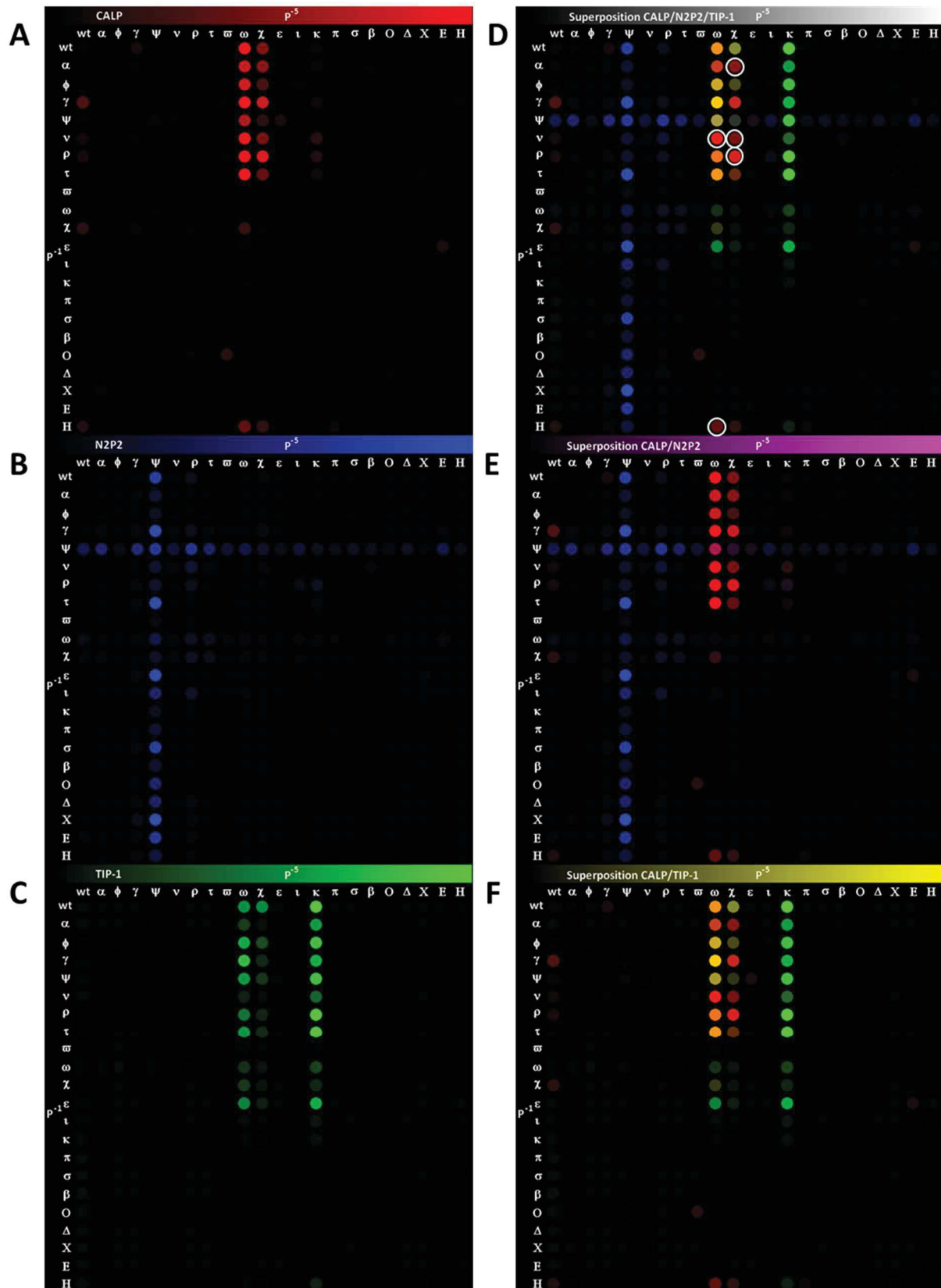


Figure 6.8. Introduction d'AANN dans la séquence ANSRWPTSI en bi-mutation (P^{-1} et P^{-5}) : effets sur l'interaction avec les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1.

Des membranes portant des analogues de substitution bi-mutationnelle de ANSRWPTSI par des AANN (positions P^{-1} et P^{-5}) ont été synthétisées puis incubées avec CALP, N2P2 ou TIP-1. Les intensités relatives des spots sont corrélées avec l'intensité de l'interaction peptide/protéine. (A) Profil d'interaction peptide/CALP (rouge). (B) Profil d'interaction peptide/N2P2 (bleu). (C) Profil d'interaction peptide/TIP-1 (vert). (D) Superposition des trois profils. (E) Superposition des profils CALP et N2P2. (F) Superposition des profils CALP et TIP-1. Les spots rouges indiquent des séquences affines pour CALP mais qui n'interagissent pas avec N2P2 ou TIP-1. Les remplacements d'intérêt sont entourés en blanc.

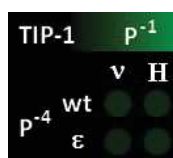


Figure 6.9. Influence de l'échange de la position P⁴ par ϵ .

Des membranes portant des séquences incluant soit Pro soit ϵ en P⁴ ont été synthétisées puis incubées avec TIP-1. Les intensités relatives des spots sont corrélées avec l'intensité de l'interaction peptide/protéine.

Nous avons décidé de confirmer ce résultat en développant un analogue d'iCAL-Q6 portant un résidu acide 2-aminobutyrique (τ) en position P⁰. De plus, lors de l'analyse de substitution, nous avons observé que le résidu *tert*-leucine (α) en position P³ permettait une hausse du signal suite à l'interaction avec la protéine CALP : nous allons donc également inclure ce résidu dans la séquence de nouveaux peptides iCAL-2G.

Nous définissons de fait les séquences **ANSR $\omega\epsilon\alpha$ Svp** (iCAL-Q27) et **ANSR $\omega\epsilon\alpha$ Svt** (iCAL-Q28), dérivant directement de la séquence iCAL-Q6.

6.5.3. Quantification de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL-Q27 et d'iCAL-Q28

Dans le but de confirmer les résultats obtenus par synthèse SPOT, les peptides iCAL-Q27 (ANSR $\omega\epsilon\alpha$ Svp) et iCAL-Q28 (ANSR $\omega\epsilon\alpha$ Svt) ont été synthétisés sur résine, puis leur affinité pour les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1 a été mesurée par FP (**Tableau 6.4**, **Figure 6.10**).

L'interaction des peptides iCAL-Q27 et iCAL-Q28 avec les protéines CALP et TIP-1 semble significativement plus élevée qu'avec le peptide iCAL-Q6 : comme précédemment, la force relative de ces interactions comparées aux interactions ligand fluorescent/protéine empêche la détermination précise des valeurs de K_i et nécessitera de répéter les expériences avec un ligand fluorescent plus affiné, tel que le peptide iCAL-Q28 marqué.

Le peptide iCAL-Q28 semble indiquer une absence d'interaction avec la protéine N2P2 (K_i > 1 mM). Pour la séquence iCAL-Q27, il est plus difficile de conclure car la diminution de signal à la concentration maximale de peptide iCAL-Q27 semble non-significative, mais est prise en compte lors du tracé de la courbe calculée : il faudrait répéter les expériences avec des quantités de peptide compétiteur plus élevées ou avec iCAL-Q27 marqué comme ligand fluorescent pour la protéine N2P2.

Tableau 6.4. Caractérisation in vitro de l'affinité et de la sélectivité d'iCAL-Q27 et d'iCAL-Q28.

Protéine	CALP	N2P2	TIP-1
Ki iCAL36 (μ M)	6,89 $\pm$ 1,75	> 5 000	0,41 $\pm$ 0,25
Ki iCAL-Q6 (μ M)	1,13 $\pm$ 0,30	> 1 000	< 0,05
Ki iCAL-Q13 (μ M)	63,8 $\pm$ 24,0	> 1 000	62,2 $\pm$ 26,0
Ki iCAL-Q27 (μ M)	$\approx$ 0,1	> 100	$\approx$ 0,01
Ki iCAL-Q28 (μ M)	$\approx$ 0,3	> 1 000	< 0,1

Les valeurs de K_i (constante d'inhibition) correspondent à la dissociation du complexe peptide compétiteur/protéine d'intérêt. Moyennes et écarts-types réalisés sur 2 mesures indépendantes.

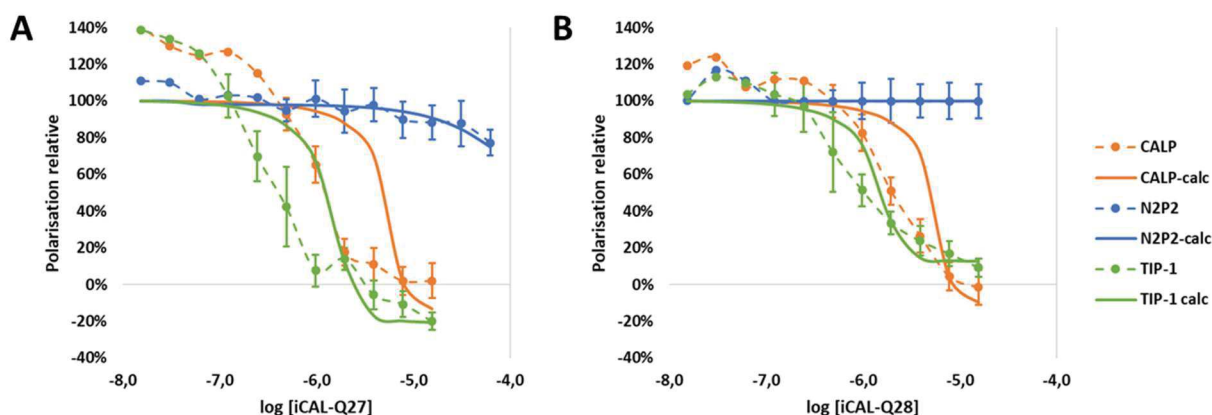


Figure 6.10. Affinité des peptides iCAL-Q27 et iCAL-Q28 pour CALP, N2P2 et TIP-1 par FP.

Les courbes expérimentales (en pointillé) sont fittées par une courbe de valeurs calculées (en trait plein) qui est exploitée pour le calcul de la valeur de K_i . (A) Interaction du peptide iCAL-Q27 avec CALP (orange), N2P2 (bleu) et TIP-1 (vert). (B) Interaction du peptide iCAL-Q28 avec CALP (orange), N2P2 (bleu) et TIP-1 (vert). Les courbes sont représentatives d'un des réplicas réalisés.

En conclusion, il apparaît que toutes les séquences synthétisées ont une affinité négligeable pour la protéine N2P2 et que l'affinité pour la protéine TIP-1 est toujours corrélée à l'affinité pour la protéine CALP, ce qui est inattendu mais possible car le criblage par synthèse SPOT ne permet pas de corréler linéairement le signal observé à l'affinité peptide/protéine. Si l'on compare visuellement les concentrations de peptide compétiteur requises pour atteindre 50% du signal de polarisation maximal, on peut réaliser les observations suivantes :

- Le peptide iCAL-Q27 semble 10 fois plus affin pour la protéine CALP ($K_i \approx 100$ nM) et 4 fois plus affin pour la protéine TIP-1 ($K_i \approx 10$ nM) en comparaison avec la séquence iCAL-Q6, indiquant un effet certain du remplacement de la position P^{-3} par la *tert*-leucine (α).

- Le peptide iCAL-Q28 semble 3 fois moins affin pour la protéine CALP ($K_i \approx 300$ nM) et 8 fois moins affin pour la protéine TIP-1 ($K_i \approx 80$ nM) en comparaison avec la séquence iCAL-Q27, indiquant que remplacer la norvaline (p) par l'acide 2-aminobutyrique (τ) en position P^0 affecte légèrement l'affinité pour la protéine CALP, mais affecte un peu plus fortement celle pour la protéine TIP-1.

Les peptides iCAL-Q27 et iCAL-Q28 semblent donc avoir une affinité sub-micromolaire pour la protéine CALP sans pour autant interagir avec la protéine N2P2, ce qui en fait des séquences extrêmement prometteuses. Toutefois, l'interaction avec la protéine TIP-1 est également très forte pour ces peptides.

6.6. Conclusion

Nous avons pu identifier de nouvelles séquences peptidiques dérivées du peptide iCAL36. Certaines de ces séquences (iCAL-Q6, iCAL-Q27, iCAL-Q28) semblent permettre d'observer une affinité jusqu'à 100 fois accrue pour la protéine CALP, tout en maintenant une absence d'interaction avec la protéine N2P2. Les résultats obtenus montrent que les positions P^0 , P^{-1} , P^{-3} et P^{-5} du peptide iCAL36 sont celles permettant le plus d'affecter l'affinité pour sa cible thérapeutique : en particulier, le remplacement de la thréonine (position P^{-3}) par un résidu *tert*-leucine (α) a été déterminant.

L'affinité des peptides dérivés de la séquence iCAL36 pour la protéine CALP est corrélée à leur affinité pour la protéine TIP-1 : les séquences iCAL-Q6, iCAL-Q27 et iCAL-Q28 semblent systématiquement 3 à 20 fois plus affines pour la protéine TIP-1 que pour la protéine CALP. Dans le cas du peptide iCAL-Q13, l'affinité pour la protéine TIP-1 est diminuée d'un facteur 150, mais l'affinité pour la protéine CALP est également diminuée d'un facteur 10. L'association des résultats obtenus dans cette partie semble indiquer que la position P⁻⁵ des peptides dérivés du peptide iCAL36 est déterminante, et que pour développer des peptides faiblement affins pour la protéine TIP-1 il sera probablement nécessaire d'introduire à cette position un AANN structurellement éloigné du tryptophane, mais qui permet de maintenir une bonne affinité pour la protéine CALP. Alternativement, s'il est possible d'identifier des résidus abolissant l'interaction pour la protéine TIP-1 sur d'autres positions, il sera alors envisageable de conserver un AANN proche du tryptophane en position P⁻⁵.

6.7. Perspectives : autres séquences iCAL-2G

Lors de cette thèse, nous avons développé un protocole permettant l'analyse des métabolites de dégradation de peptides par les peptidases. Ce protocole prévoit l'incubation du peptide dans un milieu contenant 20% de sérum humain, puis l'extraction des protéines sériques par précipitation avec de l'acétonitrile (proportion finale : 67%). Le surnageant récupéré ne contient que le peptide et ses métabolites, qui peuvent ensuite être identifiés et séparés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Ce protocole a mis en évidence la dégradation extensive du peptide iCAL36 par les protéases après 3 heures d'incubation à 37°C avec 20% de sérum humain (données non-présentées). Il pourra donc être employé prochainement pour analyser la stabilité métabolique des différents peptides iCAL-2G.

En parallèle, de par la relative non-spécificité des positions P⁻⁶ à P⁻⁹ du peptide iCAL36 (**Figure 6.2**) il est possible de remplacer certains résidus par des AANN, ce qui pourrait apporter de la stabilité métabolique. En particulier, le remplacement de l'arginine en position P⁻⁶ permettrait d'immuniser le peptide à l'action de la trypsine et de ses analogues fonctionnels. Le remplacement de l'acide aminé N-terminal (position P⁻⁹) permettrait également de protéger le peptide contre les exopeptidases. L'insertion de résidus N-méthylés serait également envisageable.

Sur base des résultats précédents (**Figure 6.2**), nous avons donc défini deux séquences dérivant d'iCAL-Q27 avec les séquences suivantes : **ANSy ω ϵ α Svp** (iCAL-Q29) et **σ Sy ω ϵ α Svp** (iCAL-Q30). Il serait intéressant de synthétiser ces deux peptides de seconde génération et d'effectuer des analyses supplémentaires (affinité, sélectivité et stabilité).

Dans un futur projet, il serait intéressant de synthétiser toutes les séquences sélectionnées dans ce chapitre afin d'analyser leur stabilité métabolique en présence de sérum humain et leur affinité/sélectivité pour les protéines CALP, N2P2 et TIP-1 en comparaison avec le peptide iCAL36.

Chapitre 7

-

Discussion générale

7.1. Une stratégie pour traiter la mucoviscidose

La mucoviscidose (CF) est la plus répandue des maladies autosomales récessives létales chez les Caucasiens, avec une incidence d'environ 1/3 500. Elle implique plus de 2 000 mutations différentes du gène codant le canal ionique CFTR³ (*cystic fibrosis conductance receptor*), dont la plus répandue est la mutation p.Phe508del (plus de 85% des patients CF). Ces mutations résultent en une perte d'efficacité de l'efflux d'anions (en particulier Cl⁻ et HCO₃⁻) des cellules épithéliales des organes tels que le poumon, l'intestin, le pancréas ou l'appareil reproducteur, ce qui en fait une maladie pluriviscérale. Dans le poumon en particulier, le faible efflux d'ions HCO₃⁻ provoque une déshydratation du mucus et une dérégulation de ses propriétés bactéricides : le mucus pulmonaire devient alors un terrain favorable pour de nombreuses bactéries pathogènes telles que *P. aeruginosa*, qui ne peuvent pas être évacuées par les cellules ciliées de par l'épaisseur du mucus. Les infections pulmonaires résultantes sont aujourd'hui le principal facteur de létalité de cette pathologie.

En complément d'antibiotiques ou d'agents permettant de fluidifier le mucus, constituant jusque-là le seul traitement des affections pulmonaires des patients CF, des modulateurs de la protéine CFTR ont récemment été développés. Ces agents corrigent les défauts de la protéine CFTR mutée (dégradation précoce, probabilité d'ouverture et faible demi-vie à la membrane) liés à son défaut de repliement. Un exemple notable est la bithérapie Orkambi® (Vertex Pharmaceuticals) qui est un médicament destiné aux patients de 12 ans et plus, homozygotes pour la mutation p.Phe508del. Ce produit constitué d'un correcteur (le Lumacaftor) et d'un potentiateur (l'Ivacaftor) de la protéine CFTR est le premier traitement approuvé par l'Agence américaine du médicament (FDA) à présenter un effet positif sur la santé des patients CF. Mais à cause de la faible stabilité de la protéine CFTR traitée par Orkambi®^{62,64,65}, l'effet thérapeutique est encore trop faible pour que les patients puissent avoir une vie dite « normale ». De plus, son usage quotidien provoque de lourds effets secondaires à long terme⁶³. Il y a donc une nécessité urgente de développer des molécules permettant de renforcer la demi-vie de la protéine CFTR mutée et/ou d'augmenter la quantité de protéine CFTR atteignant la membrane plasmique.

Ces dernières années, notre groupe s'est intéressé à la protéine CAL, médiateur-clé de la dégradation endosomale-lysosomale de la protéine CFTR^{28,29,309} en développant des peptides inhibiteurs (iCAL) de l'interaction CFTR/CAL. En particulier, le peptide iCAL36 (ANSRWPTSII) est un inhibiteur spécifique du domaine PDZ de la protéine CAL¹⁶⁵, qui présente une activité biologique potentiellement applicable dans le traitement de la mucoviscidose. L'inhibition de la protéine CAL par le peptide iCAL36 vectorisé par des liposomes (BioPorter®) a démontré une hausse significative (+11%) de l'activité du canal CFTR dans des cellules de patients p.Phe508del (CFBE-ΔF), un effet modeste mais qui peut être potentialisé par d'autres modulateurs de la protéine CFTR comme le correcteur corr4a (+25%)⁴⁸. Il a également été noté que le peptide iCAL36 n'a aucune interaction indésirable avec les protéines de la famille NHERF, qui ont un rôle clé dans la stabilisation de la protéine CFTR à la membrane plasmique.

