

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES  
Institut de chimie de Strasbourg

**THÈSE** présentée par :  
**Romuald MANCA**

soutenue le : 25 Novembre 2024

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de  
Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Chimie - Biologie

**Étude structurale et fonctionnelle des  
assemblages supramoléculaires du peptide  
Vectofusin-1**

**THÈSE** dirigée par :

**M. BECHINGER Burkhard**

Pr, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme. BÖCKMANN Anja**

Dr, Laboratoire MMSB de Lyon

**Mme. GARDIENNET Carole**

Cr, Laboratoire CRM2 de Nancy

**EXAMINATEUR :**

**M. KICHLER Antoine**

Dr, Université de Strasbourg

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Utilisation des peptides LAH4 en thérapie génique</b>	<b>8</b>
1.1	La famille de peptides LAH4 . . . . .	8
1.1.1	Propriétés bio-chimiques . . . . .	8
1.1.2	Auto-assemblage des peptides . . . . .	13
1.2	Thérapie génique . . . . .	18
1.2.1	Thérapie génique lentivirale . . . . .	20
1.2.2	L'utilisation d'adjuvants en thérapie génique . . . . .	22
1.3	Etude sur la corrélation entre assemblage des peptides LAH4 et activité de transduction	24
1.3.1	Mise en contexte . . . . .	24
1.3.2	Matériel et méthode . . . . .	28
1.3.3	Résultats et discussion . . . . .	31
<b>2</b>	<b>Production d'échantillons pour l'étude structurale du peptide Vectofusin-1</b>	<b>46</b>
2.1	Synthèse peptidique . . . . .	48
2.1.1	Synthèse des peptides LAH4 . . . . .	50
2.2	Surexpression du marqué $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 . . . . .	51
2.2.1	Principes biologiques de la surexpression . . . . .	51

2.2.2	L'utilisation de protéines de fusion pour l'expression en systèmes recombinants	53
2.2.3	Matériel et méthode : Expression de la protéine de fusion TAF12-Vectofusin-1	57
2.2.4	Résultats et conclusions	59
2.3	Purification du peptide $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1	60
2.3.1	Introduction	60
2.3.2	Matériel et méthode : purification de peptides d'origine bactérienne	61
2.3.3	Résultats et conclusions	62
2.4	Séparation de la Vectofusin-1 du TAF12	64
2.4.1	Nouvelles approches expérimentales	64
2.4.2	Matériels et méthodes	66
2.4.3	Résultats et conclusions	68
<b>3</b>	<b>Etude structurale des auto-assemblages du peptide Vectofusin-1</b>	<b>75</b>
3.1	Etude sur la variation des conditions environnementales menant à la formation d'assemblages supramoléculaires	75
3.1.1	Microscopie électronique à transmission	76
3.1.2	Matériel et méthode	77
3.1.3	Fibrillation des peptides de la famille LAH4	77
3.1.4	Résultats et discussion	80
3.2	Modélisation moléculaire et prédictions de structures des assemblages de Vectofusin-1	87
3.2.1	Indices de confiance	88
3.2.2	Matériel et méthode	89
3.2.3	Résultats	89

3.3	Etude par RMN du solide des interactions dans les assemblages de peptides Vectofusin-1 . . . . .	95
3.3.1	Introduction à la RMN . . . . .	95
3.3.2	La RMN du solide pour l'étude d'échantillons protéiques . . . . .	104
3.4	Etude des fibrilles de Vectofusin-1 par RMN du solide . . . . .	107
3.4.1	Stratégie expérimentale pour la caractérisation d'interactions peptide-solvant	107
3.4.2	Matériel et méthode . . . . .	110
3.4.3	Résultats et discussions . . . . .	112
3.4.4	Stratégie expérimentale pour l'étude des fibrilles de Vectofusin-1 par RMN du solide en détection proton . . . . .	120
3.4.5	Matériel et méthode . . . . .	123
3.4.6	Résultats et discussion . . . . .	129
3.4.7	Expériences en détection hétéronoyaux . . . . .	139
3.4.8	Matériel et méthode . . . . .	142
3.4.9	Résultats . . . . .	143
3.4.10	Stratégie expérimentale pour la caractérisation d'interactions peptide-peptide	148
3.4.11	Conclusion . . . . .	160

## Liste des abréviations

RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CPP	Peptides pénétrant dans les cellules
ELP	Elastin Like Polypeptides
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TEM	Microscopie Electronique à Transmission
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PBS	Tampon phosphate salin
GFP	Green Fluorescent Protein
FSC	Forward scattering
SCC	Side scattering
7AAD	7-aminoactinomycine D
SPPS	Synthèse de peptides en phase solide
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle
HBTU	Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium
TFA	Acide trifluoroacétique
MIC	Concentration minimale inhibitrice
GST	Glutathion-S-transferase
TAF12	TATA-box binding protein associated factor 12
ORF	Open Reading Frame
pTIPX4	TAF12-mediated Insoluble Peptide eXpression
MCS	Sites de clonage multiple
ori	Origine de réplication
IPTG	Isopropyl -D-1-thiogalactopyranoside
MWCO	Seuil de poids moléculaire
UniDec	Universal Deconvolution of Mass Spectra
pLDDT	Predicted Local Distance Difference Test
pTM	Predicted Template Modeling
ipTM	Interface predicted Template Modeling
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
WAXS	Wide Angle X-ray Scattering
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
RF	Radiofréquence
MAS	Magic Angle Spinning
CP	Cross Polarisation
APHH	Adiabatic Passage through the Hartmann-Hahn Condition
HETCOR	Heteronuclear Corelation
LG	Lee-Goldburg
FSLG	Frequency Switched Lee-Goldburg
DSS	Acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique
fMLF	Formylmethionine-leucyl-phenylalanine
RFDR	Radio Frequency Driven Recoupling

## Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé au sein du laboratoire de RMN et de biophysique des membranes (CNRS, UMR 7177) à Strasbourg.

Je remercie le Pr. Burkhard Bechinger de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, de la grande liberté dont j'ai bénéficié durant ces quatre années et pour ses critiques constructives et ses suggestions pertinentes, qui ont permis d'enrichir cette thèse.

Je remercie également les membres du jury, Anja Böckmann, Carole Gardiennet et Antoine Kichler, d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Leur expertise et leurs observations seront d'une grande aide pour l'amélioration et la finalisation de cette thèse.

Un grand merci à l'ensemble des membres de l'équipe pour leur soutien, leur disponibilité et les nombreuses discussions qui ont nourri mon travail. Leur aide a été précieuse, tant sur le plan scientifique qu'humain.

Je tiens particulièrement à remercier Jésus et Ahmad, qui m'ont transmis avec beaucoup de patience leurs connaissances en RMN et Elise qui m'a grandement aidé dans la partie biologie de mes recherches. Son expertise et son soutien ont été indispensables à l'avancement de ce projet.

Je souhaite également exprimer ma gratitude aux collaborateurs scientifiques avec qui j'ai pu travailler et dont l'expertise et les échanges ont grandement enrichi mon travail. Leur contribution a été précieuse pour l'avancée de ce projet.

Je tiens à remercier Barbara Peronne de m'avoir chaleureusement accueilli dans les locaux de Bruker à Fällanden. Je la remercie également de m'avoir permis d'accéder à la cryo-probe 3.2mm, ainsi que pour la visite complète de l'usine Bruker, qui a été une expérience particulièrement enrichissante.

Je remercie également Anne Galy, directrice de l'ART-TG, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe pendant une semaine, me permettant ainsi de réaliser les tests de thérapie génique dans des conditions optimales.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma gratitude à ma famille et à mes amis pour leur soutien indéfectible tout au long de cette aventure.

## Avant-propos

Ce manuscrit présente un travail de recherche consacré à l'étude des peptides de la famille LAH4 et de leur potentielle application en thérapie génique. Le contenu de cette thèse s'articule autour de trois chapitres principaux, chacun abordant un aspect distinct mais complémentaire de l'étude.

Le premier chapitre pose les bases théoriques nécessaires à la compréhension du sujet en offrant un aperçu historique des peptides LAH4. Il introduit également les concepts clés de la thérapie génique, ainsi que l'utilisation des peptides en tant qu'adjuvants dans cette approche thérapeutique. Ce chapitre décrit ensuite l'étude fonctionnelle des activités biologiques des assemblages supramoléculaires de peptides LAH4 que nous avons menée en collaboration avec le laboratoire ART-TG d'Evry.

Le deuxième chapitre est dédié aux aspects expérimentaux liés à la production et à la purification des peptides. Nous y détaillons les stratégies développées pour produire ces peptides, en particulier au sein de systèmes bactériens, en vue d'obtenir des peptides marqués isotopiquement. Ces peptides sont destinés à des études par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), et leur production efficace et leur purification sont des étapes cruciales pour la suite des recherches.

Enfin, le troisième chapitre est consacré à l'étude biophysique des assemblages supramoléculaires formés par le peptide LAH4-A4. Cette partie de la thèse explore les propriétés biophysiques de ces assemblages, mettant en lumière des aspects structuraux et fonctionnels essentiels pour leur compréhension dans un contexte d'application thérapeutique.

À travers ces trois chapitres, ce manuscrit vise à apporter une contribution significative à la connaissance des peptides LAH4, tant sur le plan théorique qu'expérimental, avec l'objectif ultime de mieux comprendre leur potentiel en tant qu'adjuvants pour la thérapie génique.

# Chapitre 1

## Utilisation des peptides LAH4 en thérapie génique

### 1.1 La famille de peptides LAH4

#### 1.1.1 Propriétés bio-chimiques

Le peptide LAH4 a été conçu par notre laboratoire en tant que peptide antimicrobien modèle pour étudier spécifiquement les interactions qui déterminent la topologie membranaire des peptides  $\alpha$ -hélicoïdaux<sup>5</sup>. Il est composé de 26 acides aminés, de quatre types différents. Deux lysines à chaque extrémité assurent une bonne solubilité dans l'eau. Le coeur de la séquence est composé des résidus hydrophobes leucine et alanine, interrompus par quatre histidines. Le peptide a donc une charge globale de + 9 à pH acide et de + 5 à pH neutre (le groupement N terminal est considéré comme étant  $\text{NH}_3^+$ ). La séquence du peptide LAH4 est représentée dans la figure 1. Tous les peptides de la famille LAH4 sont dérivés de cette séquence originale, la composition de leur séquence est identique mais la position des histidines au sein de la séquence diffère. Deux exemples de peptides dérivés de LAH4 sont présentés dans la figure 1.

LAH4      KKALL ALALH HLAHL ALHLA LALKK A  
 LAH4-L1   KKALL AHALH LLALL ALHLA HALKK A  
 LAH4-A4   KKALL HAALA HLLAL AHHLL ALLKK A

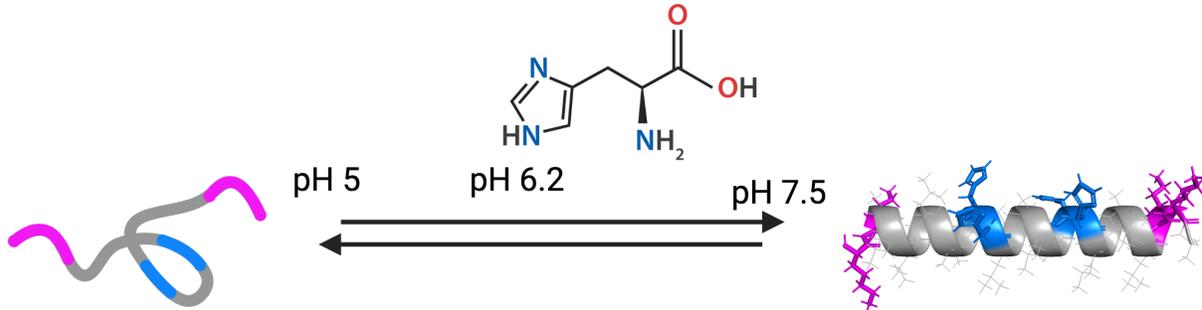


Figure 1 – Conformation de LAH4 en solution en fonction du pH. A pH 5, le peptide est non structuré. Une augmentation du pH conduit le peptide à adopter une conformation  $\alpha$ -hélicoïdale.<sup>58</sup>

### Comportement en solution

En solution, à pH acide ( $<6$ ), les histidines du peptide sont protonées et le peptide est désordonné. Lorsque le pH augmente au-delà du pKa de l'amine de la chaîne latérale histidine (pH 6.2), la charge apparente des histidines devient neutre, et le peptide adopte une conformation  $\alpha$ -hélicoïdale<sup>5</sup> (figure 1).

Le repliement induit par les différents états de protonation des histidines confère au peptide un caractère amphiphile dépendant du pH. En effet, lorsqu'il adopte une conformation  $\alpha$ -hélicoïdale, on peut distinguer deux faces au peptide : une face hydrophobe présentant les résidus alanines et leucines, ainsi qu'une face hydrophile présentant les résidus histidines ayant des chaînes latérales polaires (figure 1).

### Comportement en environnement membranaire

Bien que les peptides de la famille LAH4 ne soient pas structurés à pH acide en solution, dans un environnement membranaire, les peptides LAH4 adoptent une conformation  $\alpha$ -hélicoïdale.<sup>111</sup>

L'orientation du peptide dans les membranes dépend alors de l'état de protonation des histidines. En effet, à pH acide ( $<6$ ), le peptide adopte une orientation parallèle à la surface de la membrane. Lorsque le pH augmente à 6.1, une rupture de l'hélice  $\alpha$  entre les résidus Leucine 9 et Histidine 14 est observable. La partie du peptide en C terminal de l'Histidine 14 s'insère dans la membrane tandis que la partie en N terminal de la Leucine 9 reste parallèle à la surface de la membrane. A pH neutre, les histidines sont déprotonées et le peptide passe alors à une orientation intégralement transmembranaire<sup>6</sup>.

L'orientation membranaire peut être déterminée par RMN orientée à l'état solide grâce au déplacement chimique  $^{15}\text{N}$  de l'azote du squelette peptidique. Un déplacement chimique en dessous de 100 ppm est indicatif d'une orientation coplanaire à la membrane alors qu'un déplacement chimique proche de 200 ppm indiquera que le peptide est en orientation transmembranaire (Figure 2).

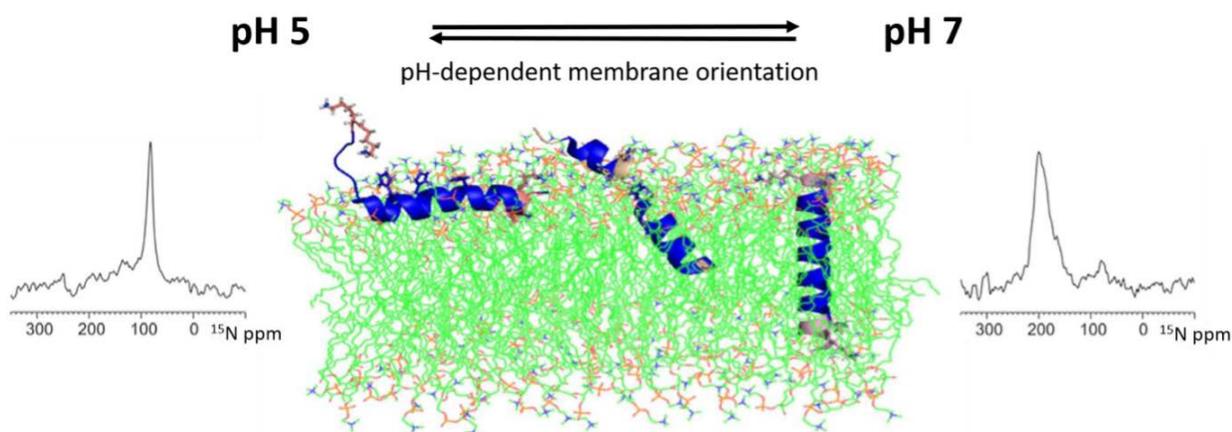


Figure 2 – Orientation du peptide LAH4 en présence de membrane. Le peptide adopte des orientations planaires à pH 5 alors qu'à pH environ 7 il adopte un alignement transmembranaire. Les spectres RMN  $^{15}\text{N}$  correspondant à ces deux conformations sont également représentés sur les côtés<sup>6</sup>.

