

TITRE (Français)	INTERACTIONS ENTRE PEPTIDES VECTEURS ET MEMBRANES MODELES ET BIOLOGIQUES. LE CAS DE TROIS PEPTIDES SYNTHETIQUES.
TITRE (English)	INTERACTIONS BETWEEN CELL-PENETRATING PEPTIDES AND MODEL AND BIOLOGICAL MEMBRANES. THE CASE OF THREE SYNTHETIC PEPTIDES.
AUTEUR	Astrid Walrant
UNIVERSITE	Université Pierre et Marie Curie - Paris 6
DATE	30 Septembre 2011
LABORATOIRE	Laboratoire des Biomolécules - UMR 7203
DIRECTION DE THESE	Isabel Alves et Sandrine Sagan
PARRAINAGE	

Résumé en Français

Les peptides vecteurs (cell-penetrating peptides ou CPPs) ont la capacité de traverser les membranes cellulaires et de transporter des molécules à l'intérieur des cellules. Plusieurs mécanismes d'entrée sont envisagés (translocation directe à travers la membrane ou l'endocytose), mais l'interaction préalable entre le peptide vecteur et la membrane plasmique est certainement une étape préliminaire clef à prendre en considération.

Dans cette étude, trois peptides ont été utilisés : RL9 (RLLRRLRR-NH₂), RW9 (RRWRRWRR-NH₂) et R9 (RRRRRRRR-NH₂). RW9 et R9 sont internalisés dans les cellules CHO sauvages et déficientes en glycosaminoglycanes, à 37 °C et 4 °C, montrant qu'endocytose et translocation directe sont des mécanismes d'internalisations actifs. En revanche, RL9 n'est pas internalisé.

La capacité de ces peptides à traverser des membranes purement lipidiques a également été étudiée. Pour cela, l'entrée de RW9 et RL9 dans des liposomes a été quantifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF et microscopie de fluorescence.

Afin de mieux comprendre les différences de comportement entre ces peptides, nous avons étudié leurs interactions avec des systèmes membranaires modèles. La structure secondaire de RW9, RL9 et R9 en présence ou en absence de vésicules lipidiques a été étudiée par dichroïsme circulaire. Non-structurés en solution ou de vésicules non chargées, ces peptides se structurent en présence de liposomes composés de lipides anioniques. La structure de RW9 et RL9 a été confirmée par des études RMN en milieu micellaire. RW9, RL9 et R9 se lient à des vésicules chargées négativement avec une affinité de l'ordre du µM, ce qui a été mis en évidence grâce à la calorimétrie de titration isotherme (ITC). La liaison de ces trois peptides à des liposomes met essentiellement en jeu des interactions de type hydrophobe. L'insertion de RW9, RL9 et R9 dans des membranes modèles et le changement consécutif d'organisation dans la membrane a été étudié par plusieurs techniques. L'effet de ces peptides sur les transitions de plusieurs lipides a été étudié par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). L'insertion de RW9, RL9 et R9 dans des monocouches lipidiques a été étudié via la mesure de la pression de surface à l'interface air/eau dans une cuve de Langmuir. La réorganisation membranaire consécutive à l'ajout de ces peptides a été mise en évidence par spectroscopie infrarouge en mode ATR.

Il ressort de cette étude que la présence de charges négatives à la membrane est indispensable pour déclencher l'interaction peptide/membrane. Il semble que les trois peptides étudiés peuvent s'insérer dans des membranes modèles, mais seul RW9 est capable de désorganiser sensiblement la bicouche lipidique. Cette propriété pourrait expliquer pourquoi ce peptide peut pénétrer dans des cellules et des vésicules lipidiques contrairement à RL9.

Résumé en anglais

Cell penetrating peptides (CPPs) are peptides displaying the ability to cross cell membranes and transport cargo molecules inside cells. Several uptake mechanisms (endocytic or direct translocation through the membrane) are being considered, but the interaction between the CPP and the cell membrane is certainly a preliminary key point to the entry of the peptide into the cell.

In this study, we used three basic peptides: RL9 (RLLRRLRR-NH₂), RW9 (RRWRRWRR-NH₂) and R9 (RRRRRRRR-NH₂). RW9 and R9 were internalised into wild type Chinese Hamster Ovary (CHO) cells and glycosaminoglycan-deficient CHO cells at 4°C and 37 °C, showing both endocytosis and direct translocation are active. On the other hand RL9 was not internalised. Peptide translocation in liposomes was also studied.

To better understand the differences between RW9, R9 and RL9 in terms of uptake, we studied the interaction of these peptides with model lipid membranes. Different interaction parameters were tested using a wide range of techniques. The presence of negative charges on the lipid headgroups appeared to be essential to trigger the peptide/lipid interaction. Peptide insertion in the membrane and the subsequent lipid reorganisation was probed using monolayers experiments, DSC and ATR-FTIR. With ITC experiments, the affinity of these peptides for POPG LUVs was determined, and the importance of hydrophobic interactions was highlighted. Peptide structure in solution or in presence of model membranes was studied using CD, ATR-FTIR and NMR. All these experiments showed that while RW9 and R9 are able to interact deeply with the bilayer and have destabilising properties, RL9 has very little effect on model membranes.