L'objectif de ma thèse a été de renforcer l'effet biologique intrinsèque du peptide iCAL36 en améliorant ses caractéristiques : sa capacité à traverser les membranes pour atteindre sa cible intracellulaire, son affinité pour le domaine PDZ de la protéine CAL et sa stabilité métabolique. Pour cela, nous proposons deux stratégies : 1) l'association du peptide iCAL36 à un peptide vecteur (CPP), et 2) l'inclusion d'acides aminés non-naturels (AANN) dans la séquence du peptide iCAL36. A terme, ces deux stratégies pourraient mener au

développement de peptides iCAL optimisés, qui présenteront un effet thérapeutique accru et pourront être employés pour le traitement des patients CF en association avec d'autres modulateurs de la protéine CFTR.

7.2. Vectorisation du peptide iCAL36 par des CPP

Les peptides vecteurs (*cell-penetrating peptides*, CPP) ont la capacité extraordinaire de pénétrer les cellules seuls ou accompagnés d'une cargaison, qui peut leur être associée par des liaisons covalentes ou non-covalentes^{224,310}. Leur efficacité de transfection et leur cytotoxicité relativement faible en font des vecteurs extrêmement intéressants pour la délivrance intracellulaire du peptide iCAL36.

Des essais préliminaires menés avec des conjugués covalents Pen-iCAL36 et MPG-iCAL36^{166,287} ont donné des premiers indices concernant leur efficacité d'internalisation et leur effet biologique sur des cellules CFBE-ΔF cultivées en épithélium (+21% d'activité du canal CFTR avec 100 μM de Pen-iCAL36, à comparer avec +11% avec 500 μM de peptide iCAL36 vectorisé par le vecteur lipidique BioPorter®). Toutefois, à une concentration de 100 μM le conjugué Pen-iCAL36 montre une cytotoxicité faible (30%) mais non-négligeable¹⁶⁶. Nous avons émis l'hypothèse qu'internaliser iCAL36 avec des CPP de propriétés différentes pourrait permettre de s'affranchir de ce problème. Sachant que plus de 100 CPP différents ont été développés au cours des dernières années²⁴⁵, nous avons décidé de coupler sept CPP de différentes propriétés à la séquence du peptide iCAL36 et d'étudier leur relation structure-activité pour définir le meilleur candidat pour l'internalisation de cellules épithéliales.

Ces CPP ont été choisis dans le but de représenter les différentes classes de CPP connus. **Tat**¹⁹⁹ et la **pénétratine**²⁰⁰ sont des CPP non-amphipathiques (CPPna) qualifiés comme « non-immunogènes »³¹¹ et présentant une faible cytotoxicité en comparaison avec d'autres CPP comme les polyarginines³¹². **MPG**²⁰⁷ est un exemple-type de CPP amphipathique primaire (CPPap). **C6M1**²²⁹ et **WRAP5** (brevet en cours de dépôt) sont deux CPP amphipathiques secondaires (CPPas) habituellement utilisés pour le transfert d'oligonucléotides par stratégie non-covalente, qui présentent un mécanisme d'internalisation indépendant de l'endocytose³¹³ (pas de piégeage dans les endosomes, données non-présentées pour WRAP5). Nous avons été curieux de savoir si ces propriétés seraient maintenues en vectorisation covalente. De plus, les séquences correspondant à l'énantiomère de Tat (**dTat**²⁸⁸) et à son équivalent *retro-inverso* (**TRI**²⁸⁹) ont été sélectionnées afin de voir si l'inclusion d'acides aminés de configuration D (AAD) permettrait d'obtenir une hausse de stabilité métabolique tout en maintenant l'efficacité de transfection du peptide Tat, conformément à divers résultats de la littérature.

7.2.1. Quantifier l'internalisation de biomolécules

De nos jours, la quantification de l'internalisation des CPP (seuls ou associés à une cargaison), ou l'étude de leur localisation intracellulaire ainsi que de leur mécanisme d'entrée restent des étapes clés de par la multiplicité des facteurs à prendre en compte et par la diversité des applications biologiques (type de cellules, cargaison, etc.). En effet, à l'aube de l'étude des CPP certains biais majeurs n'étaient pas encore

connus, tels le risque de redistribution du peptide lors de la fixation des cellules, faussant sa localisation cellulaire³¹⁴ ; ou la capacité des CPP (cationiques) à se complexer aux motifs anioniques extra-membranaires (ex : protéoglycans), menant à une surestimation de la quantité totale de peptide internalisé³¹⁴. Pour circonvier à ces deux biais, les études sont désormais principalement menées sur des cellules vivantes, et une étape de trypsination est introduite pour cliver les protéoglycans et soustraire la fraction de peptide extra-membranaire.

Les différentes méthodes utilisées pour quantifier l'internalisation des CPP³¹⁵ ou indiquer leur localisation cellulaire présentent chacune leurs avantages et leurs limitations. Les méthodes basées sur la mesure de fluorescence sont adaptables à tout système biologique et faciles à mettre en place, mais ne permettent par exemple pas de distinguer un peptide intact d'un peptide dégradé ; de plus, le fluorophore peut affecter les propriétés physico-chimiques du peptide, sa localisation cellulaire ou sa cytotoxicité³¹⁶. Des phénomènes de quenching de fluorescence peuvent également être rencontrés^{317,318}. La quantification par spectrométrie de masse permet d'inclure ou non la fraction de peptide extra-membranaire ainsi que d'évaluer l'intégrité du peptide^{319,320}, mais avec cette méthode il est difficile d'obtenir des indications sur la localisation du peptide (cytosolique, intra-membranaire ou dans les organelles). Enfin, des essais basés sur une activité biologique de la cargaison permettent de directement mesurer l'efficacité du peptide en tant qu'agent de transfert (ex : délivrance d'un siRNA permettant le knock-down de la luciférase^{220,221}) ou d'étudier son mécanisme d'entrée. Mais cela n'est pas toujours possible, comme dans notre cas où il n'est pas envisageable de cribler l'efficacité de transfert des CPP-iCAL36 par leur activité sur le canal CFTR, car ces mesures sont fastidieuses et chronophages (expériences sur épithélium en chambre d'Ussing). Pour tirer des conclusions pertinentes sur le potentiel d'internalisation d'un CPP ou d'un CPP et sa cargaison, il est resté en tout cas crucial d'exploiter un ensemble de plusieurs de ces techniques.

Malgré cette diversité de méthodes de détection, des difficultés peuvent toujours être rencontrées pour interpréter la quantité internalisée, le mécanisme d'entrée et la localisation des peptides. Dans notre cas, nous avons mis en évidence plusieurs biais en comparant les données quantitatives obtenues par deux méthodes basées sur la fluorescence, la cytométrie de flux sur cellules entières et la spectroscopie de fluorescence sur lysats cellulaires. Il a notamment été observé que pour deux conjugués associant le peptide iCAL36 (cargaison à application thérapeutique) aux CPP amphipathiques secondaires (CPPas) C6M1 ou WRAP5, la quantité de peptide internalisée apparaissait bien plus élevée en spectroscopie sur lysats. Nous avons d'abord démontré que l'usage d'un tampon de lyse contenant des détergents peut affecter la structure du peptide et l'environnement de sa sonde, modifiant ainsi son rendement de fluorescence³¹⁷ : il est cependant possible de s'affranchir de ces biais par l'usage de facteurs de correction. Nous avons ensuite émis l'hypothèse de l'existence de phénomènes de quenching intra-membranaire pour les peptides capables d'insertion dans les bicouches lipidiques. Suivant ce modèle, nous avons donc supposé qu'en cytométrie de flux la fraction de peptide intra-membranaire serait invisible de par le quenching de fluorescence se produisant dans la membrane plasmique, alors qu'en spectroscopie sur lysats, la dissolution de la membrane empêcherait un tel quenching (**Figure 7.1**).

A l'issue de différents tests visant à démontrer cette théorie, l'existence de ces phénomènes de quenching a été associée à l'interaction du peptide marqué, plus spécifiquement sa sonde, avec des tryptophanes internes à la séquence peptidique (quenching intramoléculaire) ou intégrés aux protéines transmembranaires qui sont riches en résidus tryptophane^{321,322} (quenching intermoléculaire). Les interactions sonde-tryptophane sont reportées dans la littérature³²³⁻³²⁵ : dans notre cas, elles peuvent affecter la structure secondaire du peptide et/ou la disponibilité et le rendement quantique de la sonde fluorescente, que ce soit par quenching intramoléculaire ou intermoléculaire. En particulier, lorsque le

peptide est piégé dans la membrane lipidique il peut y avoir une interaction de type π -stacking entre la sonde et les résidus tryptophane des protéines transmembranaires, qui provoquent l'extinction de sa fluorescence. Ce mécanisme est différent de celui du quenching de la fluorescence de peptides liés aux motifs anioniques extracellulaires décrit par Swiecicki *et al*³¹⁸, qui implique une interaction intermoléculaire sonde-sonde facilitée par la forte densité de peptide à la surface cellulaire. Ces deux phénomènes impliquent que la fluorescence des fractions extra-membranaire et intra-membranaire de peptide peut être invisible en cytométrie de flux ou en microscopie confocale, d'où la nécessité de comparer les résultats obtenus *via* une ou plusieurs méthodes impliquant des cellules vivantes (cytométrie de flux, microscopie confocale) avec ceux obtenus *via* une ou plusieurs méthodes impliquant des lysats cellulaires (spectroscopie de fluorescence, spectrométrie de masse). Pour confirmer ces résultats, il est également important d'introduire un criblage mesurant l'activité biologique de la cargaison lorsque cela est possible.

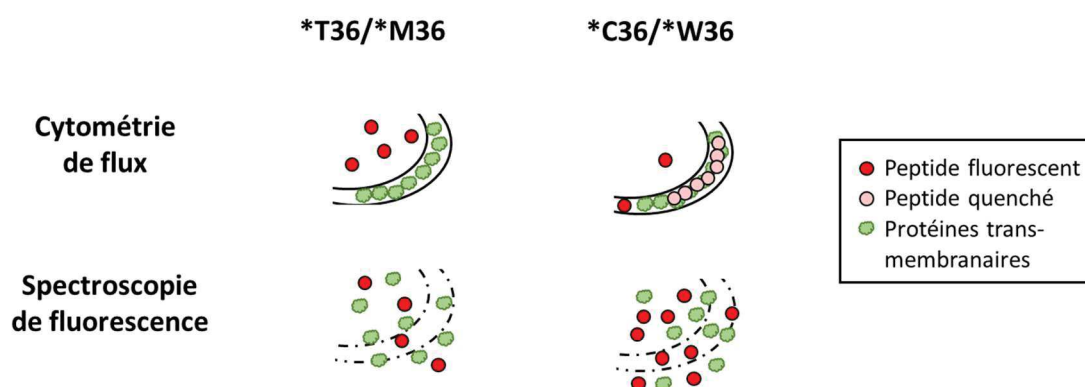


Figure 7.1. Modèle comparant les biais liés aux protéines transmembranaires en cytométrie de flux et spectroscopie de fluorescence pour l'internalisation de peptides *CPP-iCAL36.

En cytométrie de flux, les signaux de fluorescence quenchés par les tryptophanes des protéines transmembranaires ne sont pas visibles (visualisé par des spots roses). En spectroscopie de fluorescence sur lysats cellulaires, ce quenching de proximité forcée est aboli et le signal correspondant devient visible (spots rouges).

La révélation de ces phénomènes est d'une importance majeure pour l'usage de CPP amphipathiques secondaires (CPPas), en effet ces derniers présentent une versatilité de structures secondaires et sont fréquemment riches en tryptophanes^{209,220,229,261}, ils sont donc particulièrement sujets aux phénomènes de quenching impliquant des tryptophanes. Mais au-delà de cette catégorie spécifique, le tryptophane est très répandu parmi les séquences de CPP de par son rôle absolument crucial dans l'efficacité et la réversibilité de leur interaction avec les membranes lipidiques^{256,263,326}, lié à son caractère amphiphile qui lui donne de précieuses propriétés interfaciales dont ne disposent pas les résidus hydrophobes tels que la leucine^{327,328}. De fait, il est primordial d'être conscient des « effets secondaires » de la présence de tryptophanes dans la séquence d'un peptide marqué avec une sonde fluorescente.

Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication qui sera soumise à la revue « Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes » à l'issue de la procédure de dépôt de brevet de la séquence WRAP5.

7.2.2. Identification des CPP optimaux pour la vectorisation du peptide iCAL36

Comme mentionné plus haut, sept conjugués peptidiques CPP-iCAL36 (T36, dT36, TRI36, M36, P36, C36 et W36) ont été sélectionnés et testés afin de déterminer le(s)quel(s) serai(en)t le(s) plus approprié(s) pour l'internalisation du peptide inhibiteur iCAL36 en vue du développement d'un outil thérapeutique. Les sept conjugués ont été analysés suivant leur cytotoxicité potentielle, leur capacité de transfection et leur localisation intracellulaire, de façon à pouvoir sélectionner un ou deux candidats pour de futures expériences d'activité (mesures sur épithélium en chambre d'Ussing). Nous avons également examiné en détail le mécanisme d'internalisation des peptides sélectionnés.

Tableau 7.1. Séquences et caractéristiques physico-chimiques des peptides étudiés.

Peptide	Sigle	Nombre de résidus	Charge globale	Nombre de tryptophanes
Tat-iCAL36	T36	23	+9	1
dTat-iCAL36	dT36	23	+9	1
TRI-iCAL36	TRI36	23	+9	1
Pen-iCAL36	P36	26	+8	3
MPG-iCAL36	M36	37	+6	3
C6M1-iCAL36	C36	28	+8	5
WRAP5-iCAL36	W36	25	X	X

TRI : séquence de Tat en isoforme retro-inverso ; Pen : pénétратine. Le nombre de charges et de tryptophanes du peptide WRAP5 sont confidentiels pour cause de dépôt de brevet.

7.2.2.1. Les conjugués CPP-iCAL36 ne présentent pas de cytotoxicité aux doses pertinentes pour les cellules adhérentes

Nous avons tout d'abord évalué la cytotoxicité des conjugués CPP-iCAL36 sur des cellules Caco-2 et Calu-3, deux lignées qui reflètent le phénotype des cellules épithéliales humaines et qui sont fréquemment utilisées pour étudier la délivrance de molécules thérapeutiques dans l'intestin³²⁹ ou le poumon^{330–332}. Il est apparu que même après 24 h d'incubation, aucun des conjugués testés ne présente de cytotoxicité significative (déterminée par test LDH) pour des doses de 1 μ M ou de 10 μ M (toxicité de $0 \pm 10\%$), **Figure 4.1**). A une concentration de 100 μ M, certains peptides sont non-toxiques (T36, TRI36), alors que d'autres présentent une cytotoxicité modérée (P36, M36, dT36) ou forte (C36, W36).

L'absence de cytotoxicité des peptides T36 et TRI36 est intéressante, et fait écho d'une part à l'absence de cytotoxicité de Tat³¹², et d'autre part à l'article de Holm *et al* mettant en évidence le fait que pour des peptides courts, la modification *retro inverso* n'induit pas de hausse de cytotoxicité³³³.

La cytotoxicité modérée des peptides P36 et M36 (26% et 23%) a déjà été reportée dans des travaux précédents¹⁶⁶ confirmant nos résultats. Le peptide dT36 présente quant à lui une toxicité significative (21%

à 100 μM) en comparaison de ses deux analogues : cela évoque les travaux de Tünnemann *et al*, qui ont reporté que l'usage de l'énantiomère D du peptide Arg₉ a une toxicité significative en comparaison de la séquence en configuration naturelle³⁰². Enfin, la forte cytotoxicité de C36 et W36 à la concentration de 100 μM semble être liée à la tendance de ces peptides à précipiter au contact des cellules (données non-présentées), pouvant empêcher la libération de l'enzyme LDH : cette toxicité est à corrélée à celle du peptide C6M1 seul, faiblement cytotoxique dès 4 μM et fortement lytique à 100 μM ³¹³. Toutes ces analogies sont toutefois à nuancer de par l'influence probable du peptide iCAL36, en effet la cargaison d'un CPP influence généralement sa cytotoxicité^{245,334}.

La toxicité des conjugués CPP-iCAL36 à 100 μM n'est toutefois qu'indicative, car les doses de peptide habituellement utilisées sur des cellules adhérentes sont plus faibles (1-10 μM). De plus, les cellules en épithélium sont probablement plus résistantes que les cellules adhérentes aux divers effets cytotoxiques de par leurs jonctions plus serrées et leur plus faible surface d'interaction avec le milieu extracellulaire. Toutefois, la cytotoxicité des cellules en épithélium devra être vérifiée aux concentrations peptidiques utilisées.

7.2.2.2. Cinq conjugués délivrent efficacement iCAL36 dans le cytosol

L'efficacité de transfection et la localisation cellulaire des conjugués marqués par une sonde TAMRA (notée *) ont ensuite été respectivement étudiées par cytométrie de flux (**Figure 4.2**) et par microscopie confocale (**Figures 4.4** et **4.5**) sur les cellules Caco-2 et Calu-3. Nous avons tout d'abord prouvé nos hypothèses de départ, à savoir que le peptide iCAL36 seul n'internalise que très peu les cellules (2 à 3 fois le signal d'autofluorescence des cellules non-traitées, pas de signal visible en microscopie confocale) et que le couplage de CPP sur l'extrémité N-terminale du peptide iCAL36 renforce significativement son efficacité de transfection (à 1 μM jusqu'à 24 fois le signal du peptide iCAL36 selon les peptides). Les résultats obtenus correspondent aux valeurs citées dans la littérature pour la vectorisation de peptides par stratégie covalente²²³.

En accord avec les mesures du test LDH, aucun effet cytotoxique significatif (marquage au DAPI) ou changement morphologique des cellules ne sont observés aux doses étudiées lors des mesures par cytométrie de flux (viabilité de $(80 \pm 10) \%$, **Figure 4.2**). Pour tous les conjugués testés, le signal intracellulaire mesuré augmente de façon dose-dépendante mais pas toujours de manière linéaire, ce qui pourrait éventuellement indiquer des variations de mécanisme d'internalisation^{267,302} ou une saturation des voies d'entrées de la cellule²⁵⁰. Des durées d'incubation plus longues augmentent également l'efficacité de transfection des peptides dans le cas de fortes concentrations (5 μM), indiquant que l'équilibre entre concentration extracellulaire et intracellulaire de peptide²⁵⁰ n'est pas atteint après 1,5 h à 5 μM .

En microscopie confocale, les peptides *T36, *dT36, *TRI36, *P36 et *M36 présentent tous un signal intracellulaire ponctué restreint au cytosol, ne colocalisant ni avec les membranes (marquage WGA-Alexa488) ni avec les noyaux des cellules (marquage Hoechst) (**Figure 4.4** et **4.5**). Les trois conjugués dérivés de Tat (*T36, *dT36 et *TRI36) ont une efficacité d'internalisation presque identique, ce qui était attendu, car les CPP isomères ont des propriétés d'internalisation similaires^{254,265}. On remarque également que les conjugués dérivés de MPG (*M36) et de la pénétratine (*P36) sont plus efficaces que les conjugués dérivés

de Tat : dans le cas de Pen, cette observation est en ligne avec les expériences de Jones *et al* menées sur les peptides Pen et Tat conjugués avec différents cargos²¹³.