### Pénétration membranaire des peptides LAH4

Outre ces propriétés structurales, les peptides de la famille LAH4 présentent également des activités biologiques intéressantes. Le peptide LAH4 est capable de provoquer la formation de pores dans les membranes bactériennes, ce qui lui confère une activité antimicrobienne à pH neutre qui est améliorée à pH acide<sup>111</sup>. Afin d'étudier les causes de cette activité et de

l'améliorer, des dérivés de LAH4 ont été conçus, constituant la famille LAH4 (figure 3<sup>58,60</sup>).

	1	5	10	15	20	25	
LAH4	KKALL	ALALH	HLAHL	ALHLA	LALKK	A	
LAH4-L/A0	KKALL	AHALA	HLALL	ALHLA	LHLKK	A	
LAH4-L1	KKALL	AHALH	LLALL	ALHLA	HALKK	A	
LAH4-L2	KKALL	ALALH	HLALL	ALHLA	HALKK	A	
LAH4-L3	KKALL	ALALH	HLALL	AHHLA	LALKK	A	
LAH4-L4	KKALL	HLALL	HAALL	AHHLA	LALKK	A	
LAH4-L5	KKALL	HLALL	HAALL	AHLAA	LHLKK	A	
LAH4-L6	KKALL	HALLA	ALLAH	LHALL	AHLKK	A	
LAH4-A1	KKALL	AHALH	LLAAL	ALHLA	HLLKK	A	
LAH4-A2	KKALL	LAALH	HLAAL	ALHLA	HLLKK	A	
LAH4-A3	KKALL	LAALH	HLLAL	AHHLA	ALLKK	A	
LAH4-A4	KKALL	HAALA	HLLAL	AHHLL	ALLKK	A	
LAH4-A5	KKALL	HALLA	HLAAL	LHALL	AHLKK	A	
LAH4-A6	KKALL	HALLA	ALLAH	LHALL	AHLKK	A	

Figure 3 – Alignement de séquences des différents peptides de la famille LAH4

Tous les peptides de la famille LAH4 présentent une face hydrophile qui est définie par le positionnement des quatre histidines présentes dans la séquence des peptides (figure 3). Ainsi, les peptides sont nommés -Ln et -An selon le nombre n respectif de leucines ou

d'alanines pouvant être observé dans l'angle formé par les histidines lorsque les peptides sont représentés en roue hélicoïdale (figure 4). Par exemple, LAH4-L1 présente une leucine entre les deux paires d'histidines formant un angle de  $80^\circ$  et LAH4-A4 présente 4 histidines entre les deux paires d'histidines formant un angle de  $140^\circ$ .

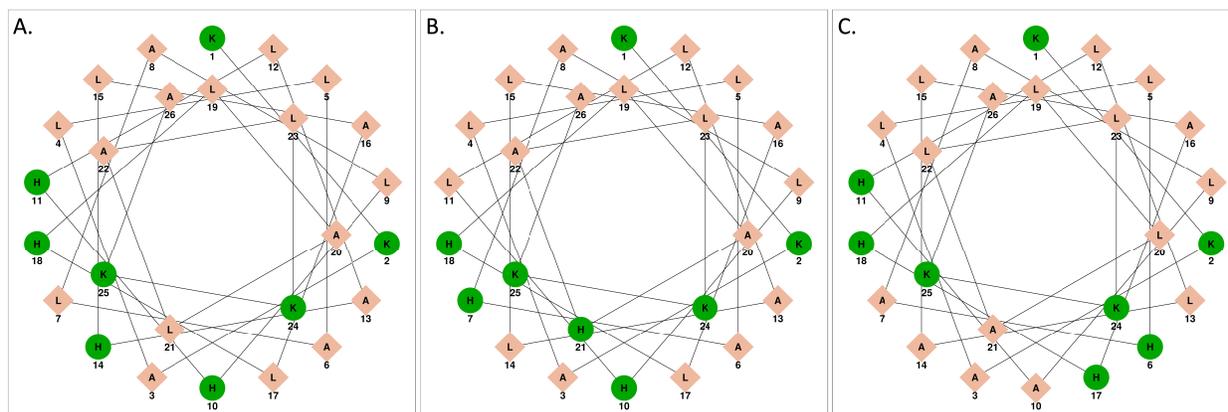


Figure 4 – Représentation en roue hélicoïdale des peptides LAH4 (A.), LAH4-L1 (B.) et LAH4-A4 (C.)<sup>81,60</sup>.

Il a été démontré que l'angle hydrophile formé par les histidines influence l'activité biologique des peptides<sup>60,58</sup>. Ainsi, certains peptides de la famille LAH4 ont montré de bonnes activités de transfection d'acide désoxyribonucléique (ADN) et d'acide ribonucléique (ARN). Ces peptides appartiennent donc à la catégorie des peptides pénétrant dans les cellules (CPP), qui sont généralement des peptides relativement courts qui se caractérisent par leur capacité à interagir avec la membrane plasmique des cellules et à accéder au compartiment cellulaire par différents mécanismes<sup>53,20</sup>.

Les CPP sont essentiellement utilisés pour délivrer différentes cargaisons telles que des acides nucléiques, des polymères, des liposomes, des nanoparticules et d'autres molécules dans les cellules. Les complexes entre les CPP et les cargaisons peuvent être formés par des liaisons covalentes (ponts disulfure, liaisons amide, ou autres liaisons spécifiques) ou non covalentes (interactions électrostatiques, interactions hydrophobes)<sup>121</sup>. Il a été montré pour le peptide LAH4 que les résidus Lysines chargés positivement interagissent avec les acides nucléiques chargés négativement (petits ARN interférents, ADN plasmidiques, etc.)<sup>109</sup>.

Les propriétés d'internalisation des CPP dépendent des structures secondaires des peptides<sup>23,57</sup>. La pénétration de la cargaison dans les cellules peut se faire de deux manières, soit par pénétration directe, via la perméabilisation de la membrane eucaryote, soit par

endocytose.

Lors de l'endocytose, Les peptides LAH4 forment un complexe avec l'acide nucléique à délivrer par interaction électrostatique entre les résidus lysines du peptide et les groupes phosphates de l'Acide nucléique<sup>109,7</sup>. Ce complexe interagit ensuite avec la membrane cellulaire et est ensuite internalisé par un endosome. L'acidification de l'endosome conduit à la protonation de l'histidine ce qui provoque la dissociation du complexe. Le peptide LAH4 ainsi libéré rompt la membrane endosomale ce qui a pour effet de libérer la cargaison d'acide nucléique<sup>49</sup>.

Les peptides LAH4 ont montré leur efficacité pour améliorer l'absorption cellulaire d'une grande variété de cargaisons qui peuvent être divisées en deux types : virales ou non-virales<sup>91</sup>. Le processus d'administration d'un système non viral est appelé transfection, tandis que celui d'un vecteur viral est appelé transduction. Les CPP de la famille LAH4 peuvent être utilisés pour augmenter l'efficacité de la transfection<sup>85</sup> et de la transduction<sup>64</sup>.

Certains peptides de la famille LAH4 ont montré un bon potentiel pour le transfert de gènes tel que le peptide LAH4-L1<sup>60</sup>. D'autres peptides comme le dérivé LAH4-A4, se sont révélés être d'excellents amplificateurs de transduction virale lorsque le peptide est utilisé comme adjuvant dans le cadre de thérapie génique utilisant des lentivirus. Le peptide LAH4-A4 a été breveté et est commercialisé sous le nom de Vectofusin-1<sup>26,102</sup>.

### 1.1.2 Auto-assemblage des peptides

L'assemblage peut être défini comme l'organisation spontanée et réversible de molécules en assemblages supramoléculaires principalement guidée par des interactions non covalentes (électrostatiques, hydrophobes, liaisons hydrogène, etc.)<sup>112</sup>.

Les assemblages de peptides et protéines peuvent être trouvés à l'état naturel. Par exemple, la magainine 2 et le PGLa sont des peptides trouvés naturellement dans la peau des grenouilles *Xenopus laevis* où ils constituent une partie importante du système immunitaire inné. Il a été montré que PGLa et magainine 2 forment des assemblages à la surface d'un modèle membranaire constitué de POPE, un lipide anionique typique des membranes bactériennes<sup>1</sup>. De plus, lorsqu'ils sont combinés, l'activité antimicrobienne des peptides n'est pas additive mais présente une augmentation synergique d'un ordre de grandeur de leurs activités antibiotiques respectives<sup>69</sup>.

L'auto-assemblage des protéines est un domaine particulièrement intéressant en biotechnologies. Chez l'Homme, il a été observé que les peptides et les protéines auto-assemblés sont impliqués dans les troubles neurodégénératifs humains tels que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies<sup>92, 27, 35</sup>.

L'auto-assemblage de peptides suscite un intérêt croissant dans les domaines des nanotechnologies, de la biologie et de la pharmaceutique. En effet, les peptides sont faciles à synthétiser, ils sont généralement biocompatibles et leur séquence est modifiable pour leur donner les propriétés chimiques souhaitées. L'ensemble de ces propriétés font des peptides, des blocs de construction adaptés pour diverses applications biotechnologiques.

Les peptides utilisés dans différents domaines des biotechnologies peuvent être conçus en imitant des séquences naturelles ou en utilisant des stratégies de novo comme c'est le cas pour les peptides LAH4. Des études récentes ont permis de concevoir des assemblages peptidiques adoptant différentes morphologies supramoléculaires telles que des nanotubes, des sphères, des vésicules ainsi que des fibrilles et des matrices d'hydrogel<sup>34</sup> (figure 5).

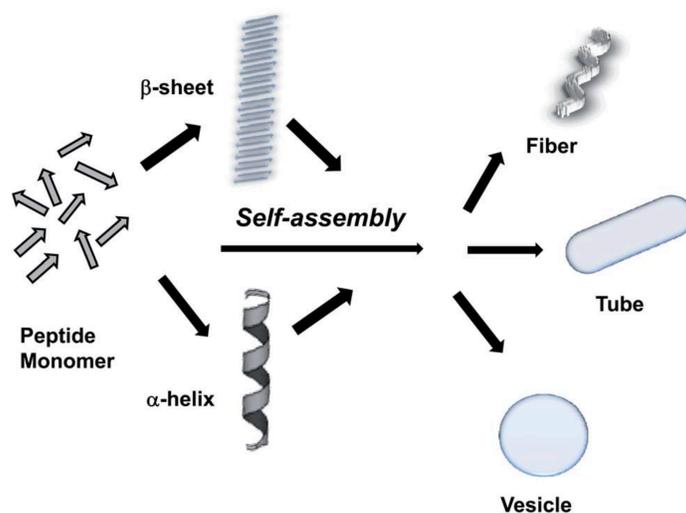


Figure 5 – Représentation schématique de l'assemblage de peptides en différentes nanostructures<sup>92</sup>

Il a été démontré que les modifications de la séquence primaire des peptides amènent à des changements dans la structure adoptée par les assemblages. En effet, la répartition des résidus hydrophobes et polaires dans les séquences primaires peut déterminer l'auto-assemblage<sup>66</sup>. Ainsi les répétitions de résidus hydrophobes et polaires de manières alternées peuvent produire des assemblages de peptides hélicoïdaux et amphiphiles avec une face présentant les

résidus hydrophobes et l'autre face présentant les résidus polaires. Altérer la répétition des résidus peut aussi permettre de produire des peptides adoptant des conformations en feuillets- $\beta$ . Lorsque les peptides sont dans des conformations  $\alpha$ -hélicoïdales, les résidus hydrophobes d'un côté interagissent les uns avec les autres, ce qui permet l'entrelacement de deux hélices ou plus<sup>92, 35</sup>.

## L'auto-assemblage des peptides LAH4

Les peptides de la famille LAH4 ont montré des propriétés biologiques de fusion avec les membranes plasmiques ainsi que des propriétés d'auto-assemblage<sup>108, 64, 58</sup>. L'agrégation des peptides de la famille LAH4 dépend fortement du pH ainsi que des ions composant le tampon dans lequel le peptide est solubilisé. L'augmentation du pH est associée à la déprotonation des histidines et à une plus grande propension aux interactions hydrophobes. Cette forte propension à l'agrégation du peptide Vectofusin-1 a également été observée par la formation d'un gel dans certaines conditions. La gélification a été observée pour un pH de 7,5 autour d'une concentration de 5 mg/mL dans un tampon acétate. Lorsque le pH ou la concentration est plus élevé, le gel gagne en rigidité. La formation du gel reste toutefois réversible en abaissant le pH<sup>117</sup>.

Pour la formation de fibres, de plus faibles concentrations de peptides sont utilisées. Le principal paramètre d'agrégation étant le pH, la première méthode qui a été utilisée est une augmentation lente du pH par dialyse. Le protocole de fibrillation des peptides Vectofusin-1, établi par la Dr. Wolf<sup>117</sup>, repose sur une dialyse de plusieurs jours pour augmenter progressivement le pH de la solution. Dans ce protocole, les peptides sont solubilisés à une concentration de 2 mg/ml dans l'eau et dialysés contre un tampon phosphate 10 mM à pH 6,2. Un boudin de dialyse de 500 à 1000 MWCO a été utilisé (Spectra/Por, Bioch CE) et le tampon a été échangé quatre fois pour une dialyse d'une durée d'environ 36-48h. Le boudin de dialyse a été lavé avec un tampon phosphate 10 mM à pH 6,2.

Les fibres ainsi formées peuvent alors être isolées par centrifugation pour la réalisation d'études structurales. Cependant, en utilisant ce protocole, le pourcentage de fibrillation reste inférieur à 30% nécessitant ainsi une grande quantité de temps ainsi que de matériel pour être mis en oeuvre.

Un second protocole a été mis au point par la Dr. Morane Lointier<sup>58</sup>. Dans ce protocole, 1mg de peptide lyophilisé dans un microtube est dissous à une concentration finale de 10mM

dans 50% d'éthanol. L'échantillon est ensuite mis au bain de sonication durant 5 minutes avant d'être dilué à une concentration de 0,5mM dans un tampon de fibrillation 10mM de phosphate ce qui débute le processus d'auto-assemblage. L'échantillon est ensuite incubé durant 48h à une température de 21°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432. Les fibres ainsi formées sont centrifugées durant 10 minutes à 10 000g avant d'être lavées avec le tampon de fibrillation afin de retirer de l'échantillon tout peptide n'ayant pas formé de fibrilles.

## Exemples d'applications d'assemblages de peptides en biotechnologies

Les polymères sont depuis peu utilisés en tant que transporteurs macromoléculaires capables de surmonter les barrières de transport qui limitent l'administration de médicaments aux tumeurs. Ces polymères sont généralement de grandes molécules hydrophiles liées à un agent thérapeutique. Ces conjugués peuvent cibler les tumeurs de manière passive ou active. Ces transporteurs macromoléculaires ont une demi-vie plasmatique plus longue, présentent une toxicité réduite, conservent une activité contre plusieurs lignées cellulaires résistantes aux médicaments et augmentent la solubilité des médicaments peu solubles dans l'eau<sup>22</sup>.