En revanche, les signaux correspondants aux conjugués *C36 et *W36 sont majoritairement accumulés à la membrane, révélant une quasi-absence de signal dans le cytosol qui est corrélée aux faibles signaux mesurés en cytométrie de flux. Ces résultats laissent penser que les conjugués *C36 et *W36 ne sont pas des vecteurs efficaces pour la délivrance de peptides en stratégie covalente, par opposition aux capacités des peptides parents C6M1²²⁹ et WRAP5 (données non-présentées) à délivrer des oligonucléotides par stratégie non-covalente.

Ces résultats indiquent que les cinq conjugués T36, dT36, TRI36, P36 et M36 permettent une délivrance efficace du peptide iCAL36 dans les cellules sans causer de cytotoxicité notable. Le conjugué dT36 ayant révélé une activité LDH plus élevée à une concentration de 100 µM, nous avons choisi de l'exclure également des prochaines analyses.

7.2.2.3. Les CPP-iCAL36 seraient-ils utilisables *in vivo* ?

Ayant prouvé l'efficacité de transfection des quatre conjugués CPP-iCAL36 dans des cellules modèles, nous avons ensuite cherché à développer des modèles plus pertinents dans le contexte d'un traitement *in vivo* des patients CF. En particulier, nous voulions savoir si les conjugués peptidiques seraient capables d'atteindre leur cible intracellulaire malgré la présence du mucus, dont le contenu riche en protéases et en macromolécules anioniques³³⁵ peut affecter l'efficacité de la transfection. La collecte et l'usage de crachats de patients CF étant réglementés, nous avons utilisé le sérum de veau fœtal pour mimer ce fluide biologique.

Les conjugués fluorescents *T36, *TRI36, *P36 et *M36 ont été incubés avec des cellules Caco-2 et Calu-3 en présence de pourcentages croissants de sérum et leur efficacité de transfection a été mesurée par cytométrie de flux (**Figure 4.6**).

Pour un faible ratio peptide/sérum (1 µM de conjugué peptidique), l'efficacité de transfection de tous les peptides est réduite significativement en présence de 20% de sérum. Nous avons attribué ces résultats à une association non-spécifique des peptides cationiques avec les contenants anioniques du sérum. *M36 subit une réduction encore plus marquée : à 20% de sérum, 67% de réduction contre 37-49% pour les autres conjugués. Il est intéressant de noter que *M36 est un CPPap (charge moyenne de +0.16 par résidu) alors que *T36, *TRI36 et *P36 sont des CPPna (charge moyenne de +0.35 par résidu) (**Tableau 7.1**). Il est donc possible que la forte charge positive de ces quatre conjugués ne soit pas complètement complexée par les protéines sériques permettant leur interaction avec les protéoglycans extracellulaires et donc leur internalisation.

A plus fort ratio peptide/sérum (5 µM de conjugué peptidique), tous les peptides subissent une perte significative d'efficacité de transfection, toutefois *TRI36 est moins affecté (à 20% de sérum, 18% de réduction contre 46-55% pour les autres conjugués). Nous supposons que l'effet d'association non-spécifique observé à 1 µM devient minoritaire devant la dégradation des peptides par les protéases. Il est possible que la légère réduction d'efficacité observée pour *TRI36 soit exclusivement liée à l'association du peptide aux protéines sériques, sachant que le motif *retro inverso* Tat ne peut être dégradé par les protéases (reporté dans la littérature pour TatRI³³⁶ mais aussi pour d'autres *retro inverso* CPP^{220,265}). Ces résultats

peuvent suggérer que TRI36 serait le composé optimal pour une délivrance *in vivo*. Il serait intéressant de confirmer ces résultats par co-incubation avec d'autres sources de protéases : en particulier, un milieu reproduisant la composition des glaires de patients de façon standardisée (*Artificial Sputum Medium*, ASM)³³⁷ pourrait être utilisé pour tester la stabilité des conjugués peptidiques dans un environnement plus représentatif.

Les peptides *T36, *P36 et *M36 restent toutefois des candidats pertinents, car pour tous ces conjugués une hausse de la concentration de peptide administrée permet de compenser l'effet de la dégradation des protéases et d'augmenter la quantité de peptide internalisé. Au vu des résultats obtenus, nous avons sélectionné TRI36 et P36 dans la suite de nos études. Il serait également envisageable de développer un nouveau CPP basé sur les résultats obtenus pour Pen, Tat et TRI : un analogue *retro inverso* de Pen (PRI) pourrait potentiellement présenter une efficacité de transfection voisine de Pen voire augmentée³³⁸ tout en ayant une résistance inhérente aux protéases. Toutefois, des travaux de Holm *et al* ont démontré que la conversion de Pen en son équivalent *retro inverso* peut être accompagnée d'une hausse de cytotoxicité³³³.

Après avoir prouvé l'efficacité des conjugués *TRI36 et *P36 dans un milieu riche en protéases, nous avons décidé de passer sur un modèle biologique plus pertinent. Il existe des modèles CF *in vivo* comme la souris, le cochon ou le furet permettant dans une certaine mesure d'étudier les aspects respiratoires de la mucoviscidose ou le développement des maladies intestinales⁷⁷. Toutefois ces modèles restent peu pertinents car leurs symptômes sont sous- ou surreprésentés par rapport aux symptômes observés chez les patients CF⁷⁷. De plus, certaines molécules thérapeutiques actives sur des cellules humaines n'ont pas d'effet sur ces modèles animaux, et inversement⁷². Il semble donc plus fiable de tester des agents thérapeutiques sur des cellules pulmonaires⁴⁸ ou des organoïdes^{287,339} issus de patients CF.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons pu démontrer une forte efficacité d'internalisation des conjugués *TRI36 et *P36 par des cellules épithéliales bronchiales de patients p.Phe508del (cellules CFBE41o- dites parentales) cultivées en monocouches non confluentes. Les valeurs obtenues sur les cellules CFBE41o- sont 3 à 6 fois plus élevées que sur les cellules Caco-2 ou Calu-3, indiquant probablement une perméabilité plus élevée des cellules CFBE41o- (**Figure 4.7**). A notre connaissance, aucune étude n'a comparé l'efficacité d'internalisation de biomolécules entre ces deux lignées cultivées en monocouches non confluentes. En revanche, des études ont démontré qu'une faible quantité de CFTR à la membrane apicale d'épithéliums peut diminuer la résistance électrique transépithéliale^{340,341}, expliquant potentiellement la perméabilité plus élevée des cellules CFBE41o-. Des cellules CFBE41o- cultivées en épithélium pourront être ultérieurement transfectées avec *TRI36 et *P36 (expériences prévu dans le nouveau projet financé par la fondation Vaincre la mucoviscidose).

Enfin, nous avons vérifié que TRI36 conserve l'affinité et la sélectivité de la séquence iCAL36 pour le domaine PDZ de la protéine CAL (CALP). L'élongation N-terminale du peptide iCAL36 par TRI multiplie par 4,5 l'affinité du peptide pour la protéine CALP (6,9 μ M iCAL36 VS 1,5 μ M TRI36, **Tableau 4.3** et **Figure 4.8**), ce qui est en ligne avec de précédents résultats de notre groupe, démontrant une affinité de divers CPP-iCAL de l'ordre du micromolaire^{166,287}. Elle maintient également sa sélectivité : aucune interaction de TRI36 n'est quantifiable avec les domaines PDZ de la protéine NHERF2 (>1 000 μ M). Ces résultats sont cohérents avec l'absence de rôle spécifique des positions N-terminales (à partir de P⁻⁶) du peptide iCAL36 dans l'interaction avec les protéines CALP ou N2P2¹⁶⁵.

En conclusion, la conjugaison d'un motif TRI sur l'extrémité N-terminale du peptide iCAL36 lui permet d'augmenter son efficacité de transfection sans induire de cytotoxicité ou de perte d'affinité pour sa cible biologique (**Tableau 7.2**), ce qui devrait garantir à TRI36 une activité de « stabilisateur » de la protéine CFTR

au moins égale à celle du peptide iCAL36 vectorisé par le BioPorter®. Cette hypothèse sera ultérieurement généralisée par analyse de l'affinité du conjugué P36 avec les protéines d'intérêt.

Tableau 7.2. Résumé du criblage de conjugués CPP-iCAL36.

	T36	dT36	TRI36	P36	M36	C36	W36
Absence de cytotoxicité	++	o	++	o	o	-	-
Efficacité de transfection	+	+	+	++	++	-	-
Adaptabilité aux conditions <i>in vivo</i>	+	<i>n.d.</i>	++	+	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Affinité pour la protéine CALP	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

++ : très bon ; + : bon ; o : moyen ; - : mauvais ; *n.d.* : non déterminé.

7.2.3. TRI36 et P36 sont internalisés par les voies d'endocytose

L'étude du mécanisme d'internalisation des peptides TRI36 et P36 est cruciale pour comprendre leur fonctionnement et leurs spécificités. Les mécanismes employés par les conjugués peptidiques déterminent notamment leur probabilité d'atteindre leur cible localisée dans le cytosol : les mécanismes d'entrée basés sur les voies d'endocytose impliquent la localisation du peptide dans les endosomes, alors que ceux reposant sur une translocation directe sont localisés dans le cytosol. Dans le premier cas, le peptide doit être capable de s'échapper des endosomes pour avoir un effet thérapeutique, car s'il y reste piégé il sera mené aux lysosomes et dégradé.

Dans un premier temps, nous avons donc étudié la capacité des peptides TRI36 et P36 à interagir avec des vésicules lipidiques (LUV) dont la composition lipidique reflète celle des membranes plasmiques neutres. La capacité de certains peptides à traverser les membranes par translocation directe est liée à leur propension à adopter une structure en hélice alpha à leur contact²⁶¹ : toutefois aucun changement de structure des conjugués peptidiques au contact de LUV neutres n'a été observé (**Figure 4.9**). Dans la littérature, le peptide Tat est connu pour conserver une structure *random coil* dans l'eau ou en présence de LUV, tandis que le CPP Pen a déjà démontré des changements de structure en présence de LUV²⁶¹ : il semblerait donc que le fragment iCAL36 affecte la structuration de la séquence de Pen. Dans le but de caractériser le potentiel de déstabilisation des membranes lipidiques, des mesures de fuite ont été réalisées sur des LUV encapsulant un fluorophore et un quencher (*leakage assay*). Cependant, une fois encore TRI36 et P36 n'ont pas démontré d'interaction significative avec les vésicules lipidiques (< 5% de fuite à 10 µM), ce qui est en accord avec le faible taux de fuite observé pour Tat ou Pen dans la littérature (< 10% de fuite à 1 µM)²⁶¹. Il est toutefois intéressant de noter que le peptide marqué *P36 a présenté un potentiel de fuite non-négligeable (20% de fuite à 0,5 µM), indiquant que la présence de la sonde hydrophobe TAMRA peut potentiellement affecter le mécanisme d'entrée du peptide, une notion largement reportée dans la littérature^{315,316,342}. Ces résultats, associés à l'absence de colocalisation entre *TRI36 ou *P36 et les membranes cellulaires, semble indiquer que ces peptides n'interagissent très probablement pas avec les membranes.

Nous nous sommes ensuite intéressés au mécanisme d'internalisation énergie-dépendant de TRI36 et de P36. En effet, les mécanismes d'endocytose sont dépendants de l'énergie cellulaire, alors que la translocation directe en est indépendante. La transfection des conjugués peptidiques à 4°C a mené à une perte significative de l'efficacité d'internalisation (85-90% de signal perdu), alors que leur transfection en présence d'inhibiteurs de l'ATP a mené à une perte de signal de 45% (**Figure 4.10**). Par des expériences de contrôle, nous avons pu mettre en évidence que cet écart est lié à la déplétion incomplète d'ATP (nécessaire pour ne pas induire d'effets cytotoxiques qui pourraient fausser les mesures) et non à une internalisation différente des peptides. Dans la littérature, une perte d'efficacité d'internalisation plus complète à 4°C qu'en présence d'inhibiteurs pharmacologiques est fréquemment observable^{215,314}. Ces résultats confirment que le mécanisme d'entrée des deux conjugués est très largement basé sur les voies d'endocytose.

Pour poursuivre l'évaluation du mécanisme d'internalisation des conjugués *TRI36 et *P36, nous avons étudié l'implication de diverses voies d'endocytose spécifiques : endocytose clathrine- et cavéoline-dépendante, et macropinocytose. Nous avons pour cela employé des inhibiteurs d'endocytose, ainsi que des marqueurs d'endocytose, d'endosomes et de lysosomes (**Tableau 7.3**).

Cependant, malgré cet ensemble d'expériences basées sur des stratégies de détection différentes, il n'a pas été possible d'attribuer avec certitude une voie d'internalisation distincte aux deux conjugués TRI36 et P36. Le cas le plus probable est qu'ils utilisent les voies d'endocytose qui sont énergie-dépendantes, ce qui est cohérent avec la colocalisation apparente des peptides avec les marqueurs d'endosomes tardifs et les lysosomes.

Si nous supposons une internalisation des peptides *TRI36 et *P36 par endocytose, ceux-ci peuvent s'accumuler dans les endosomes où un quenching de proximité peut avoir lieu entre les sondes des peptides. Pour mettre en évidence une éventuelle encapsulation endosomale des peptides, les cellules (Caco-2 ou CFBE41o-) ont été co-incubées avec de la chloroquine (**Figure 4.13**), un agent endosmotique empêchant l'acidification des endosomes et provoquant le relargage de leur contenu dans le cytosol, résultant en une augmentation du signal mesuré^{196,343,344}. Pour les deux types cellulaires, la chloroquine a mené à une multiplication du signal de *TRI36 ou *P36 par un facteur 2 ou 3 selon les cas, indiquant un piégeage dans les endosomes. Un tel facteur est dans la gamme de résultats observés pour Tat³⁴⁵ (1,7 fois plus de signal) ou PepFect14³⁴⁴ (4 fois plus de signal). Ces résultats confirment également que les deux conjugués CPP-iCAL36 sont internalisés majoritairement par une voie d'endocytose.

Les principales difficultés liées à l'analyse des mécanismes d'internalisation sont d'une part les effets cytotoxiques des inhibiteurs d'endocytose²⁹⁷ et d'autre part le manque de spécificité des marqueurs d'endocytose. Par exemple, une internalisation de la CtB (marqueur de l'endocytose cavéoline-dépendante) par association avec un CPP a été reportée³⁴⁶, tout comme l'implication des voies clathrine-dépendante dans l'internalisation de la CtB par des cellules Caco-2^{347,348} ; cet effet pourrait être lié à une interaction non-spécifique de la CtB marquée avec les protéines extra-membranaires et les bicouches lipidiques³⁴⁹. Une alternative pouvant permettre d'obtenir des résultats plus probants serait de tester d'autres substrats plus spécifiques tels que LacCer^{298,350-352} ou la *nitric oxide synthase*^{297,353}.

Les inhibiteurs d'endocytose ne peuvent quant à eux être utilisés qu'à faible concentration afin d'éviter des effets cytotoxiques, ce qui laisse la possibilité à la cellule de s'adapter en compensant par les autres voies d'endocytose^{270,354}. En effet, il a démontré que les CPP peuvent emprunter plusieurs voies d'endocytose de façon alternative ou simultanée^{267,276,355}. Pour consolider nos résultats, il serait néanmoins envisageable de tester d'autres inhibiteurs décrits dans la littérature²⁹⁷ comme la monodansylcadavérine

(voie clathrine-dépendante), la filipine et la lovastatine (voie cavéoline-dépendante) ou encore la cytochalasine D et le 5-(N-éthyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA) (macropinocytose).

Tableau 7.3. Résumé des expériences menées pour la détermination des voies d'endocytose employées par les conjugués peptidiques TRI36 et P36.

	Colocalisation			Inhibition		
		TRI36	P36		TRI36	P36
Endocytose clathrine-dépendante	Transferrine	+	+	CPZ	-	-
Endocytose cavéoline-dépendante	CtB	/	/	Nys	o	o
Macropinocytose	Dextran	++	++	/	/	/
Rafts lipidiques	/	/	/	MβCD	o	-
Voie endosomale	Endosomes précoces	-	-	Chloroquine	+	+
	Endosomes tardifs	+	+			
	Lysosomes	++	++			

Colocalisation. ++ : forte colocalisation ; + : colocalisation observable ; - : colocalisation non observée.

Inhibition. + : effet observable et significatif ; o : effet observable mais non-significatif ; - : pas d'effet.

/ : conditions non-déterminées.

Au cours de l'analyse des mécanismes d'internalisation des conjugués *TRI36 et *P36, nous avons pu observer dans certaines cellules un marquage homogène du peptide *TRI36 dans le cytosol. En particulier, l'augmentation de la concentration de peptide administrée aux cellules a été corrélée à une hausse du pourcentage de cellules présentant ce marquage homogène. Même si ces résultats doivent être confirmés, ils pourraient être corrélés à ceux de Duchardt *et al*²⁶⁷ ou de Tünnemann *et al*³⁰², qui mettent en évidence un changement du mécanisme d'internalisation de CPP fortement cationiques lorsque leur concentration extracellulaire augmente ; ou encore à ceux de Magzoub *et al*³⁰³ qui soulignent l'existence d'un lien entre la concentration de peptide administrée aux cellules et la capacité dudit peptide à s'échapper des endosomes. Dans notre cas, et au vu de l'absence d'interaction de *TRI36 avec des LUV mimant la membrane plasmique, il est possible qu'en augmentant la concentration de peptide administrée son mécanisme d'internalisation soit inchangé mais que sa capacité à déstabiliser les endosomes soit affectée. Pour soutenir cette théorie, il serait envisageable dans un futur proche de réaliser des essais de fuite *in vitro* permettant d'estimer le potentiel de déstabilisation de LUV reproduisant la composition lipidique des endosomes de TRI36 et P36. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la chloroquine pour différentes concentrations de *TRI36.

7.2.4. Conclusion

Dans la première partie de cette thèse, nous avons été capables d'identifier et sélectionner deux CPP (TRI et Pen) qui, une fois couplés au peptide iCAL36, lui permettent d'être internalisé dans le cytoplasme

sans provoquer de cytotoxicité. Ces deux conjugués peptidiques présentent une efficacité de transfection sur trois types cellulaires pertinents (Caco-2, Calu-3 et CFBE41o-) dans le cadre de la mucoviscidose et maintiennent une affinité pour la cible biologique du peptide iCAL36, le domaine PDZ de la protéine CAL. De plus, le CPP TRI présente une résistance innée aux protéases qui sera extrêmement utile pour une future administration dans les poumons des patients CF.

Nous avons également pu caractériser de façon extensive de mécanisme d'entrée des conjugués peptidiques TRI36 et P36 dans des cellules Caco-2. L'absence d'interaction de ces peptides avec les composants lipidiques de la membrane plasmique ont permis de postuler une internalisation par les voies d'endocytose, ce qui a pu être confirmé par des inhibiteurs et marqueurs d'endocytose. Nous avons mis en évidence le piégeage partiel des conjugués peptidiques dans les endosomes, mais avons observé que pour *TRI36, une variation de la concentration de peptide administré peut faciliter la fuite du peptide hors des membranes endosomales. Ces résultats, associés à l'absence de *leakage* de LUV de composition lipidique reflétant la membrane plasmique, semblent indiquer que Tat *retro inverso* déstabiliserait sélectivement les membranes endosomales sans affecter les membranes plasmiques, permettant une libération efficace du peptide iCAL36 dans le cytosol sans présenter de cytotoxicité.