Les progrès récents dans la conception de polymères à base de peptides ont conduit à l'utilisation de polypeptides comme vecteurs pour les traitements anticancéreux. L'utilisation de polypeptides présente plusieurs avantages intrinsèques par rapport aux polymères synthétiques. En effet, les polypeptides composés d'acides aminés naturels sont susceptibles de conserver leur biocompatibilité tout au long du processus de dégradation, en se décomposant en métabolites excrétés par les voies métaboliques normales. De plus, le contrôle sur la séquence peptidique permet de jouer sur les propriétés des acides aminés qui contrôlent la pharmacocinétique, le transport, la biodistribution et la dégradation du médicament. Enfin, les polypeptides amphiphiles peuvent être utilisés pour encapsuler des médicaments dans des structures auto-assemblées telles que des micelles et des vésicules similaires à celles fabriquées à partir de polymères synthétiques<sup>16</sup>.

Une autre technologie qui a récemment vu le jour est l'utilisation d'Elastin Like Polypeptides (ELP). Les propriétés thermosensibles des ELP en font une classe de polypeptides intéressante pour l'administration de médicaments. Les ELP étant des macromolécules, elles sont utiles en tant que vecteurs pour le ciblage passif. De plus, il a été démontré que certains ELP ont une capacité de transition de solubilité *in vivo* à des températures comprises entre 37°C, la température corporelle, et 42°C, la température cliniquement autorisée pour le traitement par hyperthermie<sup>75</sup>.

Les micelles polymériques ont récemment fait l'objet d'études en tant que vecteurs potentiels de médicaments hydrophobes ou d'acides nucléiques. Ces nanostructures auto-assemblées sont fabriquées à partir de copolymères à blocs amphiphiles constitués de deux blocs de polarité différente. Cette différence entraîne la formation de structures micellaires en solution aqueuse, le bloc hydrophobe de chaque monomère se répartissant dans le coeur hydrophobe et le bloc hydrophile formant la tête. D'autres différences physiques entre les blocs, notamment la charge, peuvent influencer la formation ou la destruction des nanoparticules. Le noyau hydrophobe peut être utilisé pour encapsuler des composés hydrophobes et augmenter leur solubilité dans un environnement aqueux. Les micelles polymériques ont généralement une concentration micellaire critique inférieure à celle des micelles de tensioactifs, ce qui permet l'auto-assemblage à des concentrations pertinentes pour l'administration de médicaments<sup>47</sup>.

La RetroNectine est un fragment de fibronectine recombinant couramment utilisé dans les applications de thérapie génique et de culture cellulaire pour améliorer l'efficacité de la transduction des vecteurs viraux. La RetroNectine est dérivée de la fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire. Elle se compose de trois domaines clés, un domaine de liaison à l'héparine, une région CS-1 contenant le site de liaison pour le récepteur VLA-4 ( $\alpha4\beta1$  intégrine) à la surface des cellules ainsi qu'une séquence RGD se liant au récepteur VLA-5 ( $\alpha5\beta1$  intégrine) à la surface des cellules. La RetroNectine facilite la liaison et la colocalisation des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux avec les cellules cibles, ce qui améliore considérablement l'efficacité du transfert de gènes. Le fragment de fibronectine établit un pont entre les particules virales et les cellules cibles en se liant simultanément aux intégrines de la surface cellulaire et aux particules rétrovirales<sup>55, 63</sup>.

Dans le cadre de notre étude, c'est l'utilisation d'assemblages peptidiques pour l'amélioration de l'administration d'acides nucléiques dans le cadre de thérapies géniques qui nous intéresse particulièrement. L'approche qui nous intéresse consiste à assembler des peptides de la famille LAH4 en fibrilles qui seront ensuite associées à des particules virales en tant qu'adjuvant, permettant ainsi un meilleur transport transmembranaire de la cargaison d'acide nucléique d'une manière similaire à celle de la RetroNectine. Il a été démontré que de telles fibrilles facilitent la fusion entre les membranes virales et cellulaires. Les nanofibrilles obtenues à partir de peptides auto-assemblés représentent donc une nouvelle classe d'amplificateurs de transduction. En outre, ces nanofibrilles se sont révélées efficaces dans la transduction avec une faible cytotoxicité<sup>119, 72</sup>.

## 1.2 Thérapie génique

La thérapie génique est un domaine de la médecine dont le principe repose sur l'utilisation d'acides nucléiques (ADN ou ARN) pour traiter différentes pathologies. Originellement utilisées pour le traitement de maladies monogéniques, les évolutions réalisées dans le domaine au cours des vingt dernières années, tant au niveau technologique que des connaissances, ont permis d'étendre le champ d'action de la thérapie génique à d'autres maladies incluant certains cancers.

Le principe de la thérapie génique est de traiter une pathologie en faisant entrer une séquence d'acides nucléiques dans une cellule cible. Selon le type de maladie que l'on cherche à traiter, cette action aboutit à l'administration d'un gène fonctionnel qui remplace ou supplémente un gène défectueux ou manquant<sup>30, 31, 2</sup>.

Les acides nucléiques sont des molécules anioniques, ils sont de ce fait incapables de rentrer dans une cellule par eux-mêmes et nécessitent d'être transportés au sein de la cellule par un vecteur afin d'être exprimés ou intégrés au génome<sup>46</sup>.

### Vecteurs utilisés en thérapie génique

Afin de transporter des acides nucléiques de l'extérieur vers l'intérieur des cellules cibles dans le cadre de la thérapie génique, la stratégie la plus couramment utilisée est l'utilisation de virus.

Plusieurs types viraux différents ont ainsi été utilisés en tant que vecteurs. Les premières stratégies utilisées reposaient sur l'utilisation des virus atténués en ne conservant que les gènes qui ont pour fonction de délivrer du matériel génétique. Plus récemment, des approches utilisant différents types de virus modifiés, incluant les rétrovirus, les adénovirus ou encore les virus associés à l'adénovirus ont été développées avec plus de succès. Cependant, l'utilisation de ce type de virus peut provoquer des réactions immunitaires contre la capsidie ou le transgène et ainsi s'avérer délétère pour le patient<sup>97</sup>. C'est pourquoi, de nouvelles méthodes pour augmenter la furtivité du système et limiter les réactions immunitaires ont été mises au point<sup>101</sup>.

Les différents types de vecteurs viraux qui permettent de faire entrer une séquence d'acides nucléiques au sein d'une cellule hôte peuvent assurer une expression stable dans

le temps ou non selon le type de virus employé. Lorsque l'effet thérapeutique recherché peut être obtenu par l'expression d'un gène unique dans un tissu post-mitotique, les systèmes de vecteurs non intégratifs au génome de la cellule tels que les virus associés à l'adénovirus sont privilégiés. Ces virus peuvent être injectés directement dans le tissu à traiter : on dira alors que le traitement est réalisé *in vivo*<sup>46</sup> (figure 6).

Au contraire, lorsqu'il s'agit de traiter des cellules souches avec une expression stable dans le temps du gène apporté, il faut utiliser un vecteur capable de réaliser une intégration de la séquence au génome de la cellule hôte : le traitement privilégié dans ce cas de figure est l'utilisation de rétrovirus. Les protocoles actuels pour réaliser ce type de traitements comprennent l'isolation de cellules souches provenant du patient, suivi de leur modification génétique en dehors du corps et de leur réintroduction ultérieure dans le patient sous forme de greffe autologue. On parlera alors de thérapie génique *ex vivo*<sup>46</sup> (figure 6).

Ce type de traitement réduit le risque d'effets indésirables, puisqu'il est moins susceptible de déclencher la réponse immunitaire et élimine le risque de toxicité due à l'expression du gène thérapeutique dans des organes non ciblés. Parmi les vecteurs permettant ce type de thérapies, on peut citer les lentivirus, dérivés de virus humains comme le VIH mais rendus inoffensifs<sup>89, 31</sup>.

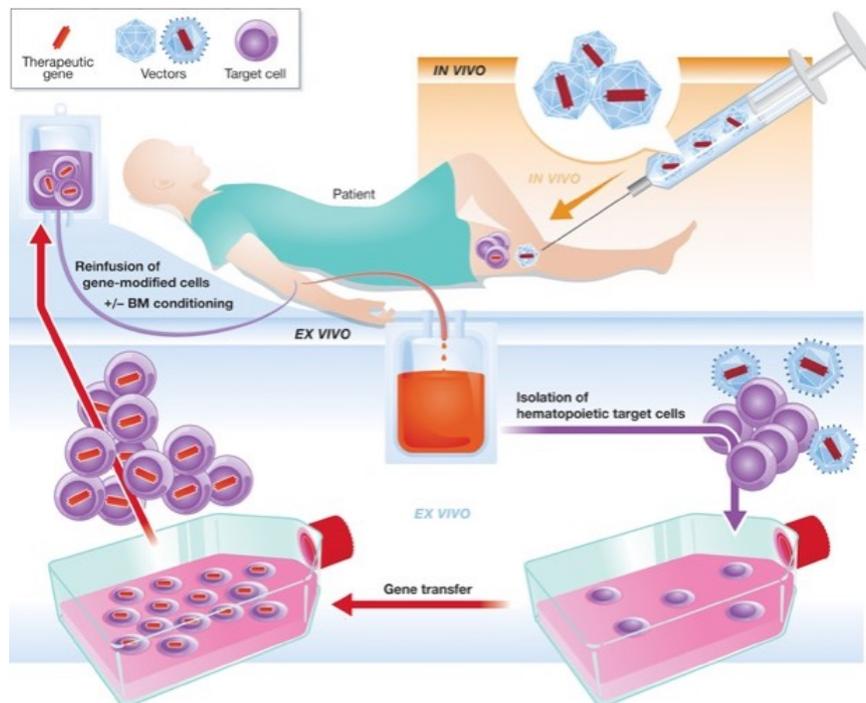


Figure 6 – Schéma résumant les différentes méthodes de thérapie génique *in vivo* dans l'encadré orange et *ex vivo* dans l'encadré bleu (figure adaptée de<sup>46</sup>).

### 1.2.1 Thérapie génique lentivirale

Les vecteurs lentiviraux présentent un avantage par rapport aux autres vecteurs de thérapie génique car ils offrent la possibilité de délivrer des gènes à des cellules non divisées, qui sont souvent difficiles à cibler avec d'autres vecteurs de thérapie génique<sup>46</sup>.

Les vecteurs lentiviraux sont des vecteurs intégratifs, c'est à dire qu'ils insèrent le gène thérapeutique dans le génome de la cellule cible, ce qui permet une expression stable et à long terme du gène. Le gène thérapeutique est généralement inséré dans le génome viral et transmis aux cellules cibles à l'aide d'un virus modifié qui a été rendu inoffensif<sup>2</sup>.

Le transfert de matériel d'acide nucléique dans les cellules par l'intermédiaire d'un vecteur viral est appelé transduction (figure 7).

Les particules du vecteur lentiviral sont obtenues par l'assemblage des produits d'expression de différents plasmides, dont un plasmide codant pour la glycoprotéine d'enveloppe (responsable de la spécificité du type de cellule cible) et un autre portant la séquence qui doit être transmise à la cellule. Nous proposons un mécanisme hypothétique de transduction dans la figure 7. Dans ce mécanisme, les peptides forment un complexe avec les vecteurs viraux et interagissent ensuite avec les lipides de la membrane cellulaire. Une fois que le complexe adhère à la membrane, les peptides vont perturber la membrane eucaryote, facilitant ainsi l'entrée des vecteurs lentiviraux dans les cellules cibles.

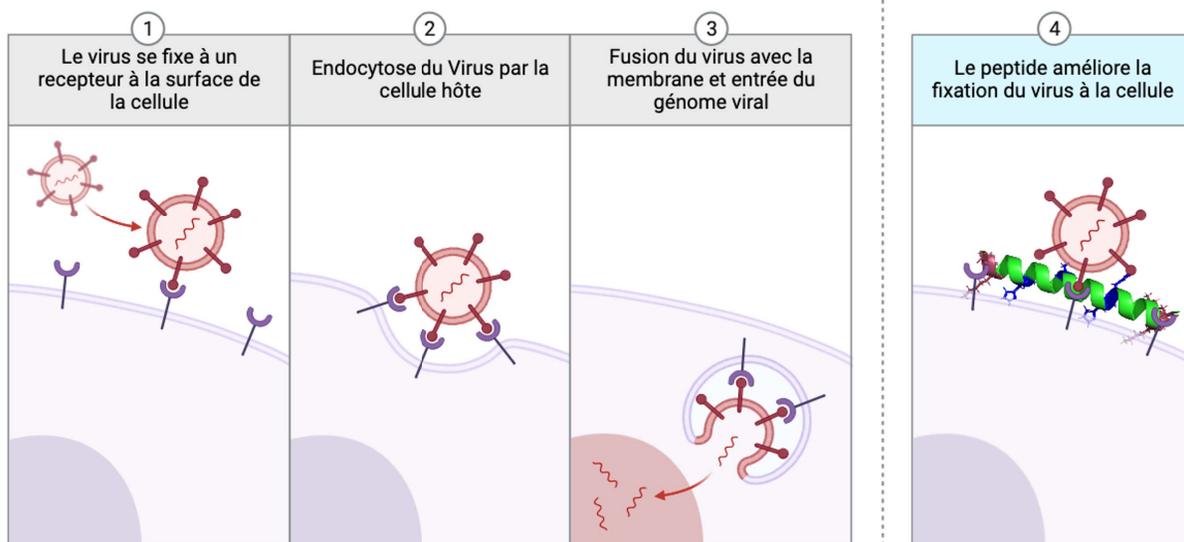


Figure 7 – Représentation du mécanisme hypothétique de transduction.

Les vecteurs lentiviraux ont été utilisés dans des essais cliniques pour le traitement de diverses maladies génétiques, y compris les immunodéficiences primaires et les maladies métaboliques héréditaires. Dans certains cas, la thérapie génique lentivirale s'est révélée bénéfique à long terme, comme dans le cas de patients atteints de déficit immunitaire combiné sévère<sup>89</sup>.

Cependant, l'efficacité, la sécurité et le coût de la thérapie génique par lentivirus pourraient être améliorés en renforçant les niveaux de transduction des cellules cibles et en réduisant la quantité de lentivirus utilisée sur les cellules.

## 1.2.2 L'utilisation d'adjuvants en thérapie génique

La définition d'un adjuvant dépend du champ de la médecine dans lequel ils sont utilisés. En immunologie, les adjuvants sont des substances non antigéniques ajoutées aux vaccins ou à d'autres agents thérapeutiques pour renforcer la réponse immunitaire de l'organisme. D'une manière plus générale, en médecine, un adjuvant est une substance qui facilite l'accomplissement d'un processus thérapeutique, en renforçant certaines propriétés du principe actif, ou en ajoutant de nouvelles propriétés.

Dans le cadre de la thérapie génique, l'utilisation d'adjuvants a été mise au point pour différentes approches.

L'une des approches consiste à utiliser certains adjuvants pour renforcer la réponse immunitaire au gène thérapeutique, en particulier dans le contexte de la thérapie génique du cancer. Dans cette approche, le gène thérapeutique est conçu pour produire un antigène tumoral ou une autre molécule immunostimulante, qui peut déclencher une réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses. Des adjuvants peuvent être ajoutés à la thérapie génique pour renforcer la réponse immunitaire et améliorer l'efficacité thérapeutique<sup>46,30</sup>.

Une autre approche consiste à utiliser des adjuvants pour renforcer la réponse immunitaire au vecteur viral lui-même, ce qui peut contribuer à améliorer l'efficacité du transfert de gènes et la durabilité de l'expression génétique. Des études ont montré que l'ajout de l'adjuvant CpG aux vecteurs lentiviraux peut renforcer la réponse immunitaire au vecteur et augmenter la durée de l'expression du transgène<sup>80</sup>. C'est sur cette approche que nous nous focaliserons au cours de ce chapitre.

Bien que l'utilisation d'adjuvants dans la thérapie génique lentivirale en soit encore au stade expérimental, les premiers résultats suggèrent que cette approche pourrait être une stratégie prometteuse pour améliorer la réponse immunitaire et l'efficacité thérapeutique de la thérapie génique lentivirale<sup>64</sup>.

Actuellement, divers adjuvants sont utilisés en thérapie génique lentivirale, le mécanisme d'action de ces additifs cationiques est principalement basé sur leur capacités à neutraliser les charges membranaires et à favoriser l'agrégation des vecteurs lentiviraux.

On peut ainsi noter l'utilisation de certains polymères cationiques comme le polybrène<sup>107</sup>, le DEAE-Dextran<sup>110</sup>, ainsi que le LentiBOOST qui un copolymère thermosensible, constitués de deux blocs de polyoxyde d'éthylène hydrophile et d'un bloc de polyoxyde de propylène

hydrophobe. Il a été démontré que le LentiBOOST utilisé en conjonction avec le polybrène permet d'obtenir des taux de transduction élevés pour des types de cellules cliniquement pertinents. Le LentiBOOST a ainsi fait l'objet de plusieurs essais cliniques aux États-Unis et en Europe, jusqu'à la phase 3 où il s'est montré sûr et cliniquement efficace<sup>106</sup>.

On peut aussi citer l'utilisation de lipides cationiques telles que la lipofectine<sup>43</sup> et la lipofectamine<sup>42</sup> qui ont montré la capacité de faciliter l'infection par des rétrovirus de cellules dépourvues du récepteur viral homologue, dans des conditions où d'autres adjuvants tels que le polybrène sont inefficace<sup>43</sup>.

Enfin, l'approche qui nous intéresse le plus dans le cadre de ces travaux est l'utilisation de peptides cationiques. Par exemple, le sulfate de protamine, un peptide cationique usuellement utilisé pour inhiber l'action anticoagulante de l'héparine utilisée lors de certaines opérations chirurgicales. Ce peptide a montré une amélioration de la transduction de cellules de fibroblaste par plusieurs types rétroviraux avec une activité proche celle du polybrène<sup>17</sup>. Enfin, il a été montré que des fragments naturels de la prostatic acidic phosphatase, une enzyme présente de manière abondante dans le sperme, forment des fibrilles amyloïdes. Ces fibrilles, appelées Semen-derived Enhancer of Virus Infection (SEVI), capturent les virions du VIH et favorisent leur attachement aux cellules cibles, augmentant ainsi le titre viral infectieux de plusieurs ordres de grandeur<sup>88</sup>.

Or, il a été montré que le peptide Vectofusin-1 qui possède une activité biologique d'amélioration de transduction virale<sup>26</sup> est capable de former des fibrilles<sup>108</sup>. Nous avons donc cherché au cours de ces travaux à déterminer l'impact de l'assemblage du peptide Vectofusin-1 sur son activité en tant qu'adjuvant pour la thérapie génique.

## 1.3 Etude sur la corrélation entre assemblage des peptides LAH4 et activité de transduction

### 1.3.1 Mise en contexte

Le peptide Vectofusin-1 ou LAH4-A4 est un peptide amphipathique cationique qui a été décrit comme étant un adjuvant améliorant la transduction virale dans le cadre d'une collaboration entre notre équipe avec l'ART-TG (Accélérateur de Recherches Technologiques en Thérapie Génomique) dirigé par la Dr. Anne Galy.

En effet, l'utilisation de Vectofusin-1 sous sa forme monomérique en tant qu'adjuvant augmente de manière significative l'efficacité de transduction de divers lentivirus<sup>64</sup>.

Bien qu'il ait été démontré que le peptide adopte une structure  $\alpha$ -hélicoïdale lors de l'auto-assemblage, peu d'informations ont été découvertes sur les structures tertiaires et quaternaires adoptées par ces auto-assemblages<sup>108</sup>.

C'est pourquoi dans ce manuscrit, nous nous intéressons aux conditions qui conduisent à l'auto-assemblage de ces fibrilles peptidiques ainsi qu'aux relations entre la structure et les fonctions de ces assemblages.

Il a été montré que dans les milieux de culture, le peptide Vectofusin-1 forme rapidement des complexes de l'ordre de 10nm qui s'assemblent ensuite en nanofibrilles. Ces assemblages sont capables de s'associer avec des particules virales, permettant de les récupérer facilement pour une interaction optimale virus-cellule. Concernant leur structure, des tests de fluorescence à la thioflavine T ainsi que des expériences de dichroïsme circulaire et de spectroscopie infrarouge ont indiqué que ces fibrilles possèdent une structure  $\alpha$ -hélicoïdale<sup>108</sup>.

Cette dernière information nous intéresse tout particulièrement car la plupart des autres amplificateurs de transduction virale forment des fibrilles  $\beta$ -amyloïdes<sup>31</sup>.

Il a été observé que la formation de fibrilles est réversible, ce qui présente des avantages considérables pour la manipulation du peptide dans des conditions bien adaptées aux bonnes pratiques de fabrication et aux protocoles de thérapie génique évolutifs.

Ainsi, notre objectif a été de tester l'impact de l'auto-assemblage des peptides de la famille LAH4 sur leur activité biologique d'amélioration de transduction virale dans les conditions

de thérapie génique ex-vivo.

## **Interaction peptides/milieux de culture et fibres/milieux de culture**

L'étude des interactions entre les biomolécules et leur environnement est essentielle pour comprendre les mécanismes fondamentaux qui entrent en jeu dans les processus biologiques.

Dans le cadre des stratégies de thérapie génique ex-vivo, des cellules sont prélevées dans le corps d'un patient, modifiées génétiquement en dehors du corps (ex-vivo), puis réintroduites dans le corps de celui-ci.

L'étape de modification génétique des cellules est réalisée par transduction des cellules par des vecteurs viraux tels que les vecteurs lentiviraux. Ces vecteurs intègrent le gène thérapeutique dans le génome de la cellule hôte, ce qui permet une expression stable du gène. C'est durant cette étape que les peptides peuvent être utilisés en tant qu'adjuvant afin d'améliorer le passage des particules virales dans la cellule cible et ainsi la transduction virale.

Lors de ce processus, les peptides se retrouvent ainsi en contact avec le milieu de culture utilisé pour la croissance des cellules. Le milieu de culture est une solution complexe utilisée pour favoriser la croissance et le maintien des cellules in vitro. Il fournit les nutriments essentiels et les facteurs de croissance dont les cellules ont besoin pour croître, proliférer et fonctionner. La composition du milieu de culture peut varier en fonction du type de cellules cultivées et des exigences spécifiques du protocole expérimental mais est en général composé de sels minéraux, de vitamines, d'acides aminés, de sucres, et des facteurs de croissance, chacun ayant le potentiel d'interagir avec les peptides. Ces interactions pourraient affecter la solubilité ou la structure des peptides, influençant ainsi leur activité biologique.

Nous avons donc voulu déterminer quels sont les effets du milieu de culture cellulaire sur l'assemblage des peptides de la famille LAH4.

Les fibrilles de peptides préformées pourraient aussi interagir différemment avec les composants du milieu de culture par rapport aux peptides monomériques, ce qui pourrait influencer leur agrégation et différentes propriétés comme leur toxicité et leur activité biologique.

Nous avons donc cherché à déterminer la présence et la nature des interactions entre les peptides et les milieux de culture ainsi qu'entre les fibrilles de peptides et ces mêmes milieux

afin de mieux comprendre comment les conditions environnementales peuvent moduler les propriétés des peptides et de leurs agrégats. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes techniques biochimiques et biophysiques.

## **Détermination d'interactions par électrophorèse**

La première technique que nous avons utilisé est le SDS-PAGE. Le SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est une technique couramment utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Cette méthode peut également être employée pour étudier les interactions entre biomolécules. Ici, nous avons cherché à déterminer si les fibrilles de peptides et les agrégats formés par l'ajout de peptides monomériques aux milieux de culture pouvaient retenir certaines protéines présentes dans les milieux de culture.

Ensuite, afin d'explorer les effets des milieux de culture sur l'organisation structurale des peptides, nous avons employé la microscopie électronique à transmission (TEM). En incubant dans différents milieux de culture les peptides monomériques ainsi que des fibrilles préformées en tampon phosphate, nous avons cherché à déterminer si des structures organisées peuvent se former au contact des milieux de cultures ainsi que leur effet sur la stabilité des assemblages des peptides.

## **Test Elisa P24**

Les lentivirus qui sont une sous-famille des rétrovirus, possèdent des propriétés chimiques distinctes qui leur confèrent une grande efficacité et polyvalence en tant que vecteurs de transfert de gènes. Les lentivirus sont enveloppés d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte. Cette enveloppe lipidique contient les glycoprotéines qui permettent la reconnaissance et la liaison aux récepteurs cellulaires spécifiques et la fusion avec la membrane cellulaire. À l'intérieur du virion, les protéines de la capsid forment une structure qui protège le génome viral.

Pour évaluer les propriétés de capture des vecteurs viraux par les peptides, nous avons utilisé un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Cette technique sensible et spécifique nous a permis de quantifier l'interaction entre les peptides et les vecteurs viraux dans différentes conditions. Nous avons incubé des vecteurs viraux avec des peptides sous

forme monomérique et fibrillaire pour déterminer l'efficacité de capture de chaque configuration. Après l'incubation, les échantillons ont été transférés sur des plaques ELISA. En utilisant des anticorps spécifiques et un substrat chromogène, nous avons détecté et mesuré la quantité de vecteurs viraux capturés par les peptides. Les anticorps utilisés sont spécifiques de la protéine p24 qui est une protéine de la capsid virale.

## **Tests de viabilité cellulaire**

Dans le cadre de l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité potentielle des peptides pour des applications thérapeutiques, nous avons mené des tests de toxicité comparant les assemblages de peptides à leurs formes monomériques. Ces tests ont été effectués en utilisant des cultures cellulaires, où les cellules ont été exposées à différentes concentrations de peptides monomériques et de leurs assemblages. Ces analyses nous ont permis de comparer les effets cytotoxiques des peptides selon leur état d'agrégation.

## **Tests de transduction**

Afin d'évaluer l'efficacité de l'utilisation des fibrilles de peptides en tant qu'adjuvants pour la transduction virale, nous avons mené une série de tests de transduction sur deux lignées cellulaires distinctes : HTC-116, une lignée de cellules de carcinome colorectal humain, et JURKAT, une lignée de cellules de leucémie lymphoblastique T. Ces deux modèles cellulaires ont été choisis en raison de leurs caractéristiques biologiques spécifiques et de leur pertinence pour les applications cliniques potentielles.

Dans le cadre de ces expériences, les cellules ont été exposées à des vecteurs viraux en présence soit de peptides monomériques, soit de leurs assemblages fibrillaires. Le pseudotype lentiviral que nous avons utilisé est VSV-G-LV, ce vecteur est utilisé dans la plupart des applications cliniques actuelles de thérapie génique impliquant des cellules souches humaines lymphoblastiques car il permet d'utiliser des protocoles robustes de production et purification du virus<sup>74</sup>.

Cette approche comparative a permis de distinguer les effets des différentes conformations des peptides sur l'efficacité de la transduction virale. Pour quantifier cette efficacité, nous avons utilisé la cytométrie en flux, une technique spectroscopique permettant de mesurer l'expression d'un gène rapporteur introduit par les vecteurs viraux. Les résultats obtenus

nous ont permis de comparer directement l'influence des peptides monomériques et fibrillaires sur la transduction virale.

### **1.3.2 Matériel et méthode**

#### **Assemblage des peptides LAH4**

Un milligramme de peptide lyophilisé dans un microtube a été dissous à une concentration finale de 10 mM dans 50% d'éthanol. L'échantillon a ensuite été mis au bain de sonication pendant 5 minutes avant d'être dilué à une concentration de 0,5 mM dans un tampon de fibrillation (tampon phosphate 10mM à pH 7,5), initiant ainsi le processus d'auto-assemblage. L'échantillon a ensuite été incubé pendant 48 heures à une température de 21°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432. Les fibres ainsi formées ont été centrifugées pendant 10 minutes à 10 000g avant d'être lavées avec le tampon de fibrillation afin de retirer de l'échantillon tout peptide n'ayant pas fibrillé.

#### **Interaction peptides-milieus de culture**

Les peptides sous forme monomérique ou fibrillaire ont été resuspendus à une concentration de 0,5 mM dans les milieux de culture DMEM, RPMI et X-VIVO et mis à incuber durant 6h à 37°C. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 10000g durant 10 minutes. Les culots peptidiques obtenus ont été lavés avec le tampon de fibrillation (tampon phosphate 10mM à pH 7,5) puis ont été solubilisés dans de l'eau pure. Un tampon de charge a été ajouté aux solutions obtenues qui ont ensuite été déposées sur gel SDS-PAGE.

#### **Electrophorèse sur gel SDS-PAGE**

Les gels utilisés ont été réalisés en suivant le protocole décrit par H.Schägger<sup>103</sup>. Nous avons utilisé un système de séparation en gel SDS composé de 3 parties avec des pourcentages différents en acrylamide/bis-acrylamide : gel à 4% pour la partie où les dépôts sont réalisés, 10% pour la moitié haute et 16% pour la moitié basse du gel afin d'obtenir une meilleure séparation des composés durant l'électrophorèse. Enfin, nous avons choisi la coloration au bleu de coomassie comme méthode de coloration. La migration a été effectuée à 90V durant 30 minutes puis à 150V jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

Des contrôles ont été réalisés en déposant des fractions contenant les milieux seuls et les peptides seuls.

### **Microscopie électronique à transmission**

20 $\mu$ L de chaque échantillon a été déposé sur une grille formvar (CFT200-Cu, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, United States) après 2 minutes, l'échantillon est retiré de la grille à l'aide d'un papier buvard puis la grille est laissée à sécher à l'air libre durant 30 minutes. Les grilles sont ensuite rincées abondamment à l'eau ultrapure afin de retirer les sels du tampon de fibrillation. Les images de MET ont été collectées en utilisant un microscope Hitachi H7500 Electron microscope à 80 KeV.

### **Tests Elisa P24**

Le titre de la la protéine de capsid p24 du VIH-1 a été déterminée à l'aide d'un kit ELISA commercial (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Les vecteurs viraux, contenant la protéine de capsid p24 du VIH-1, ont été préparés à une concentration de 5.10<sup>7</sup> Ig/mL et mis en contact avec les peptides monomériques ou fibrillaires à une concentration de 12ng/mL. Les échantillons ont été incubés durant 1h ou 6h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu DMEM complété par 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur. Les échantillons ont ensuite été centrifugé à 13000g durant 10 minutes, les surnageants ont été séparés des culots et les culots isolés ont été resuspendus dans un volume équivalent d'H<sub>2</sub>O afin de désassembler les fibres et ainsi libérer les vecteurs viraux. L'ensemble des échantillons ont alors été transférés dans des plaques ELISA de 96 puits.