7.3. Développement de peptides thérapeutiques iCAL de seconde génération (iCAL-2G)

7.3.1. Optimiser la séquence du peptide iCAL36 pour diminuer sa dose thérapeutique

Le peptide iCAL36 est un inhibiteur sélectif de l'interaction entre les protéines CFTR et CAL, qui se fixe sur le site d'interaction de CAL correspondant à son domaine PDZ ($K_i \approx 10 \mu\text{M}$) sans interagir avec les domaines PDZ des protéines NHERF ($K_i > 5 \text{ mM}$) impliquées dans l'ancrage de la protéine CFTR à la membrane apicale des cellules épithéliales. Cependant, au cours d'expériences non-publiées nous avons pu montrer qu'il interagit également avec la protéine TIP-1 ($K_i \approx 1 \mu\text{M}$) qui est impliquée dans l'expression des protéines membranaires, dont CFTR fait partie. Dans un second criblage effectué par notre équipe, nous avons identifié le peptide iCAL42 (mutation tryptophane $\rightarrow$ leucine en position P⁻⁵), plus sélectif pour la protéine CALP car sans réactivité avec la famille des protéines NHERF ou TIP-1 (résultats non-publiés). Cependant, sachant que ce nouveau peptide a une affinité réduite pour la protéine CALP comparé à iCAL36 (3 fois moins affin), nous avons décidé de développer les peptides iCAL de seconde génération en partant de la séquence du peptide iCAL36.

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que le couplage d'un CPP (en particulier, Pen ou TRI) sur l'extrémité N-terminale du peptide iCAL36 lui confère de bonnes propriétés de pénétration cellulaire, ce qui pourrait avoir un impact sur son activité biologique. Afin d'augmenter cet effet biologique et de réduire

la dose nécessaire pour observer cet effet, nous avons souhaité renforcer l'affinité du peptide inhibiteur iCAL36 ainsi que sa stabilité métabolique. Nous avons utilisé pour cela des acides aminés non-naturels (AANN) qui permettront d'introduire une diversité moléculaire importante dans la séquence du peptide, ainsi qu'une résistance inhérente aux protéases. Maximiser l'efficacité des peptides iCAL permettra de diminuer la dose de peptide requise pour traiter les patients CF. Ceci, associé à une absence d'interaction avec les protéines NHERF et TIP-1, permettra de minimiser les effets indésirables éventuels du traitement.

7.3.2. L'extension PIPE^{PLUS} de la synthèse SPOT pour cribler les interactions peptide/PDZ

Les domaines PDZ sont des domaines d'interaction protéine-protéine extrêmement répandus chez toutes les espèces, qui sont constitués de 80-90 résidus et qui interagissent majoritairement avec l'extrémité C-terminale de leurs ligands. Outre leur importante implication dans la mucoviscidose (les protéines CAL et NHERF interagissent avec CFTR *via* des domaines PDZ), ils ont également un rôle majeur dans des pathologies très variées. Leur étude et le criblage de leurs ligands est donc de la plus haute importance.

Des méthodes génétiques telles que le *phage display* ou le double hybride (*yeast two-hybrid*) ont permis d'étudier avec succès les ligands des domaines PDZ^{143,148,150}. En parallèle, des méthodes chimiques telles la stratégie « *one-bead-one-compound* » ou la synthèse SPOT permettent également un criblage de ces interactions. Pour ces méthodes chimiques, la liaison du peptide à son support peut nuire à sa liberté conformationnelle et affecter les interactions entre peptide et protéine. De plus, l'impossibilité de purifier les peptides synthétisés peut occasionnellement mener à de faux positifs. Toutefois, elles ne souffrent pas des biais introduits par l'usage de bactéries ou de levures. En particulier, la synthèse SPOT permet une identification directe des séquences efficaces et est très versatile, permettant de synthétiser aisément un grand nombre de séquences très différentes et d'inclure facilement tous types de *building blocks* chimiques^{162,356,357}.

Pour pouvoir cribler les interactions de peptides synthétisés par SPOT avec un domaine PDZ, il est nécessaire que l'extrémité C-terminale des peptides soit libre : or en synthèse chimique traditionnelle, cette extrémité est fixée au support solide et l'élongation se fait de façon N-terminale. Pour répondre à ce problème, notre groupe a développé le processus du peptide inversé qui implique une élongation N-terminale des chaînes peptidiques qui sont par la suite « inversées » par un processus de connexion/déconnexion de leurs extrémités^{162,358} (**Figure 7.2**) ; nous avons récemment publié une procédure optimisée menant à des signaux mieux résolus³⁵⁹. De façon alternative à cette méthode, une stratégie récemment publiée permet l'activation N-terminale des acides aminés sans épimérisation significative et l'élongation C-terminale de la chaîne peptidique³⁶⁰. Il serait intéressant de voir si cette stratégie pourrait être appliquée à la synthèse SPOT.

La sensibilité du criblage par synthèse SPOT ainsi que l'efficacité de la méthode des peptides inversés sont définis par le contrôle de la densité de chaînes peptidiques sur la membrane de cellulose et le rendement de l'étape de cyclisation. Ces deux paramètres ont été optimisés dans le cadre de cette thèse, menant à une méthode de criblage de sensibilité améliorée (PIPE^{PLUS})³⁵⁹ qui a prouvé son efficacité dans le cadre de l'analyse de substitution du peptide iCAL36 par des acides aminés naturels et non-naturels. Cette

méthode nous a donc apparue être optimale pour cribler différents analogues du peptide iCAL36 incluant des AANN afin d'améliorer l'affinité et la sélectivité de celui-ci pour sa cible biologique, la protéine CAL.

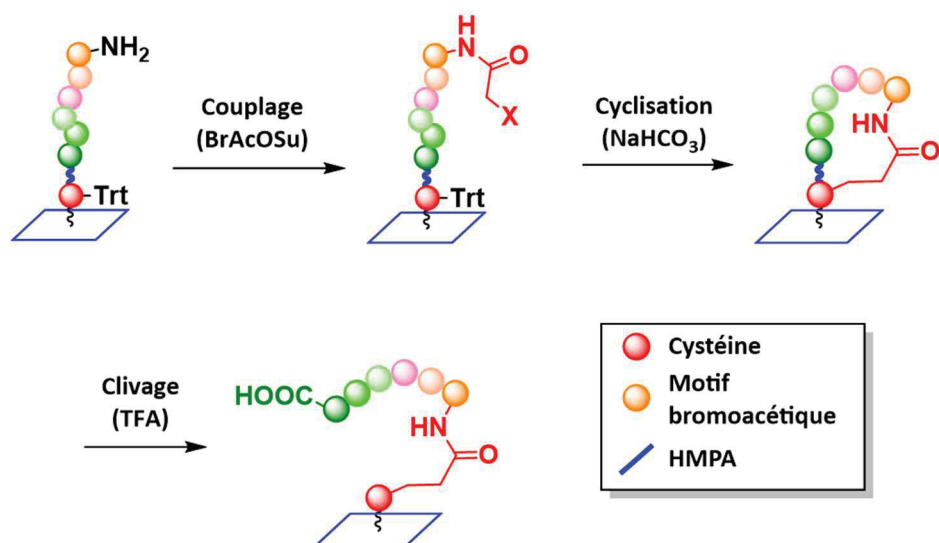


Figure 7.2. Processus du peptide inversé optimisé (PIPE^{PLUS}).

La méthode PIPE^{PLUS} permet de connecter l'extrémité N-terminale (vert clair) des peptides au support solide tout en libérant leur extrémité C-terminale (vert foncé) pour la reconnaissance des domaines PDZ.

7.3.3. Modulation de l'affinité du peptide iCAL36 par des AANN

La séquence du peptide iCAL36 a été soumise à une analyse de substitution lors de laquelle chaque position du peptide a individuellement été remplacée par l'un des 25 AANN étudiés (**Tableau 6.1**). Les membranes synthétisées ont été incubées avec les protéines aux domaines PDZ de CAL (CALP), NHERF2 (N2P2, second domaine PDZ de la protéine) et TIP-1 (TIP-1) ce qui a permis de cribler un panel d'interactions peptide/protéine et d'étudier l'influence de remplacements dans la séquence du peptide iCAL36. La protéine N2P2 a été choisie pour modéliser l'interaction avec les protéines NHERF car parmi les quatre domaines, il s'agit de celui pour lequel il est le plus difficile d'obtenir une sélectivité pour CALP¹⁶⁵.

Diverses séquences incluant un AANN ont démontré un maintien d'interaction avec les protéines CALP, N2P2 et/ou TIP-1. Parmi les AANN, certains sont des analogues directs d'acides aminés naturels (leucine → norleucine ; proline → 3-hydroxyproline ; tryptophane → 1-naphtylalanine, etc.), alors que d'autres n'ont pas d'équivalents directs (acide 6-aminohexanoïque, etc.). Cette analyse de substitution nous a entre autres permis de cartographier l'effet de chaque position du peptide iCAL36 sur la sélectivité des protéines CALP, N2P2 et TIP-1 et d'identifier le caractère des résidus induisant une hausse de signal (**Tableau 7.4**).

Les nouvelles séquences incluant un AANN interagissant avec CALP respectent globalement les critères précédemment observés lors de l'analyse de substitution du peptide iCAL36 par des acides aminés naturels¹⁶⁵, tels que le caractère hydrophobe des positions P⁰, P⁻¹, P⁻⁴ et P⁻⁵, la forte sélectivité de la sérine en position P⁻² ou l'absence de sélectivité des positions P⁻⁶ à P⁻⁹.

Certains de ces remplacements AANN semblent permettre une hausse d'affinité conséquente (signal de chimiluminescence augmenté) pour la protéine CALP, comme l'introduction de la *tert*-leucine (α) en position

P⁻³ (thréonine → α) (**Figure 6.2**). En revanche, lorsqu'on introduit la 1-naphtylalanine (ω), la 2-naphtylalanine (κ) ou la 3-benzothiénylalanine (χ) en position P⁻⁵ (tryptophane → $\omega/\kappa/\chi$), une hausse simultanée de l'affinité pour les trois protéines d'intérêt semble être observée.

Tableau 7.4. Rationalisation du caractère des résidus augmentant l'affinité pour les protéines CALP, N2P2 ou TIP-1 dans le cas de mono-substitutions de la séquence ANSRWPTSII (iCAL36).

	P ⁻⁶ -P ⁻⁹	P ⁻⁵	P ⁻⁴	P ⁻³	P ⁻²	P ⁻¹	P ⁰
CALP	Mult	Bi	Ali/ ϵ	α	η	Ali/ Ψ	ρ /E
N2P2	/	Ali/ Ψ /Bi	δ / Ψ	/	/	/	Ψ /E
TIP-1	Mult	Bi	Mult	/	/	Mult	ρ /Bi

Ali : résidus aliphatiques (γ , ν , ρ , τ) ; Bi : résidus bicycliques conjugués (ω , χ , κ) ; Mult : multiples remplacements tolérés.

En parallèle, d'autres remplacements semblent avoir peu d'effet sur l'interaction avec la protéine CALP, mais sont caractérisés par une réduction du signal pour les protéines N2P2 ou TIP-1. En particulier, l'introduction de la norvaline (ρ) ou de la (triméthylsilyl)alanine (E) en position P⁰ (isoleucine → ρ /E) mènent respectivement à une diminution de l'interaction avec la protéine N2P2 ou celle de TIP-1, tandis que le remplacement de la position P⁻¹ par la cyclohexylglycine (ν) (isoleucine → ν) semble mener à un signal affaibli pour ces deux protéines.

Ces résultats ont mis en évidence la possibilité d'inclure des AANN dans la séquence du peptide iCAL36 pour moduler son affinité et sa sélectivité, même si à l'exception du résidu *tert*-leucine (α) en position P⁻³ aucun résidu n'a semblé permettre d'augmenter simultanément ces deux paramètres. Dans le cadre des travaux de Vouillème *et al* avec des acides aminés naturels¹⁶⁵, l'introduction de la thréonine en position P⁻³ avait résulté en une hausse d'affinité pour la protéine CALP non-corrélée avec une perte d'affinité pour les domaines PDZ des protéines NHERF. L'introduction de la proline en position P⁻⁴ n'avait quant à elle pas mené à une augmentation significative d'affinité pour la protéine CALP, mais avait aboli l'interaction avec les domaines PDZ des protéines NHERF. Nous avons donc décidé de réaliser de multiples mutations de la séquence, chaque position pouvant être un interrupteur affectant spécifiquement l'interaction avec l'une des protéines d'intérêt, et chaque mutation pouvant potentiellement avoir un effet additif. Nous avons également envisagé que l'introduction de plusieurs mutations puisse affecter globalement le mode de liaison du peptide iCAL36 à ses partenaires et mener à des effets synergiques non-linéaires, ce qui pourrait par exemple être un moyen de créer des différences sensibles entre les modes de liaison du peptide iCAL36 avec les protéines CALP et TIP-1.

7.3.4. Développement des premiers peptides iCAL-2G

Une étude combinatoire a été réalisée sur la séquence du peptide iCAL36 (ANSRWPTSII) pour étudier l'influence d'une mutation conjointe de ses positions P⁰ et P⁻¹ (**Figure 6.3**). En particulier, les résidus norvaline (ρ) et acide 2-aminobutyrique (τ) en position P⁰ (isoleucine → ρ / τ), associés aux résidus cyclohexylglycine (ν)

ou norleucine (γ) en position P^{-1} (isoleucine $\rightarrow$ v/ γ) ont permis de maintenir une interaction conséquente pour la protéine CALP tout en ne créant pas d'interaction avec la protéine N2P2. La (triméthylsilyl)alanine (E) en position P^0 (isoleucine $\rightarrow$ E) montre une forte affinité pour la protéine CALP tolérant une multitude de remplacements en P^{-1} , mais à l'exception de H tous ces remplacements ont été associés à l'apparition d'une interaction sensible pour la protéine N2P2. Nous avons identifié à ce stade deux séquences optimales sans interaction avec la protéine N2P2 : ANSRWPTSvp (**iCAL-Q2**) et ANSRWPTSyt (**iCAL-Q3**).

L'optimisation de ces séquences a été poursuivie par des études combinatoires des positions P^{-4} et P^{-5} (**Figure 6.4**), dans l'idée d'identifier des séquences incluant les résidus bicycliques conjugués 1-naphtylalanine (ω), 2-naphtylalanine (κ) et 3-benzothiénylalanine (χ) en position P^{-5} présentant une absence de signal pour la protéine N2P2 au cours de l'analyse de substitution (**Figure 6.2**).

Pour la séquence ANSRWPTSvp (**iCAL-Q2**), l'association des résidus 1-naphtylalanine et 3-benzothiénylalanine en position P^{-5} (tryptophane $\rightarrow$ ω/χ) avec la 3-hydroxyproline (ϵ) ou la proline native en position P^{-4} a effectivement mené à une forte hausse de l'affinité pour la protéine CALP qui ne crée pas de signal pour la protéine N2P2 : parmi ces quatre possibilités, nous avons choisi la séquence ANSR $\omega\epsilon$ TSvp (**iCAL-Q6**). Nous avons considéré cette séquence comme un analogue direct du peptide iCAL36, car tout comme iCAL36 ses résidus P^0 et P^{-1} sont des chaînes aliphatiques, sa position P^{-4} présente un analogue hydroxylé de la proline et sa position P^{-5} comporte un motif aromatique bicyclique conjugué proche du motif indole du tryptophane.

Pour la séquence ANSRWPTSyt (**iCAL-Q3**), les mêmes remplacements ont été identifiés, cependant une interaction supplémentaire a été visible pour la norleucine (γ) en position P^{-5} (tryptophane $\rightarrow$ γ) associée à la proline native en position P^{-4} . Nous avons donc choisi d'exploiter la séquence résultante, ANSR γ PTSyt (**iCAL-Q13**) : en effet, de par le caractère aliphatique de ses positions P^0 , P^{-1} et P^{-5} cette séquence semble plutôt être un analogue direct du peptide iCAL42 (ANSRLPTSII), qui présente une absence d'affinité pour TIP-1^{166,287}. Ce résidu étant crucial pour l'interaction TIP-1/iCAL36 (données non-publiées), il nous est apparu envisageable que comme iCAL42, un peptide iCAL présentant un résidu non-apparenté au tryptophane en position P^{-5} ne présente pas d'interaction avec TIP-1.

L'analyse du profil d'interaction de ces deux séquences par polarisation de fluorescence a confirmé ces hypothèses. Tout comme iCAL36, le peptide iCAL-Q6 est affin pour les deux protéines CALP et TIP-1 : les interactions CALP/iCAL-Q6 et TIP-1/iCAL-Q6 sont environ 10 fois plus fortes que les interactions CALP/iCAL36 et TIP-1/iCAL36. Ce résultat est prévisible au vu du mode de liaison extrêmement similaire des protéines CALP et TIP-1 avec le peptide iCAL36 et, dans le cas de la protéine TIP-1, de l'effet stabilisateur d'un résidu aromatique capable de π -stacking tel le tryptophane en position P^{-5} ¹⁷³. Les interactions CALP/iCAL-Q13 et TIP-1/iCAL-Q13 sont quant à elles respectivement 10 fois et 150 fois plus faibles que les interactions CALP/iCAL36 et TIP1/iCAL36, ce qui est cohérent avec le fait que l'interaction CALP/iCAL42 est 3 fois plus faible que l'interaction CALP/iCAL36^{166,287}. Lorsqu'on compare les interactions TIP-1/iCAL-Q6 et TIP-1/iCAL-Q13, on observe une différence d'affinité d'un facteur supérieur à 1 000, montrant l'importance de la présence d'un large résidu aromatique en position P^{-5} d'un peptide pour l'interaction avec la protéine TIP-1, comme montré pour l'interaction TIP-1/iCAL36¹⁷³.

Enfin, les peptides iCAL-Q6 et iCAL-Q13 n'ont pas d'interaction mesurable avec la protéine N2P2, confirmant les résultats de synthèse SPOT indiquant que les remplacements introduits n'induisent pas d'affinité pour cette protéine. En dépit de son interaction pour la protéine TIP-1, le peptide iCAL-Q6 peut donc être décrit comme un analogue du peptide iCAL36 présentant une affinité accrue pour la protéine

CALP. Cette affinité est de l'ordre du submicromolaire, ce qui représente une très bonne interaction peptide/PDZ comparée aux autres interactions connues dans la littérature³⁶¹.

7.3.5. Rationalisation de l'affinité pour la protéine TIP-1

Les résultats obtenus pour les séquences iCAL-Q6 et iCAL-Q13, associés à l'analogie des peptides iCAL36 et iCAL-Q6 d'une part, et iCAL42 et iCAL-Q13 d'autre part nous laissent penser que le résidu P⁻⁵ est l'acteur principal de la convolution de l'affinité des peptides iCAL pour les protéines CALP et TIP-1. Le remplacement de cette position par un résidu non-analogue au tryptophane pourrait donc résulter en une diminution de l'affinité pour les deux protéines. Toutefois, il est envisageable que des effets synergiques de la position P⁻⁵ avec les positions P⁰, P⁻¹ et P⁻⁴ soient également à l'œuvre.