Les plaques ont été lavées plusieurs fois avec du PBS (tampon phosphate salin) pour éliminer les éléments non liés. L'anticorps primaire spécifique à la protéine p24, puis l'anticorps secondaire couplé à une enzyme, ont été ajoutés successivement aux puits et incubés. Après chaque étape d'incubation, les plaques ont été lavées avec du PBS.

Un substrat chromogène, l'orthophénylènediamine, a ensuite été ajouté aux puits pour détecter la présence de l'enzyme liée aux anticorps secondaires, produisant une réaction colorimétrique proportionnelle à la quantité de vecteurs viraux capturés. La réaction a été arrêtée en ajoutant une solution d'arrêt, et l'intensité de la couleur développée a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA.

## Tests de viabilité

Les cellules HTC-116 et JURKAT ont été cultivées à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu DMEM complété par 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur jusqu'à atteindre une confluence de 70-80%. Les cellules ont ensuite été mises en contact avec les adjuvants durant 6h. Les cellules adhérentes HTC-116, ont été détachées par utilisation de trypsine. Les cellules en suspension JURKAT, ont été recueillies par centrifugation. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS afin d'éliminer tout résidu de milieu de culture ou de trypsine.

Une suspension cellulaire uniforme a été préparée en resuspendant les cellules dans du milieu de culture frais. Ensuite, un volume égal de solution de bleu trypan à 0,4% a été ajouté à la suspension cellulaire avant homogénéisation. La solution a été mise à incuber durant 5 minutes pour permettre la pénétration du colorant dans les cellules mortes.

Après l'incubation, une goutte de la suspension cellulaire colorée a été placée sur une lame de microscope ou dans une chambre de comptage (hémocytomètre). Les cellules ont été observées sous un microscope inversé, où les cellules vivantes apparaissaient non colorées et les cellules mortes apparaissaient en bleu. Les cellules vivantes et mortes ont été comptées dans plusieurs champs de vision pour assurer une estimation représentative. La viabilité cellulaire a été calculée en utilisant la formule suivante : Viabilité cellulaire (%) = (Nombre de cellules vivantes / Nombre total de cellules (vivantes + mortes)) x 100.

## Tests de transduction

Les cellules HTC-116 et JURKAT ont été cultivées à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu DMEM complété par 10 % de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur jusqu'à atteindre une confluence de 70-80%. Les cellules adhérentes HTC-116, ont été détachées par utilisation de trypsine. Les cellules en suspension JURKAT, ont été recueilli par centrifugation.

Les milieux de cultures contenant les cellules ont ensuite été supplémentés par des peptides sous forme monomérique ou fibrillaire à des concentrations de 6 ou 12 ng/mL ou de polyblène à une concentration de 8 ng/mL en présence de vecteur lentiviral VSVG contenant la séquence de la GFP à des concentrations de 0,5.10<sup>6</sup>, 1.10<sup>6</sup> ou 5.10<sup>6</sup> Ig/mL.

Les cellules ont ensuite été incubées pendant 6 heures à 37°C à 5% de CO<sub>2</sub>. Après cette

période d'incubation, le milieu contenant les vecteurs viraux a été remplacé par du milieu frais afin d'éliminer tout vecteur viral et peptide résiduel. Les cellules ont été incubées pendant une période supplémentaire de 48 heures pour permettre l'expression de la protéine rapportrice GFP (Green Fluorescent Protein). Les cellules ont été collectées, lavées et resuspendues dans du PBS.

La transduction a été évaluée en analysant les titres infectieux déterminés par l'intensité de fluorescence de la GFP mesurée par cytométrie en flux (FACSCalibur ; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

### **1.3.3 Résultats et discussion**

#### **Interaction peptides milieux de culture et fibres milieux de culture**

Lors de l'incubation des peptides sous forme monomérique, une agrégation notable a été observée. Après isolation et solubilisation de ces agrégats en milieux RPMI et X-VIVO, l'analyse par SDS-PAGE (figure 8) a révélé que des protéines de poids moléculaire apparent d'environ 40kDa sont présentes dans les dépôts correspondant aux peptides monomères incubés avec le milieu (dépôt 1 à 3; 6 à 8) et majoritaires dans le dépôt milieu seul (dépôt 5 et 9) mais absentes du dépôt peptide seul (dépôt 1), indiquant que ces protéines ont été retenues lors de l'incubation avec les peptides.

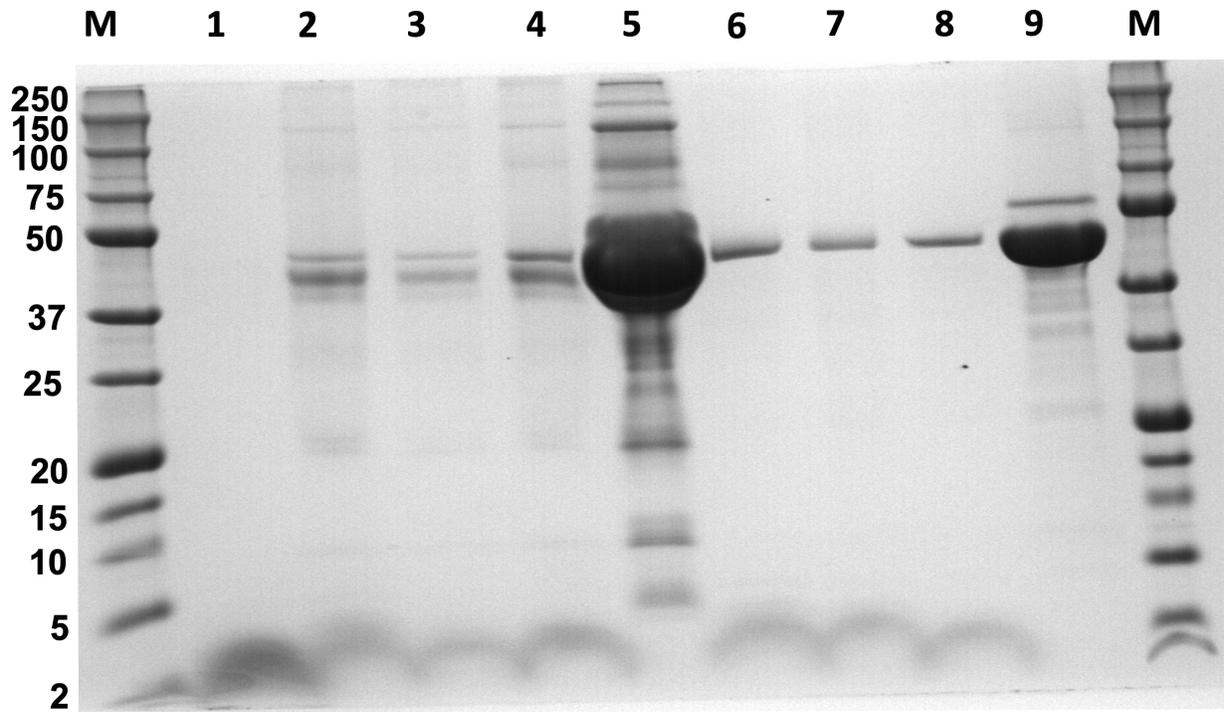


Figure 8 – Gel SDS-PAGE des tests d’interaction peptides monomériques/milieus de culture. M : marqueur de taille ; 1 : Vectofusin-1 pure ; 2 : LAH4 + RPMI ; 3 : LAH4-L1 + RPMI ; 4 : Vectofusin-1 + RPMI ; 5 : milieu RPMI ; 6 : LAH4 + X-VIVO ; 7 : LAH4-L1 + X-VIVO ; 8 : Vectofusin-1 + X-VIVO ; 9 : milieu X-VIVO

Un résultat similaire a été observé lorsque l’expérience a été réitérée avec des fibrilles préformées en tampon phosphate (figure 8).

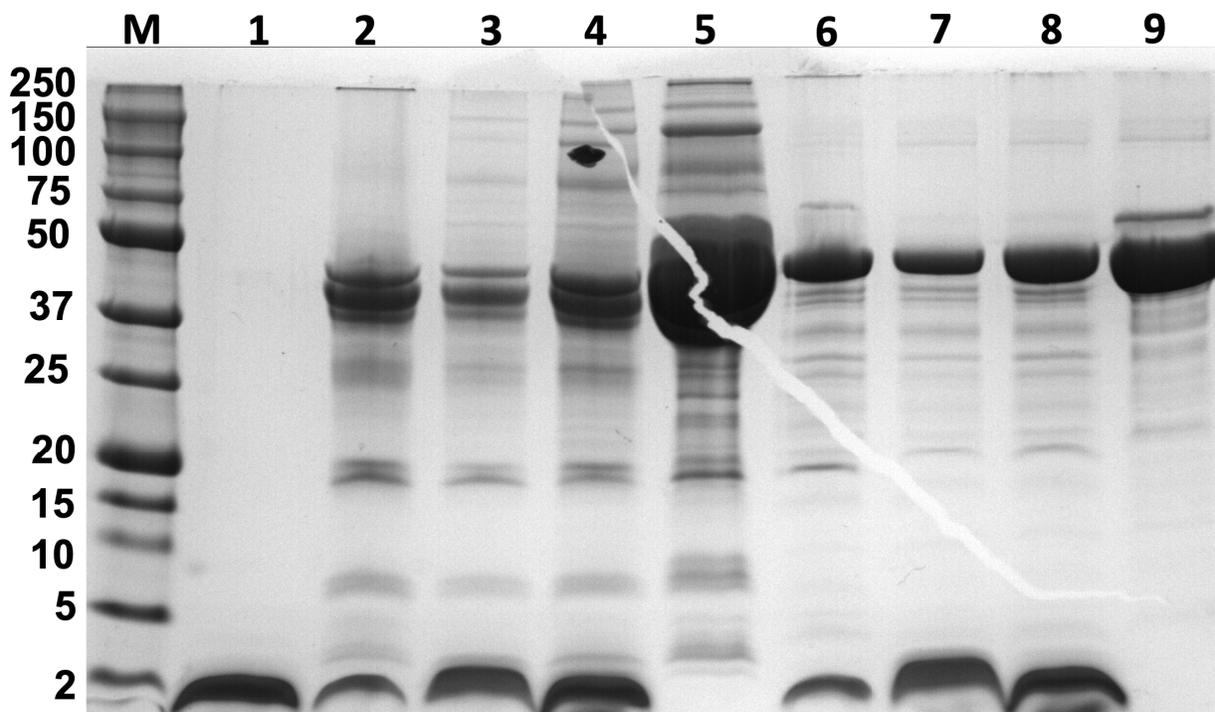


Figure 9 – Gel SDS-PAGE des tests d’interaction peptides fibrillaires/milieus de culture. M : marqueur de taille; 1 : Vectofusin-1 pure; 2 : LAH4 + RPMI; 3 : LAH4-L1 + RPMI; 4 : Vectofusin-1 + RPMI; 5 : milieu RPMI; 6 : LAH4 + X-VIVO; 7 : LAH4-L1 + X-VIVO; 8 : Vectofusin-1 + X-VIVO; 9 : milieu X-VIVO

Ces observations indiquent que les peptides monomériques ainsi que les fibrilles ont la capacité de s’associer avec les protéines des milieux de culture via des interactions non spécifiques qui sont susceptibles d’influer sur l’activité biologiques des peptides.

### Microscopie électronique à transmission

Lorsque les peptides ont été introduits dans les milieux de culture DMEM et RPMI, une agrégation notable a été observée. Cependant, les résultats obtenus par microscopie électronique à transmission ont révélé que cette agrégation ne semblait pas prendre la forme de fibrilles bien définies. Les images de TEM (figure 10) montrent des structures amorphes et irrégulières, contrastant avec les fibrilles allongées et structurées que l’on observe en tampon phosphate.

Ces résultats suggèrent que, bien que les peptides aient tendance à s’agréger dans ces

milieux, les conditions ne favorisent pas la formation de fibrilles structurées, ce qui pourrait avoir des implications significatives pour leur fonction et leur efficacité en tant qu'adjuvants dans la transduction virale.

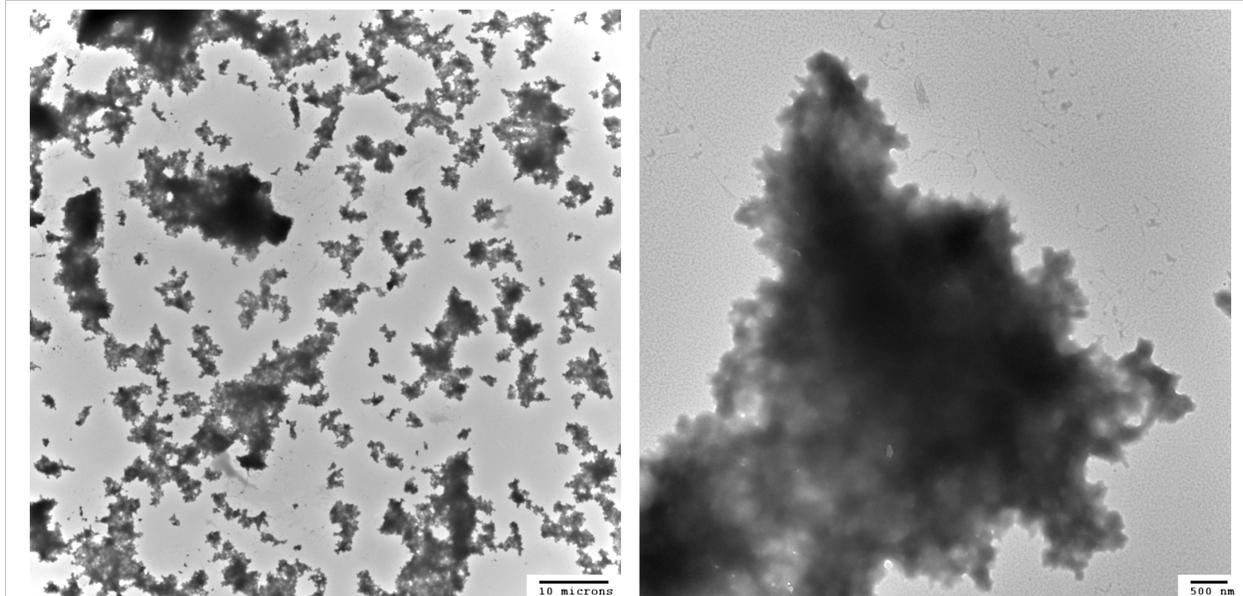


Figure 10 – Images de microscopie électronique à transmission du peptide Vectofusin-1 ajouté sous forme monomérique au milieu de culture RPMI. magnification : A. 2000x ; B. 20000x

Les observations par TEM ont également révélé un contraste marqué entre la configuration adoptée par les peptides monomériques et les fibrilles préformées dans du tampon phosphate (figure 11). Contrairement aux peptides monomériques introduits directement dans les milieux de culture DMEM et RPMI, les fibrilles qui ont été préalablement formées dans du tampon phosphate sont restées stables et ont conservé leur structure fibrillaire dans ce tampon même après 7 jours d'incubation. Sur les images de TEM, on peut observer que les fibrilles restent bien définies et homogènes, indiquant que le tampon phosphate fournit un environnement favorable à la stabilité et à la conservation de la structure des fibrilles.

Ces résultats soulignent l'importance du choix du milieu pour l'auto-assemblage et la stabilité des fibrilles de peptides, suggérant que le tampon phosphate pourrait être plus approprié pour obtenir la conformation fibrillaire des peptides dans des applications biotechnologiques.

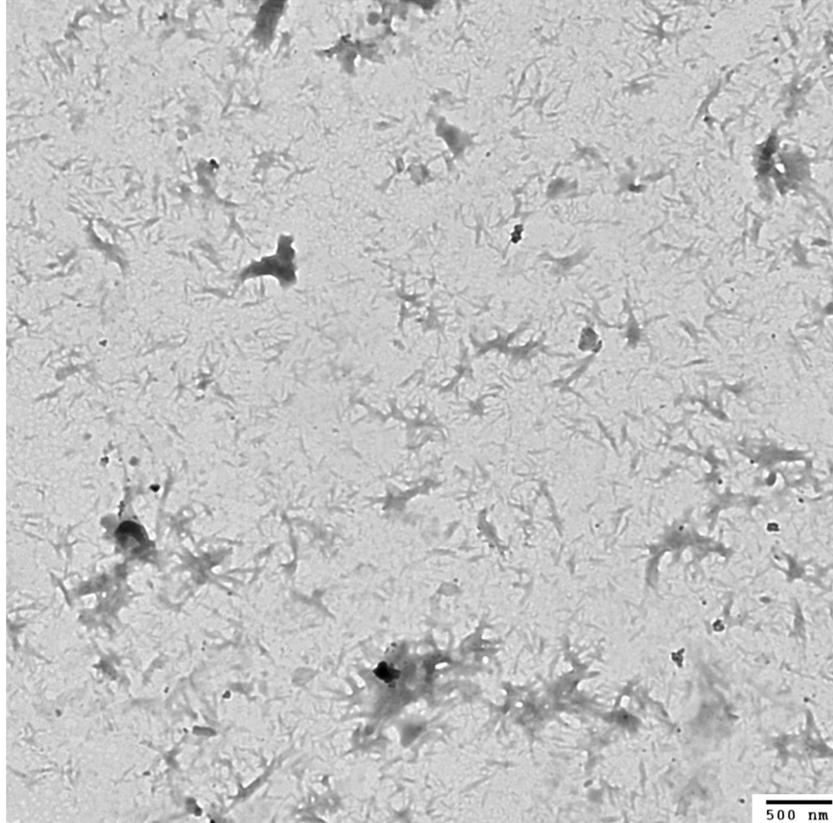


Figure 11 – Image de microscopie électronique à transmission de fibrilles de peptide Vectofusin-1 ajoutées au milieu de culture RPMI. magnification : 25000x

Il serait donc intéressant d'évaluer la différence d'activité d'amélioration de la transduction entre les peptides monomériques ajoutés directement au milieu de culture et les fibrilles préformées en tampon phosphate puis introduites dans le milieu de culture. Cette comparaison pourrait fournir des informations cruciales sur l'impact de la conformation des peptides sur leur efficacité en tant qu'adjuvants pour la transduction virale. Les résultats obtenus pourraient guider le développement de stratégies optimisées pour l'utilisation des peptides dans des applications thérapeutiques et expérimentales, en maximisant leur potentiel d'amélioration de la transduction virale.

## Tests de viabilité cellulaire

L'impact sur la viabilité cellulaire lors de l'ajout dans le milieu de culture de trois peptides de la famille LAH4 sous forme monomérique ou sous forme de fibrilles a été testé pour une mise en contact avec les adjuvants durant 6h, durée habituelle des expériences de transduction virale. La figure 12 présente les résultats du comptage au bleu trypan. On peut observer pour les deux lignées cellulaires que l'ensemble des peptides quelle que soit leur conformation, monomérique ou fibrillaire, induisent une mortalité inférieure à 10%. Ces résultats concordent avec les résultats publiés précédemment par notre équipe<sup>64</sup>. L'assemblage des peptides en fibrilles ne semble donc pas modifier la toxicité des peptides de la famille LAH4 envers les cellules humaines.

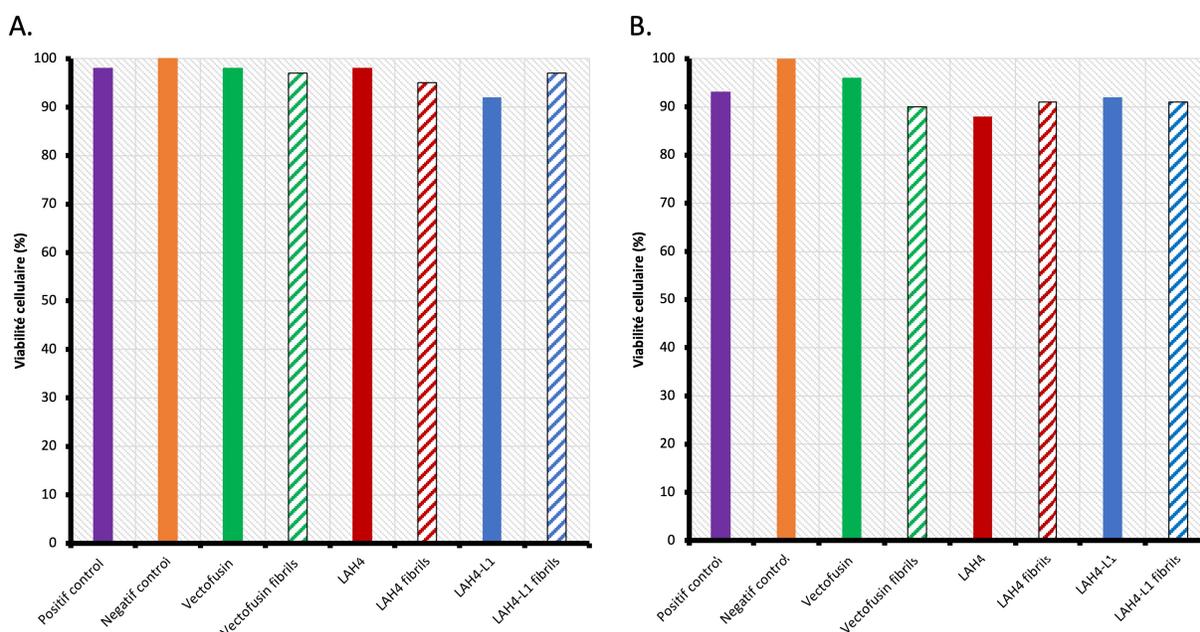


Figure 12 – Viabilité cellulaire après comptages au bleu trypan pour les lignées cellulaires A. HTC116 B. JURKAT

## Test Elisa P24

Cette approche nous a permis de comparer directement les capacités de capture des peptides en fonction de leur état structural, fournissant ainsi des informations sur l'influence de la conformation des peptides sur leur interaction avec les vecteurs viraux.

La figure 13 montre l'analyse des fractions par test ELISA. On peut y observer pour

chaque peptide, la proportion de vecteur quantifié dans le culot et le surnageant pour chaque échantillon. La présence de vecteur dans la fraction culot indique alors que le vecteur viral était en interaction avec le peptide et a été "pull down" par la centrifugation. Au contraire, la présence de vecteur dans la fraction surnageant indique que le vecteur viral est libre dans le milieu de culture.

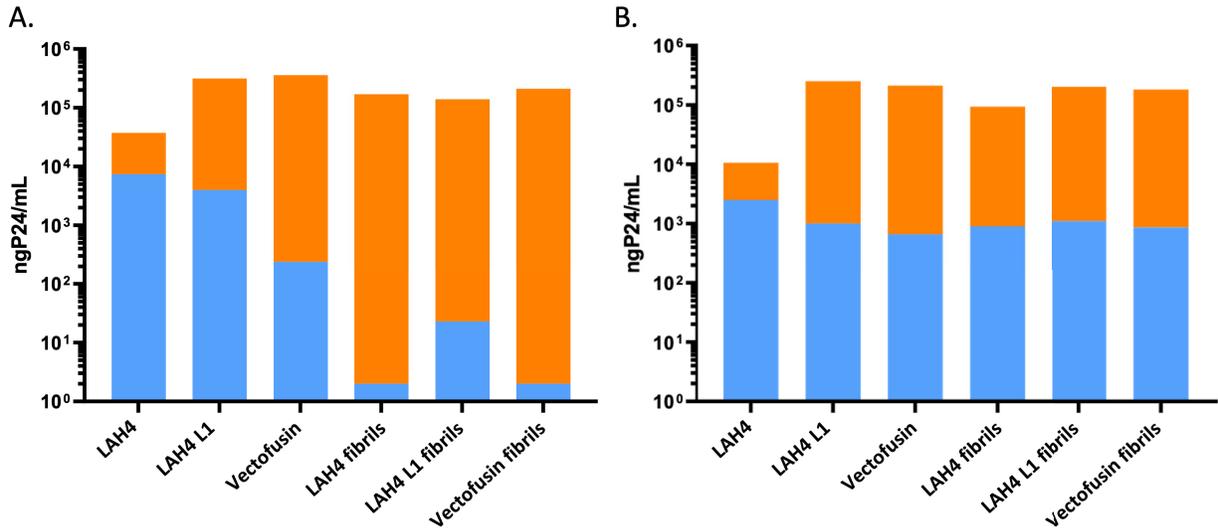


Figure 13 – Résultats de la lecture de plaque ELISA A. 1h d'incubation peptide-vecteur B. 6h d'incubation peptide-vecteur. La partie orange correspond à la fraction culot et la partie bleue à la fraction surnageant.

On peut ainsi observer sur la figure 13 A. que le vecteur viral ne s'accroche pas dans les mêmes proportions aux différents peptides testés dans la première heure d'incubation. Les peptides qui montrent alors la meilleure capacité à fixer les vecteurs sont la vectofusin-1 sous forme fibrillaire et le peptide LAH4 sous forme fibrillaire, présentant tous deux une capacité similaire. En revanche, le LAH4-L1 fixe les vecteurs moins efficacement que les deux autres peptides.

De plus, il est observable, que chaque peptide sous forme fibrillaire présente une capacité de capture des vecteurs viraux bien supérieure à leur homologue sous forme monomériques.

Ces résultats indiquent que la conformation fibrillaire des peptides améliore significativement leur capacité à interagir avec les vecteurs viraux, soulignant l'importance de la structure dans l'efficacité de capture des vecteurs. La différence d'interaction observable entre les différents peptides est potentiellement due aux différences de répartition des histidines au sein

de la séquence<sup>60</sup> et à la répartition des charges apparentes lorsque le peptide est sous forme fibrillaire.

En revanche, après 6h d'incubation, 13 B. nous avons observé que la quantité de vecteurs capturés par les fibrilles des peptides diminue et devient équivalente à celle des peptides monomériques. Cette observation suggère qu'un relargage des vecteurs viraux par les fibrilles se produit au fil du temps. Ainsi, ces résultats nous conduisent à conclure que, bien que les peptides sous forme fibrillaire capturent initialement plus efficacement les vecteurs viraux que les peptides monomériques, cette interaction n'est donc pas permanente.

Le relargage observé pourrait avoir des implications importantes pour l'utilisation des peptides fibrillaires dans des applications thérapeutiques, nécessitant une évaluation plus approfondie de la stabilité des complexes peptide-vecteur sur des périodes prolongées. En effet, la durée de 6h utilisée lors de cette expérience correspond à la durée de mise en contact entre les vecteurs viraux et les cellules cibles dans la stratégie de thérapie génique utilisant des lentivirus.

## **Tests de transduction**

Les figures 14 et 15 présentent des exemples de données brutes obtenues par cytométrie en flux.

La cytométrie en flux est une technique permettant d'analyser les caractéristiques de cellules en suspension. Les cellules en suspension sont injectées dans l'appareil de cytométrie où elles vont passer une par une devant un faisceau laser. Lorsqu'elles passent devant le faisceau laser, les cellules diffusent la lumière, produisant deux types de signaux : la diffusion de la lumière vers l'avant (FSC pour forward scatter), qui indique la taille de la cellule, et la diffusion de la lumière latérale (SSC pour side scatter), qui indique la granularité de la cellule. Si les cellules sont marquées avec des fluorochromes, ceux-ci sont excités par le laser et émettent de la lumière à des longueurs d'onde spécifiques. La lumière émise est captée par des détecteurs, permettant de mesurer la présence et l'intensité des fluorochromes.

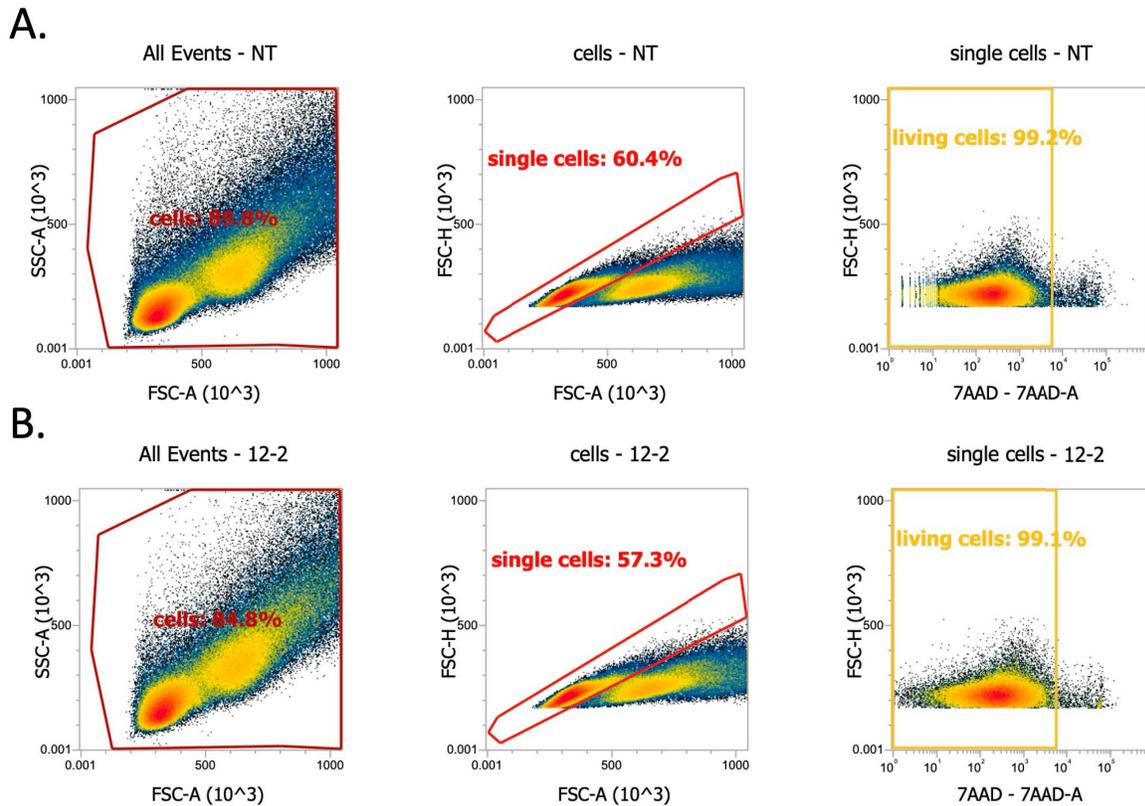


Figure 14 – Exemple de données brutes obtenues par cytométrie en flux. A. Cellules HTC-116 non traitées B. Cellules HTC-116 traitées avec le vecteur lentiviral VSVG contenant la séquence de la GFP à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  Ig/mL et 12 ng/mL de fibrilles de Vectofusin-1.

Sur la figure 14, le premier graphique est une représentation de la diffusion vers l'avant (SSC-A) par rapport à la diffusion latérale (SSC-A). Cette représentation est utilisée pour identifier les cellules d'intérêt en fonction de leur taille et de leur granularité. Dans notre cas, les échantillons ne contiennent qu'un seul type cellulaire et peu de débris.