Une analyse combinatoire des positions P⁻¹ et P⁻⁴ sur un ensemble réduit de séquences n'a démontré aucun rôle significatif de la position P⁻⁴ (**Figure 6.9**). En revanche, une analyse conjointe des positions P⁻¹ et P⁻⁵ de la séquence ANSRWPTSIt a démontré que la position P⁻¹ module l'interaction avec la protéine TIP-1, et rend possible l'identification de séquences contenant un résidu analogue du tryptophane en position P⁻⁵ et présentant une faible interaction avec la protéine TIP-1 (**Figure 6.8**). En particulier, la cyclohexylglycine (v) a été à nouveau identifiée comme prometteuse en position P⁻¹. Une séquence hybride entre iCAL-Q6 et iCAL-Q13 a donc pu être identifiée : ANSRwETSvt. Afin de confirmer l'effet prometteur de l'introduction d'un résidu *tert*-leucine (α) en position P⁻³ (thréonine $\rightarrow$ α) issue de l'analyse de substitution (**Figure 6.2**), nous avons finalement défini deux séquences nous permettant, en comparaison avec iCAL-Q6, d'étudier l'influence des positions P⁰ et P⁻³ : ANSRw ϵ α Svp (**iCAL-Q27**) et ANSRw ϵ α Svt (**iCAL-Q28**) (**Tableau 7.5**).

Conformément aux résultats de synthèse SPOT, l'insertion de la *tert*-leucine en position P⁻³ a mené à une hausse significative d'affinité des peptides pour la protéine CALP. Les constantes d'affinité des interactions CALP/iCAL-Q27 et CALP/iCAL-Q28 ont été estimées de l'ordre de 100-300 nM (**Tableau 6.4**), ce qui en fait les plus puissants inhibiteurs de la protéine CALP identifiés à ce jour. Aucune interaction des peptides avec la protéine N2P2 n'a également été constatée, conformément au criblage par synthèse SPOT. En revanche, et de façon étonnante au vu des résultats de synthèse SPOT, ces deux peptides ont également démontré une très forte interaction pour TIP-1. En particulier, le peptide iCAL-Q27 a démontré une affinité d'environ 10 nM pour cette protéine, ce qui en fait une interaction extrêmement forte comparée aux interactions peptide/PDZ précédemment identifiées³⁶¹. La position P⁰ joue également un rôle, modulant d'un facteur 3 à 5 l'affinité du peptide pour les protéines CALP et TIP-1. Toutefois, aucune de ces deux positions n'a semblé permettre de rompre le parallélisme de l'interaction entre ces deux protéines.

Malgré sa forte interaction avec la protéine TIP-1, le peptide iCAL-Q27 présente une affinité pour la protéine CALP environ 70 fois plus élevée que le peptide iCAL36, ce qui en fait un excellent candidat pour des tests d'activité biologiques. De plus, les caractéristiques exceptionnelles de ce peptide lui permettront de servir de base pour le développement de nouveaux peptides iCAL. Une possibilité serait par exemple de développer un analogue du peptide iCAL-Q27 présentant un résidu aliphatique en position P⁻⁵, ce qui permettrait de développer un analogue d'iCAL42 renforcé par la contribution favorable des positions P⁰, P⁻¹ et P⁻³ (exemple de séquence : ANSRy ϵ α Svp).

Tableau 7.5. Séquences des peptides iCAL-2G identifiées au cours de ces travaux.

Nom	Séquence	Nom	Séquence
Position P ⁰ = I		iCAL-Q14	ANSR ω PTS γ τ
iCAL-Q1	ANSR ω ϵ η ν I	iCAL-Q15	ANSR χ PTS γ τ
Position P ⁰ = p		iCAL-Q16	ANSR ω τ TS γ τ
iCAL-Q2	ANSRWPTS ν p	iCAL-Q17	ANSR χ τ TS γ τ
iCAL-Q6	ANSR ω ϵ TS ν p	iCAL-Q18	ANSR χ ϵ TS γ τ
iCAL-Q7	ANSR χ ϵ TS ν p	iCAL-Q19	ANSR κ ϵ TS γ τ
iCAL-Q8	ANSR κ ϵ TS ν p	iCAL-Q20	ANSR χ PTS γ τ
iCAL-Q9	ANSR ω τ TS ν p	iCAL-Q26	ANSR ω PTS γ τ
iCAL-Q10	ANSR χ τ TS ν p	iCAL-Q4	ANSRWPTSH τ
iCAL-Q11	ANSR ω PTS ν p	iCAL-Q23	ANSR ω PTSH τ
iCAL-Q12	ANSR χ PTS ν p	iCAL-Q22	ANSR χ PTS ρ τ
iCAL-Q27	ANSR ω ϵ α S ν p	iCAL-Q24	ANSR χ PTS α τ
iCAL-Q29	ANS γ ω ϵ α S ν p	iCAL-Q21	ANSR ω PTS ν τ
iCAL-Q30	σ S γ ω ϵ α S ν p	iCAL-Q25	ANSR χ PTS ν τ
Position P ⁰ = τ		iCAL-Q28	ANSR ω ϵ α S ν τ
iCAL-Q3	ANSRWPTS γ τ	Position P ⁰ = E	
iCAL-Q13	ANSR γ PTS γ τ	iCAL-Q5	ANSRWPTSV ϵ

Les AANN sont représentés en bleu. Les séquences surlignées en jaune ont été synthétisées et leur affinité pour les protéines CALP, N2P2 et TIP-1 a été mesurée.

7.3.6. Conclusion

A l'issue des travaux développés dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons été en mesure d'identifier de nouvelles séquences analogues du peptide iCAL36 (**Tableau 7.5 et 7.6**). Quatre d'entre elles ont été synthétisées et leurs interactions avec les protéines CALP, N2P2 et TIP-1 ont été quantifiées (**Figures 7.3 et 7.4**). En particulier, le peptide iCAL-Q27 (ANSR ω ϵ α S ν p) présente une affinité pour la protéine CALP 70 fois supérieure à celle observée pour le peptide iCAL36 tout en n'ayant pas d'interaction mesurable avec la protéine N2P2, ce qui en fait un inhibiteur extrêmement puissant du domaine PDZ de la protéine CALP ($K_i \approx 100$ nM). Il est donc probable qu'il permette d'observer un effet biologique accru en comparaison avec iCAL36, ou tout du moins un effet biologique atteignable avec de plus faibles concentrations de peptide.

Nous avons également identifié quelques-uns des déterminants de l'interaction TIP-1/iCAL. Conformément à des études non-publiées précédemment réalisées par notre groupe, la présence d'un tryptophane ou d'un analogue proche de ce résidu en position P⁻⁵ du peptide iCAL36 mène à une forte interaction avec la protéine TIP-1. Le remplacement de ce résidu par un acide aminé aliphatique diminue fortement l'interaction pour la protéine TIP-1, mais réduit également l'affinité du peptide pour la protéine CALP. Deux stratégies semblent donc envisageables à l'avenir : l'introduction d'un résidu aliphatique en position P⁻⁵ menant à l'abolition de l'interaction TIP-1/iCAL et de résidus divers aux positions P⁰, P⁻¹ et P⁻³ pouvant renforcer l'interaction CALP/iCAL ; ou la poursuite de l'identification de résidus permettant l'abolition de l'interaction TIP-1/iCAL sur d'autres positions.

Tableau 7.6. Affinité des peptides iCAL pour les protéines CALP, TIP-1 et N2P2.

Affinité	CALP	TIP-1	N2P2
iCAL36	o	+	--
iCAL-Q6	+	++	--
iCAL-Q13	-	-	--
iCAL-Q27	++	+++	--
iCAL-Q28	++	++	--

+++ : < 50 nM ; ++ : 50-300 nM ; + : 0,3-2 μ M ; o : 2-20 μ M ; - : 20-100 μ M ; -- : > 100 μ M.

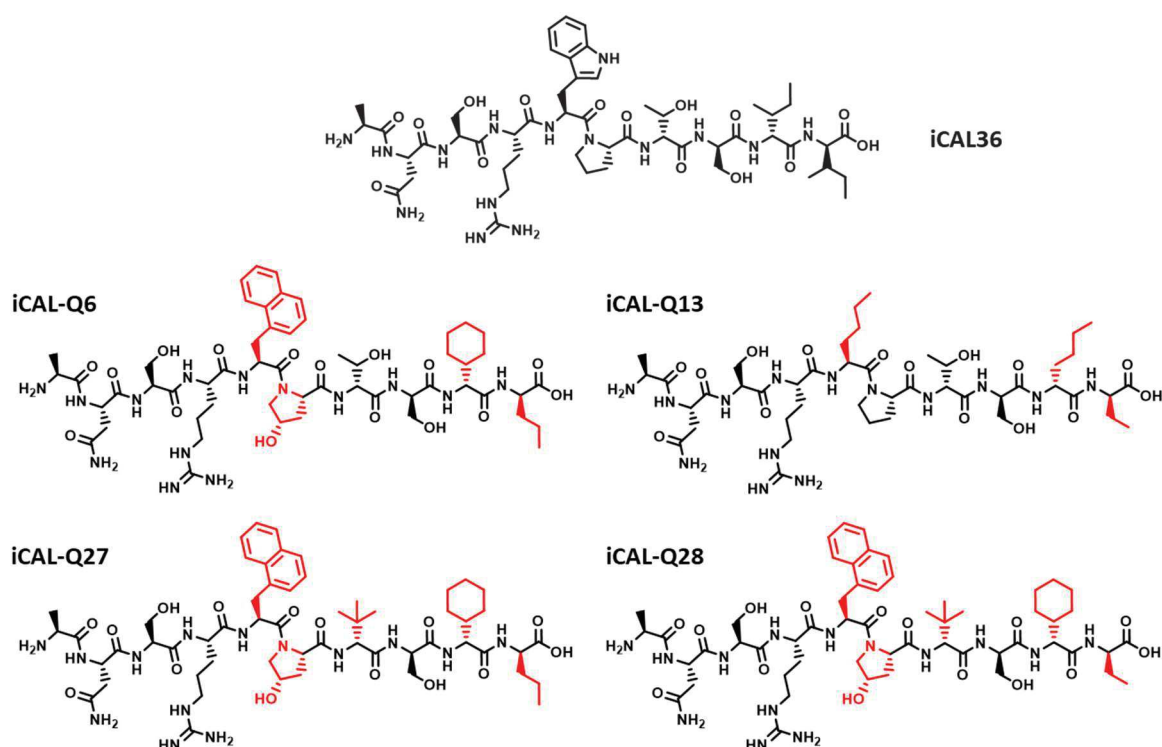


Figure 7.3. Structure chimique des peptides iCAL36, iCAL-Q6, iCAL-Q13, iCAL-Q27 et iCAL-Q28.

Les acides aminés mutés par rapport à la séquence du peptide iCAL36 sont indiqués en rouge.

Enfin, les travaux réalisés ont également permis d'identifier des remplacements intrinsèquement intéressants pour le développement de nouveaux peptides iCAL : en particulier, la présence d'un résidu *tert*-leucine (α) en position P-3 semble apporter une forte hausse d'affinité pour la protéine CALP, qui au vu des résultats d'analyse de substitution semble indépendante des autres résidus de la séquence.

Ces résultats ne sont toutefois que le début d'un criblage de peptides iCAL-2G incluant des AANN : pour des raisons de temps, seule une fraction des séquences identifiées a été testée au-delà du criblage SPOT. Dans un futur proche, d'autres de ces séquences seront synthétisées et analysées en polarisation de fluorescence de façon à comprendre de façon plus détaillée le rôle de chaque substitution ponctuelle. En parallèle, la stabilité métabolique de tous les peptides iCAL-2G en présence de protéases sera étudiée par HPLC-MS : un protocole a d'ores et déjà été développé et permet l'incubation des peptides avec 20% de sérum humain, la précipitation des protéines sériques par l'acétonitrile et l'analyse du surnageant contenant le peptide et ses métabolites par HPLC, en présence d'un étalon interne permettant de quantifier chaque composé identifié. Ce protocole sera prochainement appliqué aux peptides iCAL36, T36, TRI36 et aux peptides iCAL incluant des AANN, et permettra d'étudier l'influence des remplacements sur la stabilité métabolique globale du peptide.

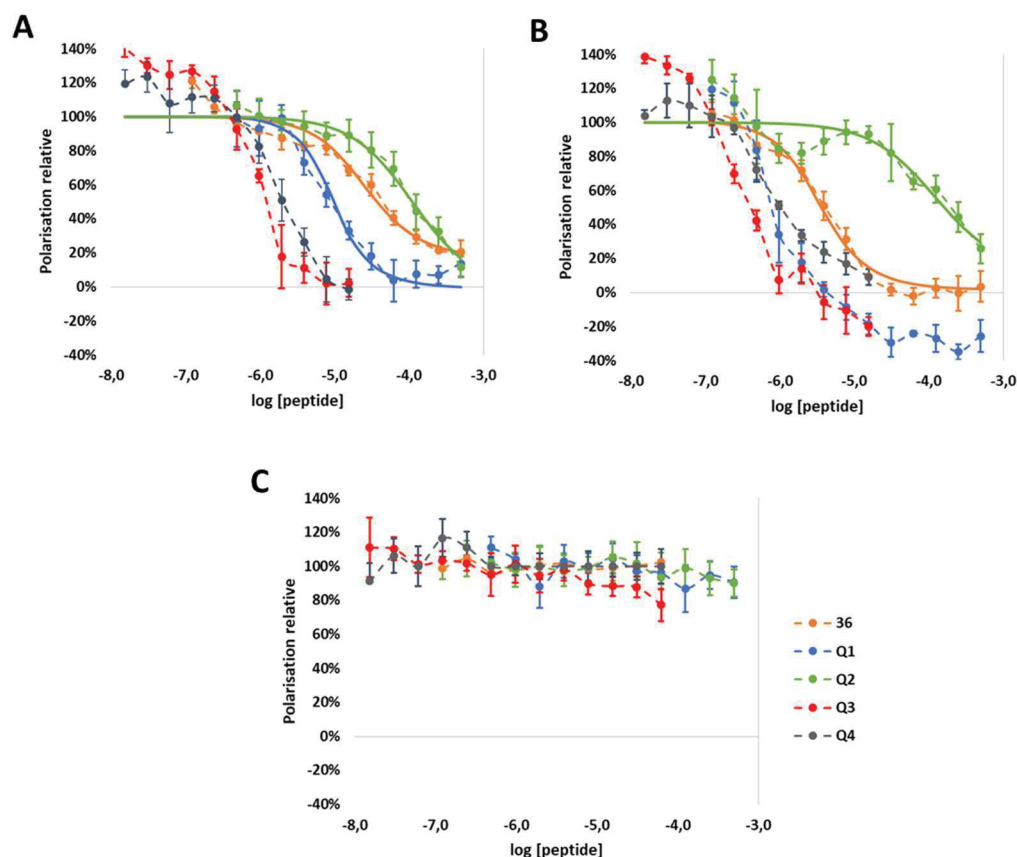


Figure 7.4. Comparaison de l'affinité des peptides iCAL36, iCAL-Q6, iCAL-Q13, iCAL-Q27 et iCAL-Q28 pour CALP, N2P2 et TIP-1 par FP.

Les courbes expérimentales (en pointillé) sont fittées, lorsque possible, par une courbe de valeurs calculées (en trait plein) qui est exploitée pour le calcul de la valeur de K_i . (A) Interaction des peptides avec la protéine CALP. (B) Interaction des peptides avec la protéine TIP-1. (C) Interaction des peptides avec la protéine N2P2. Les courbes sont représentatives d'un des réplicas techniques réalisés.

7.4. Perspectives générales du projet

7.4.1. Confirmer le mécanisme d'internalisation de TRI36 et P36

Nos résultats ont montré que les conjugués peptidiques TRI36 et P36 internalisent principalement les cellules Caco-2 en employant les voies d'endocytose. Toutefois, il s'est jusqu'à présent révélé complexe de déterminer la(les) voie(s) d'endocytose spécifiquement impliquée(s). Nous envisageons d'employer des inhibiteurs et marqueurs d'endocytose plus sélectifs qui nous permettront d'élucider de façon plus claire l'implication de l'endocytose cavéoline-dépendante et de la macropinocytose. En parallèle, afin de comprendre l'influence du ratio peptide/cellule sur le mécanisme d'internalisation des conjugués peptidiques, nous réaliserons des essais *in vitro* (*leakage assay*) permettant l'étude de leur potentiel de déstabilisation des membranes endosomales. Nous comparerons également le signal intracellulaire

quantifié en présence et en absence de chloroquine pour différentes concentrations. Ces expériences supplémentaires permettraient de conclure sur une éventuelle relation entre le ratio peptide/cellule et la capacité des conjugués peptidiques à s'échapper des endosomes.

7.4.2. Poursuivre la vectorisation d'iCAL36 : vers un modèle ex vivo

Par association avec les CPP Pen et TRI, le peptide iCAL36 a pu être vectorisé avec succès dans des cellules épithéliales Caco-2, Calu-3 et CFBE41o-, trois modèles pertinents dans le contexte de la mucoviscidose. Notre objectif est maintenant d'utiliser les conjugués peptidiques P36 et TRI36 pour transfecter des épithéliums (cellules cultivées en interface air-liquide, ALI). Dans ce type de culture, les cellules s'arrangent pour former un épithélium ayant tous les paramètres physiologiques (jonctions serrées, présence de mucus, etc.) représentatifs de l'intestin ou des poumons. Il serait possible de d'abord vérifier l'efficacité des conjugués peptidiques sur des cellules Caco-2 cultivées en épithélium, puis de passer sur des cellules CFBE41o- qui sont déficientes en CFTR. L'efficacité d'internalisation des peptides *TRI36 et *P36 par les épithéliums sera quantifiée par spectroscopie de fluorescence sur lysats cellulaires, en utilisant les facteurs de correction instaurés dans le chapitre 3 : en effet, de par l'impossibilité de dissocier les épithéliums avec de la trypsine, une analyse en cytométrie de flux ne serait pas possible.

Afin d'avoir un modèle encore plus proche des conditions physiologiques chez les patients CF, nous envisageons de prélever des cellules nasales de patients CF afin de les cultiver en épithélium reconstitué (prolifération en monocouche puis culture ALI)¹¹². Ces cellules primaires constituent le modèle cellulaire le plus représentatif atteignable, vu que les cellules sont directement prélevées de patients et n'ont pu subir aucune mutation supplémentaire comme parfois le cas pour les cellules CFBE ou HBE. Elles sont également plus pratiques à prélever que des cellules pulmonaires ou intestinales. Nous souhaiterions donc, à terme, vérifier l'efficacité de transfection des conjugués peptidiques sur des épithéliums nasaux reconstitués.

7.4.3. Poursuivre le développement de peptides iCAL

Les peptides iCAL développés au cours de cette thèse, en particulier le peptide iCAL-Q27 (ANSRwεαSvp) semblent présenter une affinité pour la protéine CALP de l'ordre de 100 nM, ce qui en fait à ce jour le peptide le plus affin existant pour la protéine CALP. De par l'intensité de cette interaction ainsi que d'autres (TIP-1/iCAL-Q6, TIP-1/iCAL-Q27, etc.), il n'a pas été possible de modéliser la courbe expérimentale et donc de déterminer une valeur de K_i précise pour l'interaction : une explication à ce problème est que l'interaction protéine/ligand fluorescent est beaucoup plus faible que l'interaction protéine/compétiteur, et que le K_i de cette interaction (ex : CALP/iCAL-Q27) apparaît négligeable dans l'équation employée. Un moyen de résoudre ce problème serait d'utiliser les peptides *iCAL-Q27 ou *iCAL-Q28 comme ligands fluorescents pour toutes les interactions identifiées comme étant sub-micromolaires. En parallèle, ces affinités peptide/protéine pourront être confirmées par d'autres méthodes traditionnelles telles que la résonance des plasmons de surface (SPR), le titrage calorimétrique isotherme (ITC), ou par des méthodes telles que la

thermophorèse micro-échelle³⁶² ou la technologie immuno-enzymatique AlphaScreen^{®363} qui ont été développées ces dernières années.