Le second graphique représente l'intensité de diffusion vers l'avant (FSC-H) par rapport à la surface de diffusion vers l'avant (FSC-A). Cette représentation est utilisée pour exclure les doublets de cellules qui peuvent affecter de manière significative l'analyse et conduire à des conclusions inexactes.

Avant injection, les cellules ont été marquées avec la 7-aminoactinomycine D (7AAD) qui est un fluorochrome intercalant de l'ADN qui est utilisé pour marquer les cellules vivantes. Le troisième graphique représente l'intensité de fluorescence de 7AAD par rapport à l'intensité

de diffusion vers l'avant (FSC-H). Cette représentation permet de sélectionner les cellules vivantes pour effectuer les autres détections.

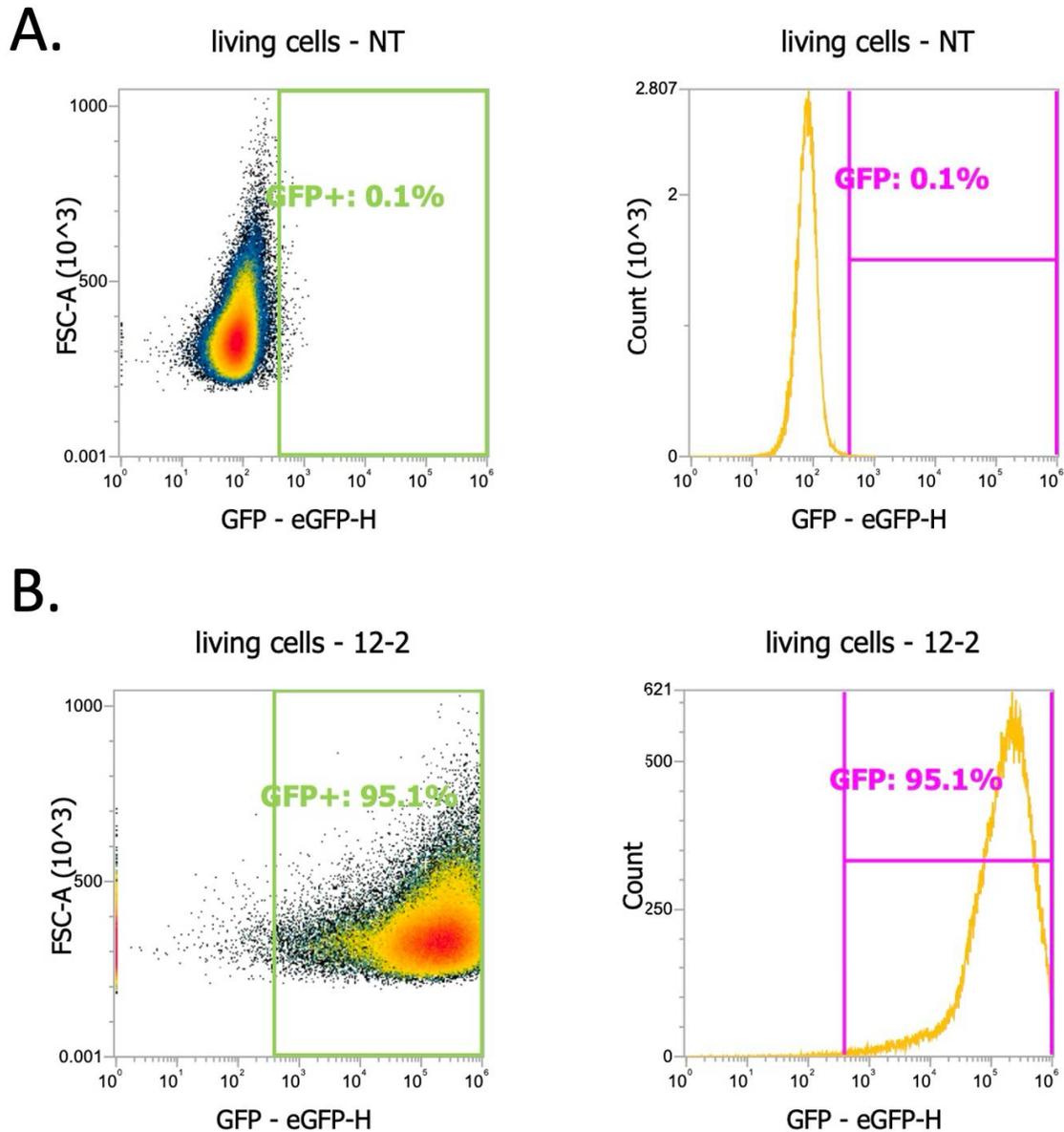


Figure 15 – Exemple de données brutes obtenues par cytométrie en flux. A. Cellules HTC-116 non traitées B. Cellules HTC-116 traitées avec le vecteur lentiviral VSVG contenant la séquence de la GFP à une concentration de  $5 \cdot 10^6$  Ig/mL et 12 ng/mL de fibrilles de Vectofusin-1

La figure 15 quant à elle montre les résultats de détection de fluorescence du gène rappor-

teur utilisé durant l'expérience de transduction. Le premier graphique est une représentation de la fluorescence de GFP par rapport à la surface de diffusion vers l'avant (FSC-A). Cette représentation permet de déterminer le pourcentage de cellules exprimant le gène de la GFP. On peut voir pour les cellules non traitées (figure 15A.) qu'il n'y a pas de détection de GFP alors qu'au contraire, pour les cellules traitées avec l'utilisation de peptide comme adjuvant (figure 15B.), la fluorescence de GFP est détectée dans les cellules.

Le second graphique quant à lui représente l'intensité de fluorescence de la GFP. La GFP étant utilisée comme gène rapporteur, son expression est directement proportionnelle à l'efficacité de la transduction virale.

Les figures 16, 17, 18 et 19 résument les résultats de la mesure d'intensité de fluorescence de la GFP par cytométrie en flux pour les souches HTC-116 et JURKAT.

La figure 16 présente l'ensemble des données de transduction des cellules HTC-116 pour toutes les concentrations de vecteur VSVG.

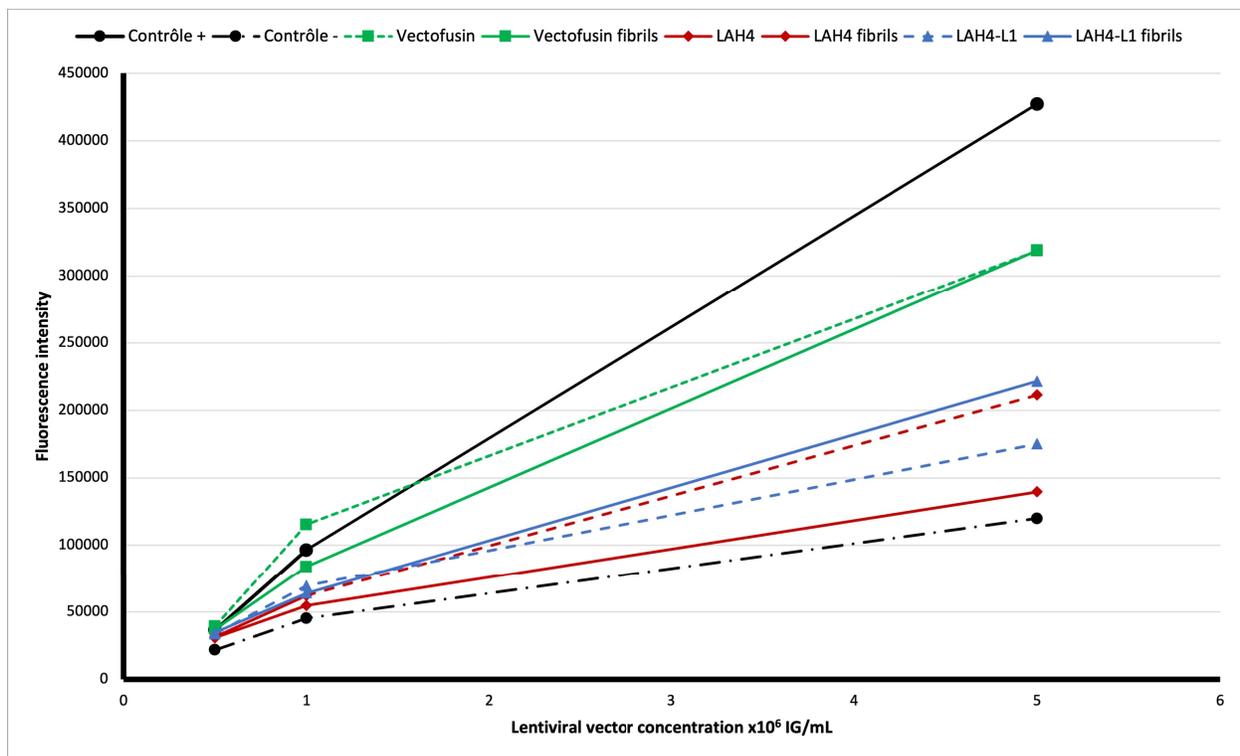


Figure 16 – Résultats des mesures d'intensité de fluorescence de la GFP par cytométrie en flux pour les cellules HTC-116 ; Contrôle + : polybrène, Contrôle - : vecteur sans adjuvant.

Afin de faciliter la lecture des données, la figure 17 présente uniquement les résultats

des tests de transduction des cellules HTC116 utilisant une concentration de vecteurs viraux VSVG de  $5.10^6$  Ig/mL permettant une meilleure démarcation des résultats. On peut observer dans le cas des cellules HTC-116 que pour l'ensemble des peptides testés, l'activité de transduction est améliorée par rapport au témoin négatif. L'activité de transduction est comparable entre les peptides monomériques et les fibrilles, indiquant que, dans ce contexte cellulaire, la conformation des peptides n'influence pas significativement l'efficacité de la transduction virale. L'activité de transduction lorsque les peptides sont utilisés comme adjuvant reste cependant inférieure à celle du témoin positif, c'est-à-dire la condition où le polybrene est utilisé comme adjuvant. On peut noter que les différences de résultats observées pour ce type cellulaire entre les différents peptides monomériques sont cohérentes avec les données obtenues précédemment par l'équipe<sup>59</sup>.

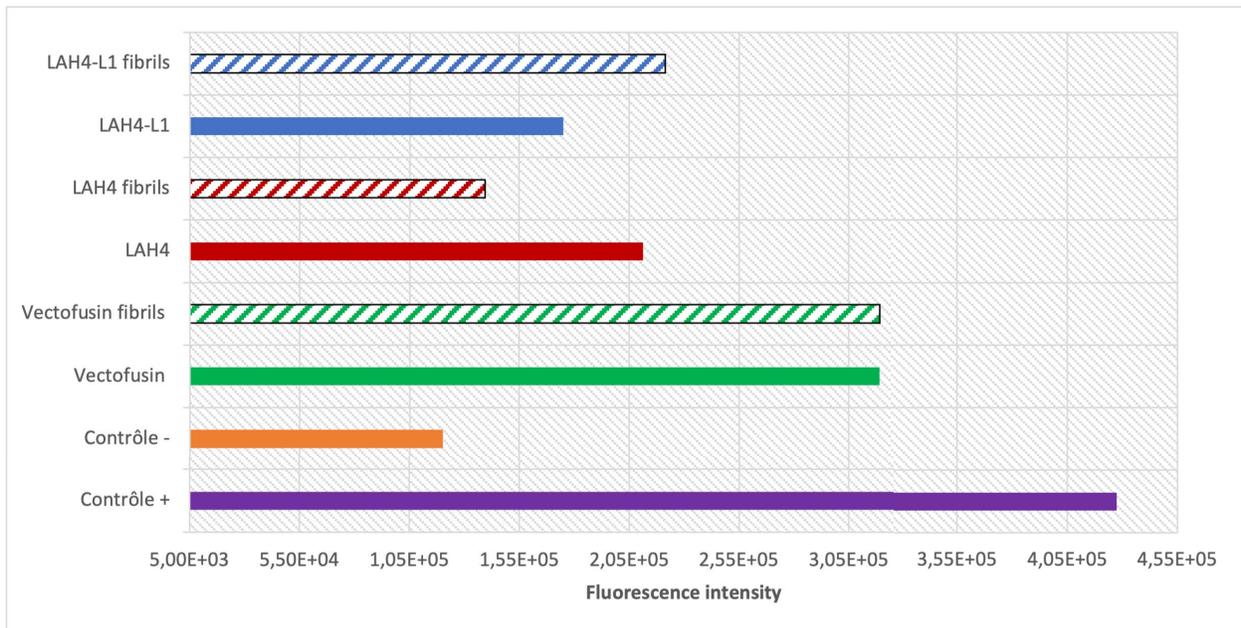


Figure 17 – Résultats des mesures d'intensité de fluorescence de la GFP par cytométrie en flux pour les cellules HTC-116 à une concentration de vecteurs viraux VSVG de  $5.10^6$  Ig/mL ; Contrôle + : polybrene, Contrôle - : vecteur sans adjuvant.

La figure 18 présente l'ensemble des données de transduction des cellules JURKAT pour toutes les concentrations de vecteur VSVG.

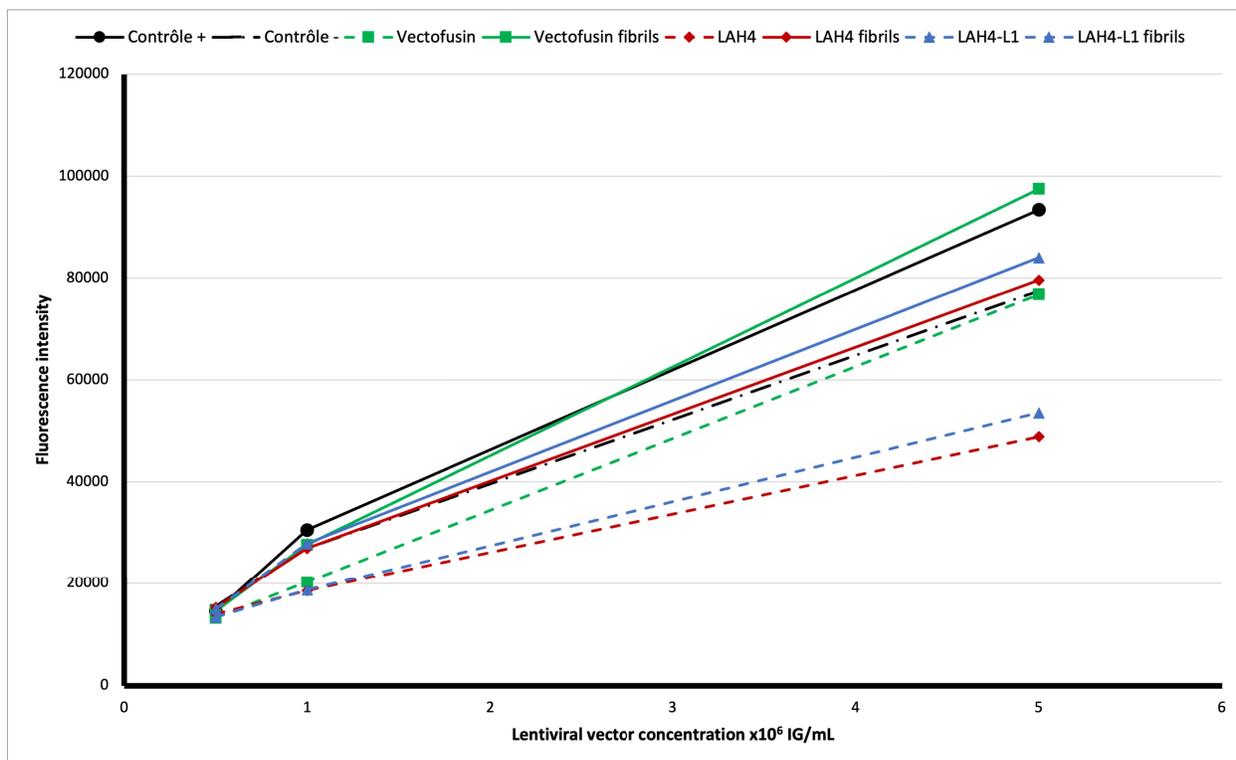


Figure 18 – Résultats des mesures d'intensité de fluorescence de la GFP par cytométrie en flux pour les cellules JURKAT ; Contrôle + : polybrène, Contrôle - : vecteur sans adjuvant.