Une fois ces valeurs d'affinité confirmées, il serait intéressant de synthétiser de nouveaux peptides iCAL supposés présenter une stabilité métabolique accrue (iCAL-Q29, ANS**Y**W**E**A**Svp** ; iCAL-Q30, **σ**S**Y**W**E**A**Svp**) et confirmer ces résultats en étudiant leur dégradation au contact de sérum humain. Il serait également très intéressant de tester la stabilité de tous les peptides iCAL-2G synthétisés dans le sérum humain avec le protocole établi lors de cette thèse, puis dans le milieu *Artificial Sputum Medium* qui reproduit la composition des glaires de patients.

Enfin, dans le but d'abolir l'interaction TIP-1/iCAL, diverses mutations seront réalisées sur la séquence du peptide iCAL-Q27 portant un résidu aliphatique en P⁻⁵ afin d'identifier une séquence présentant une faible affinité pour la protéine TIP-1.

7.4.4. *Evaluer l'activité des conjugués peptidiques CPP-iCAL*

Dans un premier temps, nous souhaitons pouvoir cribler l'activité biologique des conjugués CPP-iCAL36 ou des peptides iCAL-2G (couplés à Pen ou TRI) sur des cellules en monocouche, un système moins contraignant que la culture en épithélium. Pour cela nous nous sommes intéressés aux méthodologies basées sur la propriété du canal CFTR à réguler l'influx d'ions iodure par un gradient de concentration : la quantification de l'influx ou de l'efflux d'ions iodure peut donc donner une indication directe de la fonctionnalité du canal CFTR. Une première méthode colorimétrique basée sur les travaux de Tang et Wildey³⁶⁴ permettant la quantification des ions iodure dans un échantillon cellulaire n'a pas donné de résultats concluants entre nos mains. Nous nous intéressons donc à une autre méthode qui repose sur la propriété des ions iodure de quencher la fluorescence de la protéine YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) surexprimée dans les cellules de choix³⁶⁵. Un autre fluorophore sujet à ce quenching iodure-dépendant est le (6-méthoxy-*N*-(3-sulfopropyl))quinolinium, récemment utilisé pour cribler l'activité biologique de « stabilisateurs » de CFTR par Qian *et al*²³⁰.

A terme, l'activité biologique des conjugués peptidiques les plus performants (TRI36, P36, mais aussi TRI-iCAL-Q27 par exemple) sur l'efflux de chlorure du canal CFTR sera mesurée par électrophysiologie (chambre d'Ussing) sur des CFBE41o- en épithélium, puis sur des épithéliums nasaux reconstitués à partir de cellules de patients CF. Les conjugués peptidiques seront testés seuls, puis en association avec Tezacaftor[®] ou avec des oligonucléotides bloqueurs permettant la stabilisation du transcrit CFTR. Ces expériences seront réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Magali Taulan-Cadars (Montpellier). De ces résultats découleront peut-être, un jour, un traitement efficace de la mucoviscidose.

Bibliographie

1. Scotet, V. *et al.* Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France. *Orphanet J. Rare Dis.* **7**, 14 (2012).
2. Poolman, E. M. & Galvani, A. P. Evaluating candidate agents of selective pressure for cystic fibrosis. *J. R. Soc. Interface* **4**, 91–98 (2007).
3. Kerem, B. *et al.* Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science* **245**, 1073–1080 (1989).
4. Saint-Criq, V. & Gray, M. A. Role of CFTR in epithelial physiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 93–115 (2017).
5. Banjar, H. & Angyalosi, G. The road for survival improvement of cystic fibrosis patients in Arab countries. *Int. J. Pediatr. Adolesc. Med.* **2**, 47–58 (2015).
6. Elborn, J. S. Cystic fibrosis. *The Lancet* **388**, 2519–2531 (2016).
7. Dean, M., Rzhetsky, A. & Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156–1166 (2001).
8. Stutts, M. J. *et al.* CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* **269**, 847–850 (1995).
9. Althaus, M. ENaC inhibitors and airway re-hydration in cystic fibrosis: state of the art. *Curr. Mol. Pharmacol.* **6**, 3–12 (2013).
10. Linsdell, P. Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp. Physiol.* **91**, 123–129 (2006).
11. Sheppard, D. N. & Welsh, M. J. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiol. Rev.* **79**, S23–S45 (1999).
12. Rowntree, R. K. & Harris, A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann. Hum. Genet.* **67**, 471–485 (2003).
13. Lopes-Pacheco, M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **7**, 275 (2016).
14. Das, J. *et al.* Transmembrane helical interactions in the CFTR channel pore. *PLoS Comput. Biol.* **13**, (2017).
15. De Boeck, K., Zolin, A., Cuppens, H., Olesen, H. V. & Viviani, L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **13**, 403–409 (2014).
16. Serohijos, A. W. R. *et al.* Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3256–3261 (2008).
17. Bobadilla, J. L., Macek, M., Fine, J. P. & Farrell, P. M. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat.* **19**, 575–606 (2002).
18. Meacham, G. C. *et al.* The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* **18**, 1492–1505 (1999).
19. Rosser, M. F. N., Grove, D. E., Chen, L. & Cyr, D. M. Assembly and Misassembly of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: Folding Defects Caused by Deletion of F508 Occur Before and After the Calnexin-dependent Association of Membrane Spanning Domain (MSD) 1 and MSD2. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4570–4579 (2008).
20. Molinski, S. *et al.* Functional Rescue of F508del-CFTR Using Small Molecule Correctors. *Front. Pharmacol.* **3**, (2012).
21. Younger, J. M. *et al.* Sequential quality-control checkpoints triage misfolded cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Cell* **126**, 571–582 (2006).

- 22.Sharma, M. *et al.* Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation. *J. Cell Biol.* **164**, 923–933 (2004).
- 23.Okiyoneda, T. *et al.* Mechanism-based corrector combination restores Δ F508-CFTR folding and function. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 444–454 (2013).
- 24.Cheng, S. H. *et al.* Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* **63**, 827–834 (1990).
- 25.Guggino, W. B. The Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Forms Macromolecular Complexes with PDZ Domain Scaffold Proteins. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **1**, 28–32 (2004).
- 26.Dalemans, W. *et al.* Altered chloride ion channel kinetics associated with the Δ F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**, 526–528 (1991).
- 27.Lukacs, G. L. *et al.* The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 21592–21598 (1993).
- 28.Cheng, J. *et al.* A Golgi-associated PDZ Domain Protein Modulates Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Plasma Membrane Expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 3520–3529 (2002).
- 29.Guggino, W. B. & Stanton, B. A. Mechanisms of disease: New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 426 (2006).
- 30.Proesmans, M., Vermeulen, F. & De Boeck, K. What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur. J. Pediatr.* **167**, 839–849 (2008).
- 31.Gibson, R. L., Burns, J. L. & Ramsey, B. W. Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 918–951 (2003).
- 32.Lands, L. C. & Dauletbaev, N. High-Dose Ibuprofen in Cystic Fibrosis. *Pharmaceuticals* **3**, 2213–2224 (2010).
- 33.Ermund, A. *et al.* OligoG CF-5/20 normalizes cystic fibrosis mucus by chelating calcium. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **44**, 639–647 (2017).
- 34.Trapnell, B. C. *et al.* Efficacy and safety of PANCREAZE® for treatment of exocrine pancreatic insufficiency due to cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **10**, 350–356 (2011).
- 35.Borowitz, D. *et al.* International phase III trial of liprotamase efficacy and safety in pancreatic-insufficient cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* **10**, 443–452 (2011).
- 36.Mascarenhas, M. R. Treatment of Gastrointestinal Problems in Cystic Fibrosis. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* **6**, 427–441 (2003).
- 37.Boyle, M. P. *et al.* A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **2**, 527–538 (2014).
- 38.Vázquez-Espinosa, E. *et al.* Long-term safety and efficacy of tobramycin in the management of cystic fibrosis. *Ther. Clin. Risk Manag.* **11**, 407–415 (2015).
- 39.Waters, V. & Smyth, A. Cystic fibrosis microbiology: Advances in antimicrobial therapy. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **14**, 551–560 (2015).
- 40.Torge, A. *et al.* Ciprofloxacin-loaded lipid-core nanocapsules as mucus penetrating drug delivery system intended for the treatment of bacterial infections in cystic fibrosis. *Int. J. Pharm.* **527**, 92–102 (2017).
- 41.Deppisch, C. *et al.* Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis: a phase I clinical study. *Infection* **44**, 513–520 (2016).
- 42.Garinis, A. C. *et al.* The cumulative effects of intravenous antibiotic treatments on hearing in patients with cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* (2016). doi:10.1016/j.jcf.2017.01.006
- 43.Bethesda, C. F. F. 6931 A. R. 2nd floor & Md 20814 301-951-4422 800-344-4823. Drug Development Pipeline. Available at: <https://www.cff.org/Trials/Pipeline>.

44. Ramalho, A. S. *et al.* Five Percent of Normal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator mRNA Ameliorates the Severity of Pulmonary Disease in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 619–627 (2002).
45. Harrison, P. T., Sanz, D. J. & Hollywood, J. A. Impact of gene editing on the study of cystic fibrosis. *Hum. Genet.* **135**, 983–992 (2016).
46. Van Goor, F. *et al.* Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 18843–18848 (2011).
47. Ramsey, B. W. *et al.* A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1663–1672 (2011).
48. Cushing, P. R., Vouilleme, L., Pellegrini, M., Boissguerin, P. & Madden, D. R. A stabilizing influence: CAL PDZ inhibition extends the half-life of Δ F508-CFTR. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **49**, 9907–9911 (2010).
49. Sheppard, D. N. Cystic Fibrosis: CFTR Correctors to the Rescue. *Chem. Biol.* **18**, 145–147 (2011).
50. Loo, T. W., Bartlett, M. C., Wang, Y. & Clarke, D. M. The chemical chaperone CFcor-325 repairs folding defects in the transmembrane domains of CFTR-processing mutants. *Biochem. J.* **395**, 537–542 (2006).
51. Pedemonte, N. *et al.* Small-molecule correctors of defective Δ F508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J. Clin. Invest.* **115**, 2564–2571 (2005).
52. Clancy, J. P. *et al.* Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* **67**, 12–18 (2012).
53. Wang, F., Zeltwanger, S., Yang, I. C., Nairn, A. C. & Hwang, T. C. Actions of genistein on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. Evidence for two binding sites with opposite effects. *J. Gen. Physiol.* **111**, 477–490 (1998).
54. Obayashi, K., Horie, M., Washizuka, T., Nishimoto, T. & Sasayama, S. On the mechanism of genistein-induced activation of protein kinase A-dependent Cl^- conductance in cardiac myocytes. *Pflug. Arch.* **438**, 269–277 (1999).
55. Pasyk, S., Li, C., Ramjeesingh, M. & Bear, C. E. Direct interaction of a small-molecule modulator with G551D-CFTR, a cystic fibrosis-causing mutation associated with severe disease. *Biochem. J.* **418**, 185–190 (2009).
56. Al-Nakkash, L. & Hwang, T. C. Activation of wild-type and deltaF508-CFTR by phosphodiesterase inhibitors through cAMP-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Arch.* **437**, 553–561 (1999).
57. Van Goor, F. *et al.* Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18825–18830 (2009).
58. Yu, H. *et al.* Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **11**, 237–245 (2012).
59. Matthes, E. *et al.* Low free drug concentration prevents inhibition of F508del CFTR functional expression by the potentiator VX-770 (ivacaftor). *Br. J. Pharmacol.* **173**, 459–470 (2016).
60. Rafeeq, M. M. & Murad, H. A. S. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J. Transl. Med.* **15**, 84 (2017).
61. Wainwright, C. E. *et al.* Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N. Engl. J. Med.* **373**, 220–231 (2015).
62. Cholon, D. M., Esther, C. R. & Gentzsch, M. Efficacy of lumacaftor-ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis patients homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Expert Rev. Precis. Med. Drug Dev.* **1**, 235–243 (2016).
63. Fajac, I. & Wainwright, C. E. New treatments targeting the basic defects in cystic fibrosis. *Presse Medicale Paris Fr.* **1983** **46**, e165–e175 (2017).
64. Cholon, D. M. *et al.* Potentiator Ivacaftor Abrogates Pharmacological Correction of Δ F508 CFTR in Cystic Fibrosis. *Sci. Transl. Med.* **6**, 246ra96 (2014).

- 65.Veit, G. *et al.* Some gating potentiators, including VX-770, diminish $\Delta F508$ -CFTR functional expression. *Sci. Transl. Med.* **6**, 246ra97 (2014).
- 66.Bali, V., Lazrak, A., Guroji, P., Matalon, S. & Bebok, Z. Mechanistic Approaches to Improve Correction of the Most Common Disease-Causing Mutation in Cystic Fibrosis. *PLOS ONE* **11**, e0155882 (2016).
- 67.Pilewski, J. M., Cooke, J., Lekstrom-Himes, J. & Donaldson, S. WS01.4 VX-661 in combination with ivacaftor in patients with cystic fibrosis and the F508del-CFTR mutation. *J. Cyst. Fibros.* **14**, S1 (2015).
- 68.Moniz, S. *et al.* HGF stimulation of Rac1 signaling enhances pharmacological correction of the most prevalent cystic fibrosis mutant F508del-CFTR. *ACS Chem. Biol.* **8**, 432–442 (2013).
- 69.Yang, W.-H. *et al.* RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration. *Nat. Cell Biol.* **14**, 366 (2012).
- 70.Scott, D. W. *et al.* SPX-101 is a Novel ENaC-targeted Therapeutic for Cystic Fibrosis that Restores Mucus Transport. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2017). doi:10.1164/rccm.201612-2445OC
- 71.Almaça, J. *et al.* High-Content siRNA Screen Reveals Global ENaC Regulators and Potential Cystic Fibrosis Therapy Targets. *Cell* **154**, 1390–1400 (2013).
- 72.Bell, S. C., De Boeck, K. & Amaral, M. D. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol. Ther.* **145**, 19–34 (2015).
- 73.Mall, M. A. & Galietta, L. J. V. Targeting ion channels in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* **14**, 561–570 (2015).
- 74.Noel, S. *et al.* Vardenafil reduces macrophage pro-inflammatory overresponses in cystic fibrosis through PDE5- and CFTR-dependent mechanisms. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **1979** **131**, 1107–1121 (2017).
- 75.Leier, G., Bangel-Ruland, N., Sobczak, K., Knieper, Y. & Weber, W.-M. Sildenafil acts as potentiator and corrector of CFTR but might be not suitable for the treatment of CF lung disease. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **29**, 775–790 (2012).
- 76.Zeitlin, P. L. Cystic fibrosis and estrogens: a perfect storm. *J. Clin. Invest.* **118**, 3841–3844 (2008).
- 77.Lavelle, G. M., White, M. M., Browne, N., McElvaney, N. G. & Reeves, E. P. Animal Models of Cystic Fibrosis Pathology: Phenotypic Parallels and Divergences. *BioMed Res. Int.* **2016**, (2016).
- 78.Lindberg, M. F. *et al.* The gene transfection properties of a lipophosphoramidate derivative with two phytanyl chains. *Biomaterials* **33**, 6240–6253 (2012).
- 79.Lindberg, M. F. *et al.* Efficient in vivo transfection and safety profile of a CpG-free and codon optimized luciferase plasmid using a cationic lipophosphoramidate in a multiple intravenous administration procedure. *Biomaterials* **59**, 1–11 (2015).
- 80.Alton, E. W. F. W. *et al.* Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet Respir. Med.* **3**, 684–691 (2015).
- 81.Alton, E. W. *et al.* A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of repeated nebulisation of non-viral cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene therapy in patients with cystic fibrosis. (NIHR Journals Library, 2016).
- 82.Drumm, M. L. *et al.* Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* **62**, 1227–1233 (1990).
- 83.Steines, B. *et al.* CFTR gene transfer with AAV improves early cystic fibrosis pig phenotypes. *JCI Insight* **1**, e88728 (2016).
- 84.Roy, I. & Vij, N. Nano-delivery in Airway Diseases: Challenges and Therapeutic Applications. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **6**, 237–244 (2010).
- 85.Boylan, N. J. *et al.* Highly compacted DNA nanoparticles with low MW PEG coatings: in vitro, ex vivo and in vivo evaluation. *J. Controlled Release* **157**, 72–79 (2012).

86. Zhang, L. *et al.* CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol.* **7**, e1000155 (2009).
87. Miller, J. C. *et al.* An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* **25**, 778–785 (2007).
88. Miller, J. C. *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.* **29**, nbt.1755 (2010).
89. Bedell, V. M. *et al.* *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* **491**, nature11537 (2012).
90. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
91. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).
92. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, nbt.2647 (2013).
93. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826 (2013).
94. Fujii, W., Kawasaki, K., Sugiura, K. & Naito, K. Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **41**, e187–e187 (2013).
95. Schwank, G. *et al.* Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* **13**, 653–658 (2013).
96. Firth, A. L. *et al.* Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep.* **12**, 1385–1390 (2015).
97. Sanz, D. J., Hollywood, J. A., Scallan, M. F. & Harrison, P. T. Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLOS ONE* **12**, e0184009 (2017).
98. Slaymaker, I. M. *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* **351**, 84–88 (2016).
99. Zamecnik, P. C., Raychowdhury, M. K., Tabatadze, D. R. & Cantiello, H. F. Reversal of cystic fibrosis phenotype in a cultured Delta508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator cell line by oligonucleotide insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8150–8155 (2004).
100. Bonini, J. *et al.* Small-scale high-throughput sequencing-based identification of new therapeutic tools in cystic fibrosis. *Genet. Med.* **17**, 796 (2015).
101. Miller, J. P. *et al.* CFTR Amplifiers: A New Class of CFTR Modulator that Complements the Substrate Limitations of Other CF Therapeutic Modalities. in *C60. All About Cystic Fibrosis* A5574–A5574 (American Thoracic Society, 2016). doi:10.1164/ajrccm-conference.2016.193.1_MeetingAbstracts.A5574
102. Keeling, K. M., Wang, D., Conard, S. E. & Bedwell, D. M. Suppression of Premature Termination Codons as a Therapeutic Approach. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 444–463 (2012).
103. Xue, X. *et al.* Identification of the amino acids inserted during suppression of CFTR nonsense mutations and determination of their functional consequences. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 3116–3129 (2017).
104. Clancy, J. P. *et al.* No Detectable Improvements in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator by Nasal Aminoglycosides in Patients with Cystic Fibrosis with Stop Mutations. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **37**, 57–66 (2007).
105. Prayle, A., Watson, A., Fortnum, H. & Smyth, A. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax* **65**, 654–658 (2010).
106. Du, M. *et al.* PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2064–2069 (2008).
107. Kerem, E. *et al.* Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet Lond. Engl.* **372**, 719–727 (2008).

108. Kerem, E. *et al.* Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir. Med.* **2**, 539–547 (2014).
109. Zomer-van Ommen, D. D. *et al.* Limited premature termination codon suppression by read-through agents in cystic fibrosis intestinal organoids. *J. Cyst. Fibros.* **15**, 158–162 (2016).
110. Varilh, J., Bonini, J. & Taulan-Cadars, M. Role of Non-coding RNAs in Cystic Fibrosis. (2015). doi:10.5772/60449
111. Viart, V. *Etude de la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle du gène CFTR : identification de facteurs de transcription et de microARNs.* (Montpellier 1, 2011).
112. Viart, V. *et al.* Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **45**, 116–128 (2015).
113. Cheng, J., Cebotaru, V., Cebotaru, L. & Guggino, W. B. Syntaxin 6 and CAL Mediate the Degradation of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Mol. Biol. Cell* **21**, 1178–1187 (2010).
114. Cheng, J. & Guggino, W. Ubiquitination and Degradation of CFTR by the E3 Ubiquitin Ligase MARCH2 through Its Association with Adaptor Proteins CAL and STX6. *PLOS ONE* **8**, e68001 (2013).
115. Cheng, J., Wang, H. & Guggino, W. B. Regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator trafficking and protein expression by a Rho family small GTPase TC10. *J. Biol. Chem.* **280**, 3731–3739 (2005).
116. Lee, H. W., Cheng, J., Kovbasnjuk, O., Donowitz, M. & Guggino, W. B. Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Enhances the Protein Expression of CFTR. *PLOS ONE* **8**, e59992 (2013).
117. Wang, B. *et al.* Ezrin-anchored protein kinase A coordinates phosphorylation-dependent disassembly of a NHERF1 ternary complex to regulate hormone-sensitive phosphate transport. *J. Biol. Chem.* **287**, 24148–24163 (2012).
118. Pawson, T. & Nash, P. Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science* **300**, 445–452 (2003).
119. Pawson, T., Raina, M. & Nash, P. Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Lett.* **513**, 2–10 (2002).
120. Kennedy, M. B. The postsynaptic density at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* **20**, 264–268 (1997).
121. Cabral, J. H. M. *et al.* Crystal structure of a PDZ domain. *Nature* **382**, 649 (1996).
122. Sheng, M. & Sala, C. Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24: 1-29. **24**, (2001).
123. Songyang, Z. *et al.* Recognition of Unique Carboxyl-Terminal Motifs by Distinct PDZ Domains. *Science* **275**, 73–77 (1997).
124. Luck, K., Charbonnier, S. & Travé, G. The emerging contribution of sequence context to the specificity of protein interactions mediated by PDZ domains. *FEBS Lett.* **586**, 2648–2661 (2012).
125. Nourry, C., Grant, S. G. N. & Borg, J.-P. PDZ Domain Proteins: Plug and Play! *Sci. Signal.* **2003**, re7-re7 (2003).
126. Ivarsson, Y. Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling. *FEBS Lett.* **586**, 2638–2647 (2012).
127. Cowburn, D. Peptide recognition by PTB and PDZ domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 835–838 (1997).
128. Vaccaro, P. & Dente, L. PDZ domains: troubles in classification. *FEBS Lett.* **512**, 345–346 (2002).
129. Gee, S. H., Quenneville, S., Lombardo, C. R. & Chabot, J. Single-Amino Acid Substitutions Alter the Specificity and Affinity of PDZ Domains for Their Ligands. *Biochemistry (Mosc.)* **39**, 14638–14646 (2000).
130. Bezprozvanny, I. & Maximov, A. Classification of PDZ domains. *FEBS Lett.* **509**, 457–462 (2001).

131. Lee, H.-J. & Zheng, J. J. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun. Signal. CCS* **8**, 8 (2010).
132. Vincentelli, R. *et al.* Quantifying domain-ligand affinities and specificities by high-throughput holdup assay. *Nat. Methods* **12**, 787–793 (2015).
133. Orgaz, J. L., Herraiz, C. & Sanz-Moreno, V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* **5**, (2014).
134. Nakamura, N., Fukuda, H., Kato, A. & Hirose, S. MARCH-II Is a Syntaxin-6-binding Protein Involved in Endosomal Trafficking. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1696–1710 (2005).
135. Yao, R. *et al.* Lack of acrosome formation in mice lacking a Golgi protein, GOPC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11211–11216 (2002).
136. Cushing, P. R., Fellows, A., Villone, D., Boisguérin, P. & Madden, D. R. The relative binding affinities of PDZ partners for CFTR: a biochemical basis for efficient endocytic recycling. *Biochemistry (Mosc.)* **47**, 10084–10098 (2008).
137. Singh, A. K. *et al.* Differential roles of NHERF1, NHERF2, and PDZK1 in regulating CFTR-mediated intestinal anion secretion in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 540–550 (2009).
138. Broadbent, D. *et al.* Roles of NHERF Family of PDZ-Binding Proteins in Regulating GPCR Functions. *Adv. Immunol.* **136**, 353–385 (2017).
139. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317 (1985).
140. Hamzeh-Mivehroud, M., Alizadeh, A. A., Morris, M. B., Bret Church, W. & Dastmalchi, S. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. *Drug Discov. Today* **18**, 1144–1157 (2013).
141. Pande, J., Szewczyk, M. M. & Grover, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnol. Adv.* **28**, 849–858 (2010).
142. Zhao, A., Tohidkia, M. R., Siegel, D. L., Coukos, G. & Omid, Y. Phage antibody display libraries: a powerful antibody discovery platform for immunotherapy. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 276–289 (2016).
143. Fuh, G. *et al.* Analysis of PDZ Domain-Ligand Interactions Using Carboxyl-terminal Phage Display. *J. Biol. Chem.* **275**, 21486–21491 (2000).
144. Ernst, A. *et al.* Coevolution of PDZ domain-ligand interactions analyzed by high-throughput phage display and deep sequencing. *Mol. Biosyst.* **6**, 1782–1790 (2010).
145. Luck, K. & Travé, G. Phage display can select over-hydrophobic sequences that may impair prediction of natural domain-peptide interactions. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **27**, 899–902 (2011).
146. Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* **340**, 245 (1989).
147. Yang, M., Wu, Z. & Fields, S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1152–1156 (1995).
148. Song, E. *et al.* A high efficiency strategy for binding property characterization of peptide-binding domains. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **5**, 1368–1381 (2006).
149. Lenfant, N. *et al.* A genome-wide study of PDZ-domain interactions in *C. elegans* reveals a high frequency of non-canonical binding. *BMC Genomics* **11**, 671 (2010).
150. Belotti, E. *et al.* The Human PDZome: A Gateway to PSD95-Disc Large-Zonula Occludens (PDZ)-mediated Functions. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **12**, 2587–2603 (2013).
151. Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. & Schlattner, U. Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 2763–2788 (2009).
152. Tonikian, R. *et al.* Bayesian Modeling of the Yeast SH3 Domain Interactome Predicts Spatiotemporal Dynamics of Endocytosis Proteins. *PLOS Biol.* **7**, e1000218 (2009).

153. Lam, K. S., Lebl, M. & Krchňák, V. The "One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method. *Chem. Rev.* **97**, 411–448 (1997).
154. Frank, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **48**, 9217–9232 (1992).
155. Kramer, A. *et al.* Spot synthesis: observations and optimizations. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* **54**, 319–327 (1999).
156. Frank, R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J. Immunol. Methods* **267**, 13–26 (2002).
157. Volkmer, R. Synthesis and Application of Peptide Arrays: Quo Vadis SPOT Technology. *ChemBioChem* **10**, 1431–1442 (2009).
158. Licha, K. *et al.* Highly parallel nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes. *Tetrahedron Lett.* **41**, 1711–1715 (2000).
159. Wenschuh, H. *et al.* Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* **55**, 188–206 (2000).
160. Fraczyk, J., Kolesinska, B., Relich, I. & Kaminski, Z. J. Cellulose Functionalised with Grafted Oligopeptides. (2013). doi:10.5772/52302
161. Hoffmüller, U. *et al.* Interaction of a PDZ Protein Domain with a Synthetic Library of All Human Protein C Termini. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 2000–2004 (1999).
162. Boisguerin, P. *et al.* Characterization of a Putative Phosphorylation Switch: Adaptation of SPOT Synthesis to Analyze PDZ Domain Regulation Mechanisms. *ChemBioChem* **8**, 2302–2307 (2007).
163. Lalle, M. *et al.* Involvement of 14-3-3 protein post-translational modifications in *Giardia duodenalis* encystation. *Int. J. Parasitol.* **40**, 201–213 (2010).
164. Wente, W., Stroh, T., Beaudet, A., Richter, D. & Kreienkamp, H.-J. Interactions with PDZ Domain Proteins PIST/GOPC and PDZK1 Regulate Intracellular Sorting of the Somatostatin Receptor Subtype 5. *J. Biol. Chem.* **280**, 32419–32425 (2005).
165. Vouilleme, L., Cushing, P. R., Volkmer, R., Madden, D. R. & Boisguerin, P. Engineering Peptide Inhibitors To Overcome PDZ Binding Promiscuity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 9912–9916 (2010).
166. Vouillème, L. Engineering high specificity peptide inhibitors of a promiscuous protein-protein interaction domain with implications in cystic fibrosis. (Freie Universität Berlin, Freie Universität Berlin, Germany, 2012).
167. Amacher, J. F., Cushing, P. R., Weiner, J. A. & Madden, D. R. Crystallization and preliminary diffraction analysis of the CAL PDZ domain in complex with a selective peptide inhibitor. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 600–603 (2011).
168. Amacher, J. F., Cushing, P. R., Brooks, L., Boisguerin, P. & Madden, D. R. Identifying Stereochemical Preferences that Modulate Affinity and Selectivity among Five PDZ Domains that Bind CFTR: Comparative Crystallographic and Sequence Analyses. *Struct. Lond. Engl.* **22**, 82–93 (2014).
169. Kanamori, M. *et al.* The PDZ protein tax-interacting protein-1 inhibits beta-catenin transcriptional activity and growth of colorectal cancer cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 38758–38764 (2003).
170. Han, M., Wang, H., Zhang, H.-T. & Han, Z. Expression of TIP-1 confers radioresistance of malignant glioma cells. *PLoS One* **7**, e45402 (2012).
171. Alewine, C., Olsen, O., Wade, J. B. & Welling, P. A. TIP-1 Has PDZ Scaffold Antagonist Activity. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4200 (2006).
172. Mohanty, S., Ovee, M. & Banerjee, M. PDZ Domain Recognition: Insight from Human Tax-Interacting Protein 1 (TIP-1) Interaction with Target Proteins. *Biology* **4**, 88–103 (2015).
173. Amacher, J. F., Cushing, P. R., Bahl, C. D., Beck, T. & Madden, D. R. Stereochemical Determinants of C-terminal Specificity in PDZ Peptide-binding Domains. *J. Biol. Chem.* **288**, 5114–5126 (2013).

174. Olsen, J. V., Ong, S.-E. & Mann, M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **3**, 608–614 (2004).
175. Amacher, J. F., Zhao, R., Spaller, M. R. & Madden, D. R. Chemically Modified Peptide Scaffolds Target the CFTR-Associated Ligand PDZ Domain. *PLOS ONE* **9**, e103650 (2014).
176. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–731 (1972).
177. Taniyama, Y. *et al.* Therapeutic option of plasmid-DNA based gene transfer. *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 1630–1637 (2012).
178. Schönenberger, C., Schütz, A., Franco-Obregón, A. & Zenobi-Wong, M. Efficient electroporation of peptides into adherent cells: investigation of the role of mechano-growth factor in chondrocyte culture. *Biotechnol. Lett.* **33**, 883–888 (2011).
179. Fan, Z., Kumon, R. E. & Deng, C. X. Mechanisms of microbubble-facilitated sonoporation for drug and gene delivery. *Ther. Deliv.* **5**, 467–486 (2014).
180. Kinoshita, M. & Hynynen, K. Intracellular delivery of Bak BH3 peptide by microbubble-enhanced ultrasound. *Pharm. Res.* **22**, 716–720 (2005).
181. Garner, A. L. *et al.* Plasma membrane temperature gradients and multiple cell permeabilization induced by low peak power density femtosecond lasers. *Biochem. Biophys. Rep.* **5**, 168–174 (2015).
182. Warnock, J. N., Daigre, C. & Al-Rubeai, M. Introduction to viral vectors. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **737**, 1–25 (2011).
183. Alton, E. W. F. W. *et al.* Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax* **72**, 137–147 (2017).
184. Tros de Ilarduya, C., Sun, Y. & Düzgüneş, N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**, 159–170 (2010).
185. Geisbert, T. W. *et al.* Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet Lond. Engl.* **375**, 1896–1905 (2010).
186. Muheem, A. *et al.* A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharm. J.* **24**, 413–428 (2016).
187. Pandey, A. P. & Sawant, K. K. Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **68**, 904–918 (2016).
188. Chen, W., Li, H., Liu, Z. & Yuan, W. Lipopolyplex for Therapeutic Gene Delivery and Its Application for the Treatment of Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* **8**, (2016).
189. Bernkop-Schnürch, A. & Dünnhaupt, S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **81**, 463–469 (2012).
190. Patel, A., Patel, M., Yang, X. & Mitra, A. K. Recent Advances in Protein and Peptide Drug Delivery: A Special Emphasis on Polymeric Nanoparticles. *Protein Pept. Lett.* **21**, 1102–1120 (2014).
191. Ritthidej, G. C. Chapter 3 - Nasal Delivery of Peptides and Proteins with Chitosan and Related Mucoadhesive Polymers. in *Peptide and Protein Delivery* (ed. Walle, C. V. D.) 47–68 (Academic Press, 2011). doi:10.1016/B978-0-12-384935-9.10003-3
192. Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1307–1315 (2008).
193. Gautier, J., Allard-Vannier, E., Hervé-Aubert, K., Soucé, M. & Chourpa, I. Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications. *Nanotechnology* **24**, 432002 (2013).
194. Gary-Bobo, M. *et al.* Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. *Int. J. Pharm.* **423**, 509–515 (2012).

195. Gary-Bobo, M. *et al.* Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma: Drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy. *Int. J. Pharm.* **432**, 99–104 (2012).
196. Frankel, A. D. & Pabo, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189–1193 (1988).
197. Green, M. & Loewenstein, P. M. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179–1188 (1988).
198. Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H. & Prochiantz, A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1864–1868 (1991).
199. Vivès, 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.* **272**, 16010–16017 (1997).
200. Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G. & Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10444–10450 (1994).
201. Heitz, F., Morris, M. C. & Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 195–206 (2009).
202. Fawell, S. *et al.* Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 664–668 (1994).
203. Elmquist, A., Lindgren, M., Bartfai, T. & Langel, U. null. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res.* **269**, 237–244 (2001).
204. Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M. & Langel, U. Cell penetration by transportan. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **12**, 67–77 (1998).
205. Andaloussi, S. E. L., Lehto, T., Lundin, P. & Langel, U. Application of PepFect peptides for the delivery of splice-correcting oligonucleotides. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **683**, 361–373 (2011).
206. Arukuusk, P. *et al.* New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 1365–1373 (2013).
207. Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F. & Divita, G. A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2730–2736 (1997).
208. Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F. & Divita, G. A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1173 (2001).
209. Konate, K., Rydstrom, A., Divita, G. & Deshayes, S. Everything You Always Wanted to Know About CADY-Mediated siRNA Delivery* (* But Afraid to Ask). *Curr. Drug Metab.* **19**, 2869–2877 (2013).
210. Futaki, S. *et al.* Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* **276**, 5836–5840 (2001).
211. Mitchell, D. J., Kim, D. T., Steinman, L., Fathman, C. G. & Rothbard, J. B. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* **56**, 318–325 (2000).
212. Abes, R. *et al.* Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 775–779 (2007).
213. Jones, S. W. *et al.* Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br. J. Pharmacol.* **145**, 1093–1102 (2005).
214. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov. Today* **17**, 850–860 (2012).
215. Thorén, P. E. G. *et al.* Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 100–107 (2003).

216. Deshayes, S., Morris, M. C., Divita, G. & Heitz, F. Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **62**, 1839–1849 (2005).
217. Oehlke, J. *et al.* Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 127–139 (1998).
218. Fernández-Carneado, J., Kogan, M. J., Castel, S. & Giralt, E. Potential peptide carriers: amphipathic proline-rich peptides derived from the N-terminal domain of gamma-zein. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **43**, 1811–1814 (2004).
219. Konate, K. *et al.* Optimisation of vectorisation property: A comparative study for a secondary amphipathic peptide. *Int. J. Pharm.* **509**, 71–84 (2016).
220. Vaissière, A. *et al.* A retro-inverso cell-penetrating peptide for siRNA delivery. *J. Nanobiotechnology* **15**, 34 (2017).
221. Aldrian, G. *et al.* PEGylation rate influences peptide-based nanoparticles mediated siRNA delivery in vitro and in vivo. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **256**, 79–91 (2017).
222. Marks, J. R., Placone, J., Hristova, K. & Wimley, W. C. Spontaneous Membrane-Translocating Peptides by Orthogonal High-Throughput Screening. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 8995–9004 (2011).
223. Boisguerin, P. *et al.* Systemic delivery of BH4 anti-apoptotic peptide using CPPs prevents cardiac ischemia-reperfusion injuries in vivo. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **156**, 146–153 (2011).
224. Boisguérin, P. *et al.* Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **87**, 52–67 (2015).
225. Zaro, J. L. & Shen, W.-C. Cationic and amphipathic cell-penetrating peptides (CPPs): Their structures and *in vivo* studies in drug delivery. *Front. Chem. Sci. Eng.* **9**, 407–427 (2015).
226. Guidotti, G., Brambilla, L. & Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 406–424 (2017).
227. El Zaoui, I. *et al.* Subconjunctival Injection of XG-102, a c-Jun N-Terminal Kinase Inhibitor Peptide, in the Treatment of Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **31**, 17–24 (2014).
228. Zahid, M. & Robbins, P. D. Cell-type specific penetrating peptides: therapeutic promises and challenges. *Mol. Basel Switz.* **20**, 13055–13070 (2015).
229. Jafari, M. *et al.* Serum Stability and Physicochemical Characterization of a Novel Amphipathic Peptide C6M1 for siRNA Delivery. *PLOS ONE* **9**, e97797 (2014).
230. Qian, Z. *et al.* Intracellular Delivery of Peptidyl Ligands by Reversible Cyclization: Discovery of a PDZ Domain Inhibitor that Rescues CFTR Activity. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **54**, 5874–5878 (2015).
231. Choi, Y. S. *et al.* Cell penetrating peptides for tumor targeting. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 1166–1182 (2011).
232. Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sützlü, T., Johansson, H. & Langel, U. Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **21**, 2664–2671 (2007).
233. Andaloussi, S. E. L. *et al.* Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3972–3987 (2011).
234. Lebleu, B. *et al.* Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 517–529 (2008).
235. Snyder, E. L. & Dowdy, S. F. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2**, 43–51 (2005).
236. Maiolo, J. R., Ferrer, M. & Ottinger, E. A. Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1712**, 161–172 (2005).

237. Vasconcelos, L. *et al.* Effects of cargo molecules on membrane perturbation caused by transportan10 based cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838**, 3118–3129 (2014).
238. Kristensen, M. *et al.* Conjugation of cell-penetrating peptides to parathyroid hormone affects its structure, potency, and transepithelial permeation. *Bioconjug. Chem.* **26**, 477–488 (2015).
239. Birch, D., Christensen, M. V., Staerk, D., Franzyk, H. & Nielsen, H. M. Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide induces differential effects on its cellular distribution and affects cell viability. *Biochim. Biophys. Acta* **1859**, 2483–2494 (2017).
240. Morris, M. C., Chaloin, L., Méry, J., Heitz, F. & Divita, G. A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3510–3517 (1999).
241. Lehto, T. *et al.* Delivery of nucleic acids with a stearylated (RxR)₄ peptide using a non-covalent co-incubation strategy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **141**, 42–51 (2010).
242. Deshayes, S. *et al.* On the mechanism of non-endosomal peptide-mediated cellular delivery of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1667**, 141–147 (2004).
243. Deshayes, S. *et al.* Self-Assembling Peptide-Based Nanoparticles for siRNA Delivery in Primary Cell Lines. *Small* **8**, 2184–2188 (2012).
244. Hällbrink, M., Oehlke, J., Papsdorf, G. & Bienert, M. Uptake of cell-penetrating peptides is dependent on peptide-to-cell ratio rather than on peptide concentration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1667**, 222–228 (2004).
245. Jones, A. T. & Sayers, E. J. Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **161**, 582–591 (2012).
246. Kauffman, W. B., Fuselier, T., He, J. & Wimley, W. C. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 749–764 (2015).
247. Fischer, R., Fotin-Mleczek, M., Hufnagel, H. & Brock, R. Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **6**, 2126–2142 (2005).
248. Pujals, S., Fernández-Carneado, J., López-Iglesias, C., Kogan, M. J. & Giralt, E. Mechanistic aspects of CPP-mediated intracellular drug delivery: relevance of CPP self-assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 264–279 (2006).
249. Poon, G. M. K. & Gariépy, J. Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 788–793 (2007).
250. Jiao, C.-Y. *et al.* Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J. Biol. Chem.* **284**, 33957–33965 (2009).
251. Yang, J., Tsutsumi, H., Furuta, T., Sakurai, M. & Mihara, H. Interaction of amphiphilic α -helical cell-penetrating peptides with heparan sulfate. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 4673–4681 (2014).
252. Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R. S., Murray, B. A. & Wender, P. A. Role of Membrane Potential and Hydrogen Bonding in the Mechanism of Translocation of Guanidinium-Rich Peptides into Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9506–9507 (2004).
253. Müller, J., Triebus, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R. & Boisguerin, P. The agony of choice: how to find a suitable CPP for cargo delivery. *J. Pept. Sci.* **18**, 293–301 (2012).
254. Prochiantz, A. Homeodomain-Derived Peptides: In and Out of the Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **886**, 172–179 (1999).
255. Dom, G. *et al.* Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation. *Nucleic Acids Res.* **31**, 556–561 (2003).
256. Rydberg, H. A., Matson, M., Amand, H. L., Esbjörner, E. K. & Nordén, B. Effects of tryptophan content and backbone spacing on the uptake efficiency of cell-penetrating peptides. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 5531–5539 (2012).

257. Rekdal, Ø. *et al.* Relative spatial positions of tryptophan and cationic residues in helical membrane-active peptides determine their cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **287**, 233–244 (2012).
258. Jobin, M.-L. *et al.* The role of tryptophans on the cellular uptake and membrane interaction of arginine-rich cell penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1848**, 593–602 (2015).
259. Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S. & Gräslund, A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys. Hindawi Publ. Corp. Online* **2011**, 414729 (2011).
260. Deshayes, S., Decaffmeyer, M., Brasseur, R. & Thomas, A. Structural polymorphism of two CPP: an important parameter of activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1197–1205 (2008).
261. Eiríksdóttir, E., Konate, K., Langel, Ü., Divita, G. & Deshayes, S. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 1119–1128 (2010).
262. Yamashita, H. *et al.* Development of a Cell-penetrating Peptide that Exhibits Responsive Changes in its Secondary Structure in the Cellular Environment. *Sci. Rep.* **6**, 33003 (2016).
263. Rydberg, H. A. *et al.* Peptide-membrane interactions of arginine-tryptophan peptides probed using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Eur. Biophys. J.* **43**, 241–253 (2014).
264. Bechara, C. *et al.* Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **27**, 738–749 (2013).
265. Wender, P. A. *et al.* The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13003–13008 (2000).
266. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159–169 (2004).
267. Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R. & Brock, R. A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic Cph. Den.* **8**, 848–866 (2007).
268. Nakase, I. *et al.* Cellular Uptake of Arginine-Rich Peptides: Roles for Macropinocytosis and Actin Rearrangement. *Mol. Ther.* **10**, 1011–1022 (2004).
269. Kaplan, I. M., Wadia, J. S. & Dowdy, S. F. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **102**, 247–253 (2005).
270. Mayor, S. & Pagano, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 603–612 (2007).
271. Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A. E. & Marrink, S.-J. Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 2308–2317 (2008).
272. Last, N. B., Schlamadinger, D. E. & Miranker, A. D. A common landscape for membrane-active peptides. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **22**, 870–882 (2013).
273. Ziegler, A. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 580–597 (2008).
274. Di Pisa, M., Chassaing, G. & Swiecicki, J.-M. Translocation mechanism(s) of cell-penetrating peptides: biophysical studies using artificial membrane bilayers. *Biochemistry (Mosc.)* **54**, 194–207 (2015).
275. Shai, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1462**, 55–70 (1999).
276. Trabulo, S., Cardoso, A. L., Mano, M. & de Lima, M. C. P. Cell-Penetrating Peptides—Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems. *Pharmaceuticals* **3**, 961–993 (2010).
277. Kawamoto, S. *et al.* Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation: importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *J. Chem. Phys.* **134**, 095103 (2011).

278. Afonin, S. *et al.* The cell-penetrating peptide TAT(48-60) induces a non-lamellar phase in DMPC membranes. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* **7**, 2134–2142 (2006).
279. Binder, H. & Lindblom, G. Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes. *Biophys. J.* **85**, 982–995 (2003).
280. Hankins, H. M., Baldridge, R. D., Xu, P. & Graham, T. R. Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic Cph. Den.* **16**, 35–47 (2015).
281. Palm-Apergi, C., Lorents, A., Padari, K., Pooga, M. & Hällbrink, M. The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **23**, 214–223 (2009).
282. LeCher, J. C., Nowak, S. J. & McMurry, J. L. Breaking in and busting out: Cell-penetrating peptides and the endosomal escape problem. *Biomol. Concepts* **8**, 131–141 (2017).
283. Erazo-Oliveras, A., Muthukrishnan, N., Baker, R., Wang, T.-Y. & Pellois, J.-P. Improving the Endosomal Escape of Cell-Penetrating Peptides and Their Cargos: Strategies and Challenges. *Pharmaceuticals* **5**, 1177–1209 (2012).
284. Shin, M. C. *et al.* Cell-penetrating peptides: achievements and challenges in application for cancer treatment. *J. Biomed. Mater. Res. A* **102**, 575–587 (2014).
285. Matsuzaki, K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 1–10 (1999).
286. Letoha, T. *et al.* Membrane translocation of penetratin and its derivatives in different cell lines. *J. Mol. Recognit. JMR* **16**, 272–279 (2003).
287. Heiduk, A. Vectorized peptidic Inhibitors to rescue F508del-CFTR in Cystic Fibrosis. (Freie Universität Berlin, Freie Universität Berlin, Germany, 2017).
288. Meloni, B. P. *et al.* The neuroprotective efficacy of cell-penetrating peptides TAT, penetratin, Arg-9, and Pep-1 in glutamic acid, kainic acid, and in vitro ischemia injury models using primary cortical neuronal cultures. *Cell. Mol. Neurobiol.* **34**, 173–181 (2014).
289. Tünnemann, G. *et al.* Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **20**, 1775–1784 (2006).
290. Wang, Z. X. An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Lett.* **360**, 111–114 (1995).
291. Davenport, S. E. *et al.* Deregulated expression and function of CFTR and Cl⁻ secretion after activation of the Ras and Src/PyMT pathways in Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 663–672 (1996).
292. Haws, C., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H. & Wine, J. J. CFTR in Calu-3 human airway cells: channel properties and role in cAMP-activated Cl⁻ conductance. *Am. J. Physiol.* **266**, L502–512 (1994).
293. Holm, T., Andaloussi, S. E. L. & Langel, U. Comparison of CPP uptake methods. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **683**, 207–217 (2011).
294. Burlina, F., Sagan, S., Bolbach, G. & Chassaing, G. A direct approach to quantification of the cellular uptake of cell-penetrating peptides using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **1**, 200–205 (2006).
295. Vllasaliu, D., Fowler, R., Garnett, M., Eaton, M. & Stolnik, S. Barrier characteristics of epithelial cultures modelling the airway and intestinal mucosa: a comparison. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **415**, 579–585 (2011).
296. Takechi, Y. *et al.* Comparative study on the interaction of cell-penetrating polycationic polymers with lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids* **165**, 51–58 (2012).
297. Ivanov, A. I. Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **440**, 15–33 (2008).
298. Vercauteren, D. *et al.* The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls. *Mol. Ther.* **18**, 561–569 (2010).

299. Dutta, D. & Donaldson, J. G. Search for inhibitors of endocytosis. *Cell. Logist.* **2**, 203–208 (2012).
300. El-Sayed, A., Futaki, S. & Harashima, H. Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J.* **11**, 13–22 (2009).
301. Lönn, P. *et al.* Enhancing Endosomal Escape for Intracellular Delivery of Macromolecular Biologic Therapeutics. *Sci. Rep.* **6**, 32301 (2016).
302. Tünnemann, G. *et al.* Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **14**, 469–476 (2008).
303. Magzoub, M., Pramanik, A. & Gräslund, A. Modeling the endosomal escape of cell-penetrating peptides: transmembrane pH gradient driven translocation across phospholipid bilayers. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 14890–14897 (2005).
304. René, A., Vanthuyne, N., Martinez, J. & Cavelier, F. (L)-(Trimethylsilyl)alanine synthesis exploiting hydroxypinanone-induced diastereoselective alkylation. *Amino Acids* **45**, 301–307 (2013).
305. Fanelli, R. *et al.* Access to α,α -Disubstituted Disilylated Amino Acids and Their Use in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **17**, 4498–4501 (2015).
306. Martin, C., Vanthuyne, N., Miramon, H., Martinez, J. & Cavelier, F. Resolution of protected silaprolone for a gram scale preparation. *Amino Acids* **43**, 649–655 (2012).
307. Ay, B., Volkmer, R. & Boisguerin, P. Synthesis of cleavable peptides with authentic C-termini: an application for fully automated SPOT synthesis. *Tetrahedron Lett.* **48**, 361–364 (2007).
308. Ay, B. *et al.* Using hydroxymethylphenoxy derivatives with the SPOT technology to generate peptides with authentic C-termini. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 4038–4043 (2008).
309. Wolde, M. *et al.* Targeting CAL as a Negative Regulator of $\Delta F508$ -CFTR Cell-Surface Expression : An RNA Interference And Structure-Based Mutagenetic Approach. *J. Biol. Chem.* **282**, 8099–8109 (2007).
310. Kristensen, M., Birch, D. & Mørck Nielsen, H. Applications and Challenges for Use of Cell-Penetrating Peptides as Delivery Vectors for Peptide and Protein Cargos. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
311. Carter, E., Lau, C. Y., Tosh, D., Ward, S. G. & Mersny, R. J. Cell penetrating peptides fail to induce an innate immune response in epithelial cells in vitro: Implications for continued therapeutic use. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85**, 12–19 (2013).
312. Saar, K. *et al.* Cell-penetrating peptides: A comparative membrane toxicity study. *Anal. Biochem.* **345**, 55–65 (2005).
313. Jafari, M. Design, Characterization and Application of Amphipathic Peptides for siRNA Delivery. (2013).
314. Richard, J. P. *et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* **278**, 585–590 (2003).
315. Bechara, C. & Sagan, S. Cell-penetrating peptides: 20years later, where do we stand? *FEBS Lett.* **587**, 1693–1702 (2013).
316. Birch, D., Christensen, M. V., Staerk, D., Franzyk, H. & Nielsen, H. M. Fluorophore labeling of a cell-penetrating peptide induces differential effects on its cellular distribution and affects cell viability. *Biochim. Biophys. Acta* **1859**, 2483–2494 (2017).
317. Illien, F. *et al.* Quantitative fluorescence spectroscopy and flow cytometry analyses of cell-penetrating peptides internalization pathways: optimization, pitfalls, comparison with mass spectrometry quantification. *Sci. Rep.* **6**, 36938 (2016).
318. Swiecicki, J.-M. *et al.* How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides. *Sci. Rep.* **6**, 20237 (2016).
319. 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.* **44**, 4244–4247 (2005).

320. Paramelle, D. *et al.* A Straightforward Approach for Cellular-Uptake Quantification. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 8240–8243 (2010).
321. Arkin, I. T. & Brunger, A. T. Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim. Biophys. Acta* **1429**, 113–128 (1998).
322. Sanchez, K. M., Kang, G., Wu, B. & Kim, J. E. Tryptophan-Lipid Interactions in Membrane Protein Folding Probed by Ultraviolet Resonance Raman and Fluorescence Spectroscopy. *Biophys. J.* **100**, 2121–2130 (2011).
323. Marmé, N., Knemeyer, J.-P., Sauer, M. & Wolfrum, J. Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan. *Bioconjug. Chem.* **14**, 1133–1139 (2003).
324. Mansoor, S. E., Dewitt, M. A. & Farrens, D. L. Distance mapping in proteins using fluorescence spectroscopy: the tryptophan-induced quenching (TrIQ) method. *Biochemistry (Mosc.)* **49**, 9722–9731 (2010).
325. Abe, R. *et al.* ‘Quenchbodies’: quench-based antibody probes that show antigen-dependent fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17386–17394 (2011).
326. Walrant, A., Cardon, S., Burlina, F. & Sagan, S. Membrane Crossing and Membranotropic Activity of Cell-Penetrating Peptides: Dangerous Liaisons? *Acc. Chem. Res.* **50**, 2968–2975 (2017).
327. Walrant, A. *et al.* Different membrane behaviour and cellular uptake of three basic arginine-rich peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**, 382–393 (2011).
328. Jobin, M.-L. *et al.* The role of tryptophans on the cellular uptake and membrane interaction of arginine-rich cell penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 593–602 (2015).
329. Hunter, J., Hirst, B. H. & Simmons, N. L. Drug Absorption Limited by P-Glycoprotein-Mediated Secretory Drug Transport in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Layers. *Pharm. Res.* **10**, 743–749 (1993).
330. Foster, K. A., Avery, M. L., Yazdanian, M. & Audus, K. L. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* **208**, 1–11 (2000).
331. Chappe, F., Loewen, M. E., Hanrahan, J. W. & Chappe, V. Vasoactive intestinal peptide increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator levels in the apical membrane of Calu-3 cells through a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**, 226–238 (2008).
332. George, I., Vranic, S., Boland, S., Courtois, A. & Baeza-Squiban, A. Development of an in vitro model of human bronchial epithelial barrier to study nanoparticle translocation. *Toxicol. In Vitro* **29**, 51–58 (2015).
333. Holm, T. *et al.* Retro-inversion of certain cell-penetrating peptides causes severe cellular toxicity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 1544–1551 (2011).
334. El-Andaloussi, S., Järver, P., Johansson, H. J. & Langel, Ü. Cargo-dependent cytotoxicity and delivery efficacy of cell-penetrating peptides: a comparative study. *Biochem. J.* **407**, 285–292 (2007).
335. Young Kim, H., Young Yum, S., Jang, G. & Ahn, D.-R. Discovery of a non-cationic cell penetrating peptide derived from membrane-interacting human proteins and its potential as a protein delivery carrier. *Sci. Rep.* **5**, 11719 (2015).
336. Zhang, X. *et al.* Quantitative assessment of the cell penetrating properties of RI-Tat-9: evidence for a cell type-specific barrier at the plasma membrane of epithelial cells. *Mol. Pharm.* **1**, 145–155 (2004).
337. Kirchner, S. *et al.* Use of Artificial Sputum Medium to Test Antibiotic Efficacy Against *Pseudomonas aeruginosa* in Conditions More Relevant to the Cystic Fibrosis Lung. *J. Vis. Exp. JoVE* (2012). doi:10.3791/3857
338. Brugidou, J., Legrand, C., Méry, J. & Rabié, A. The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 685–693 (1995).
339. Derichs, N. *et al.* Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax* **65**, 594–599 (2010).

340. LeSimple, P., Liao, J., Robert, R., Gruenert, D. C. & Hanrahan, J. W. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *J. Physiol.* **588**, 1195–1209 (2010).
341. Molina, S. A. *et al.* Junctional abnormalities in human airway epithelial cells expressing F508del CFTR. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **309**, L475–L487 (2015).
342. Mishra, A. *et al.* Translocation of HIV TAT peptide and analogues induced by multiplexed membrane and cytoskeletal interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 16883–16888 (2011).
343. El-Andaloussi, S., Johansson, H. J., Lundberg, P. & Langel, U. Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J. Gene Med.* **8**, 1262–1273 (2006).
344. Ezzat, K. *et al.* PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5284–5298 (2011).
345. Kim, H. H., Lee, W. S., Yang, J. M. & Shin, S. Basic peptide system for efficient delivery of foreign genes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1640**, 129–136 (2003).
346. Rydström, A. *et al.* Direct Translocation as Major Cellular Uptake for CADY Self-Assembling Peptide-Based Nanoparticles. *PLoS ONE* **6**, (2011).
347. Torgersen, M. L., Skretting, G., Deurs, B. van & Sandvig, K. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J. Cell Sci.* **114**, 3737–3747 (2001).
348. Broeck, D. V., Lagrou, A. R. & De Wolf, M. J. Distinct role of clathrin-mediated endocytosis in the functional uptake of cholera toxin. *Acta Biochim. Pol.* **54**, 757–767 (2007).
349. Blank, N. *et al.* Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1. *Immunol. Cell Biol.* **85**, 378–382 (2007).
350. Singh, R. D. *et al.* Selective Caveolin-1–dependent Endocytosis of Glycosphingolipids. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3254–3265 (2003).
351. Kirkham, M. & Parton, R. G. Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1745**, 273–286 (2005).
352. Richard, J. P. *et al.* Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* **280**, 15300–15306 (2005).
353. Ju, H., Zou, R., Venema, V. J. & Venema, R. C. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 18522–18525 (1997).
354. Jones, A. T. Gateways and tools for drug delivery: Endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides. *Int. J. Pharm.* **354**, 34–38 (2008).
355. Räägel, H., Säälük, P. & Pooga, M. Peptide-mediated protein delivery—Which pathways are penetrable? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1798**, 2240–2248 (2010).
356. Blackwell, H. E. Hitting the SPOT: small-molecule macroarrays advance combinatorial synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 203–212 (2006).
357. Schneider, A. C. *et al.* Microwave-Facilitated SPOT-Synthesis of Antibacterial Dipeptoids. *ACS Comb. Sci.* **19**, 715–737 (2017).
358. Boisguerin, P. *et al.* An Improved Method for the Synthesis of Cellulose Membrane-Bound Peptides with Free C Termini Is Useful for PDZ Domain Binding Studies. *Chem. Biol.* **11**, 449–459 (2004).
359. Seisel, Q., Rädisch, M., Gill, N. P., Madden, D. R. & Boisguerin, P. Optimization of the process of inverted peptides (PIPEPLUS) to screen PDZ domain ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 3111–3116 (2017).
360. Suppo, J.-S., Subra, G., Bergès, M., Marcia de Figueiredo, R. & Campagne, J.-M. Inverse peptide synthesis via activated α -aminoesters. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53**, 5389–5393 (2014).
361. Grillo-Bosch, D., Choquet, D. & Sainlos, M. Inhibition of PDZ domain-mediated interactions. *Drug Discov. Today Technol.* **10**, e531–e540 (2013).

362. Jerabek-Willemsen, M. *et al.* MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* **1077**, 101–113 (2014).
363. Eglen, R. M. *et al.* The Use of AlphaScreen Technology in HTS: Current Status. *Curr. Chem. Genomics* **1**, 2–10 (2008).
364. Tang, W. & Wildey, M. J. Development of a colorimetric method for functional chloride channel assay. *J. Biomol. Screen.* **9**, 607–613 (2004).
365. Galietta, L. V., Jayaraman, S. & Verkman, A. S. Cell-based assay for high-throughput quantitative screening of CFTR chloride transport agonists. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **281**, C1734–1742 (2001).