Afin de faciliter la lecture des données, la figure 19 présente uniquement les résultats des tests de transduction des cellules JURKAT utilisant une concentration de vecteurs viraux VSVG de  $5 \cdot 10^6$  Ig/mL permettant une meilleure démarcation des résultats. Pour les cellules JURKAT, au contraire des cellules HTC-116, les fibrilles de peptides démontrent une activité de transduction nettement supérieure par rapport aux peptides monomériques qui eux ne montrent pas d'effet d'amélioration de transduction sur ce type cellulaire à de faibles concentrations de VSVG et semblent montrer une action d'inhibition à  $5 \cdot 10^6$  Ig/mL. Cette observation suggère que la structure fibrillaire des peptides peut faciliter l'interaction et l'entrée des vecteurs viraux dans les cellules JURKAT, améliorant ainsi l'efficacité de la transduction. On peut noter ici que l'augmentation de l'activité de transduction virale lorsque les fibrilles de Vectofusin-1 sont utilisées comme adjuvant est supérieure au contrôle positif et on pourrait donc en conclure que les fibrilles de Vectofusin-1 sont un meilleur adjuvant que le polybrène pour ce type cellulaire.

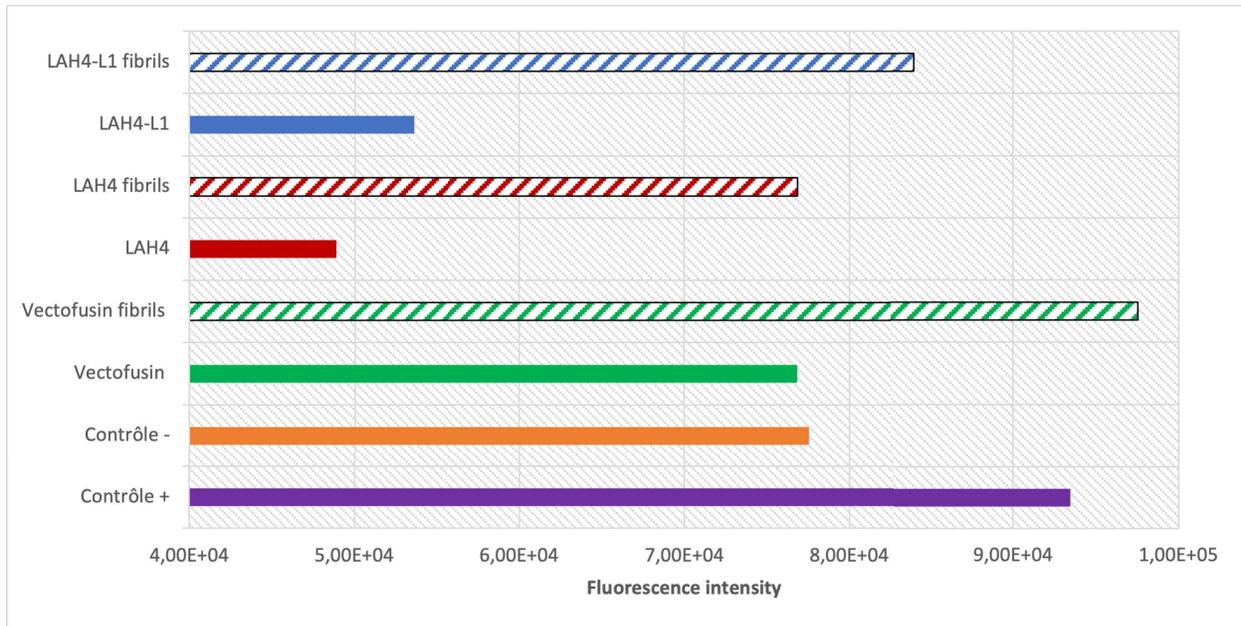


Figure 19 – Résultats des mesures d'intensité de fluorescence de la GFP par cytométrie en flux pour les cellules JURKAT à une concentration de vecteurs viraux VSVG de  $5.10^6$  Ig/mL ; Contrôle + : polybrène, Contrôle - : vecteur sans adjuvant.

Ces résultats mettent en lumière l'importance de la conformation des peptides dans leur activité biologique. On peut alors imaginer qu'à l'avenir, l'optimisation des stratégies de transduction virale, en particulier pour les applications thérapeutiques devra prendre en compte non seulement la séquence des peptides utilisés comme adjuvants, mais aussi leur état d'organisation, la stabilité de celui-ci dans le temps ainsi que les types de cellules spécifiquement ciblées. Pour cela, une étude plus poussées sur des échantillons issus de prélèvements de patients comme dans de précédents travaux de l'ART-TG<sup>64</sup> devra être réalisée.

Cependant, bien qu'il semble y avoir un lien évident entre l'assemblage supramoléculaire des peptides et leur fonction biologique, les mécanismes mis en jeu restent encore à élucider. Il est possible que des facteurs tels que la répartition des charges sur les peptides ou la taille des particules formées par les assemblages jouent un rôle crucial dans cette interaction. Pour avancer dans cette compréhension, notre objectif principal sera dans les prochains chapitres de ce travail d'obtenir des informations plus détaillées sur les assemblages des peptides et leur conformation. En approfondissant notre connaissance de ces structures, il nous sera alors possible d'orienter notre utilisation des peptides de la famille LAH4 afin d'obtenir une meilleure activité biologique dans le cadre de la thérapie génique.

## Chapitre 2

# Production d'échantillons pour l'étude structurale du peptide Vectofusin-1

Les études structurales des protéines jouent un rôle crucial dans la compréhension de leurs fonctions et des mécanismes biologiques. La précision et la fiabilité des résultats de ces études dépendent de la qualité des échantillons de protéines utilisés pour l'analyse. Plusieurs qualités essentielles sont indispensables pour garantir le succès des études structurales.

La vérification de l'identité de la protéine est fondamentale pour éviter d'étudier la mauvaise protéine ou un contaminant. Pour ce faire, la spectrométrie de masse et d'autres techniques analytiques telles que l'électrophorèse sur gel SDS-PAGE sont utilisées.

Une des principales qualités requises pour un échantillon de protéines est l'obtention d'une protéine pure. Les contaminants peuvent interférer avec la structure et la fonction de la protéine, ce qui entraîne des données inexactes et des interprétations erronées. De plus, un échantillon de protéines structuralement homogène est essentiel pour obtenir des résultats clairs et interprétables. Si une protéine existe sous plusieurs conformations ou états oligomériques, l'analyse se révèle souvent compliquée voire impossible selon les techniques utilisées.

La stabilité des protéines est une autre qualité essentielle pour la réussite des études structurales. Les protéines instables peuvent se dénaturer ou s'agréger au cours du processus expérimental, ce qui conduit à des résultats faussés. Une sélection minutieuse des conditions de formation de l'échantillon (tampons utilisés, température etc.) peut contribuer à maintenir la stabilité et l'intégrité de la protéine.

Une concentration adéquate en protéines est essentielle pour obtenir des données fiables, en particulier dans des techniques telles que la cristallographie aux rayons X ou la spectroscopie RMN. Une concentration insuffisante en protéines peut entraîner des signaux faibles, ce qui rend difficile la détermination précise de la structure de la protéine.

Ainsi, un échantillon de protéine hautement pure, homogène, stable et soluble, dont l'identité et l'activité sont connues, constitue une base solide pour une analyse structurale réussie. En outre, la compréhension de la taille de la protéine, de son état oligomérique et de ses modifications post-traductionnelles augmente encore les chances d'obtenir des informations structurales significatives.

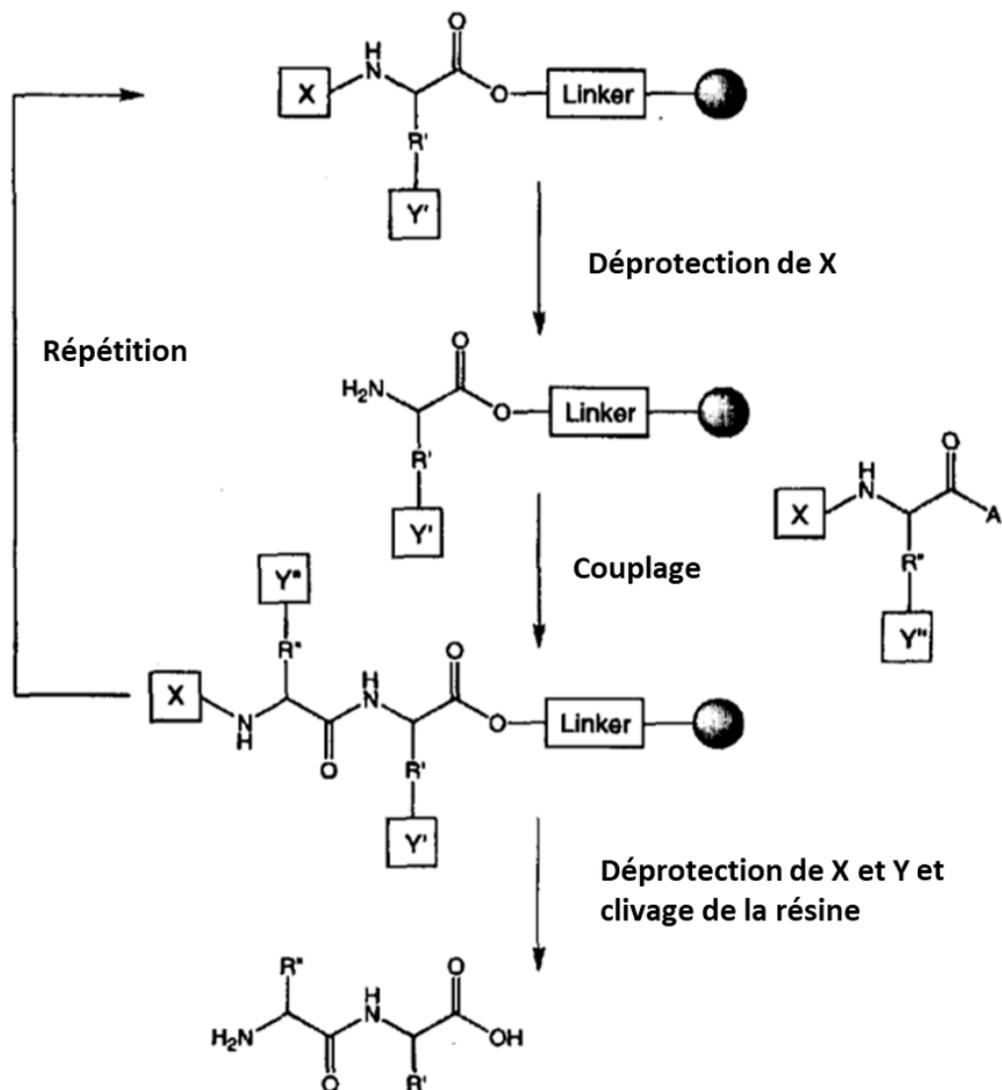
Les peptides sont de très courtes protéines. Les peptides peuvent être constitués au maximum de quelques dizaines d'acides aminés, tandis que les protéines peuvent en contenir quelques centaines voir milliers. Les protéines ont souvent des fonctions plus complexes et variées que les peptides en raison de leur taille et de leur structure plus grandes.

Il existe plusieurs méthodes pour obtenir des peptides et protéines en laboratoire. Les deux principales méthodes étant la synthèse chimique et l'extraction à partir de sources naturelles. La méthode d'obtention des protéines peut être plus difficile en raison de leur taille plus grande et de leur structure plus complexe.

## 2.1 Synthèse peptidique

La synthèse de peptides en phase solide (SPPS) est la méthode la plus utilisée pour la synthèse chimique de peptides. Elle a été introduite pour la première fois par Robert Bruce Merrifield au début des années 1960 et est devenue depuis une technique fondamentale dans le domaine de la chimie des peptides<sup>73</sup>. La SPPS permet l'assemblage progressif de peptides en attachant des acides aminés à un support solide, généralement une résine, et en effectuant la synthèse sur cette phase solide. Cette approche présente de nombreux avantages, notamment d'obtenir une grande pureté, une facilité de purification et la possibilité d'automatiser le processus pour une production de peptides à haut débit.

La synthèse commence par l'ancrage de l'extrémité C-terminale du dernier acide aminé de la séquence au support solide. Les supports solides couramment utilisés comprennent des billes de polystyrène, des résines de polyacrylamide ou des matériaux similaires avec des groupes fonctionnels adaptés à la synthèse de peptides. Les groupements amines terminaux des résidus sont protégés par un groupe protecteur amovible afin d'éviter les réactions non désirées à cet endroit pendant la synthèse. Le groupe protecteur couramment utilisé est le groupe Fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc). La protection des groupements des chaînes latérales tels que les amines des lysines se fait par l'intermédiaire d'un autre type de groupe protecteur comme le Boc. Une étape de déprotection permet d'enlever le groupe Fmoc tout en conservant les groupes protecteurs des chaînes latérales, permettant ainsi le couplage avec le résidu suivant. Cette étape est essentielle pour s'assurer que seul le lien peptidique souhaité est formé à chaque itération. Le résidu suivant est couplé à la chaîne croissante de peptides en faisant réagir son groupe carboxyle avec le groupe amine de l'acide aminé précédent attaché au support solide. Ce couplage est réalisé à l'aide d'un réactif de couplage, l'Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium (HBTU). Ces étapes de déprotection et de couplage sont répétées jusqu'à l'obtention de la séquence complète du peptide. Le peptide complet est alors clivé de la résine. Le déroulement de la synthèse peptidique est illustré dans la figure 20.



**X : Groupe protecteur amine**  
**Y : Groupe protecteur des chaînes latérales**  
**A : Groupe carboxyle activateur**

Figure 20 – Représentation schématique du principe de la SPPS. Adapté de<sup>10</sup>

L'utilisation d'acides aminés isotopiquement marqués <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N lors de la synthèse peptidique permet d'obtenir des peptides marqués à des positions spécifiques.

## 2.1.1 Synthèse des peptides LAH4

Les peptides LAH4 (KKALL ALALH HLAHL ALHLA LALKK A-NH<sub>2</sub>) ; LAH4L1 (KKALL AHALH LLALL ALHLA HALKK A-CONH<sub>2</sub> ) ; Vectofusin-1 (KKALL HAALA HLLAL AHLL ALLKK A-CONH<sub>2</sub>) d'une masse moléculaire de 2778,48 Da ont été préparés par synthèse chimique en phase solide, à l'aide d'un synthétiseur automatique de peptides Millipore 9050 (Eschborn, Allemagne) (figure 21). La synthèse a été effectuée sur une résine TentaGel-R-RAM (Rapp Polymer GmbH, Tubingen, Germany) en utilisant un excès de 4 fois d'acides aminés protégés par Fmoc (Cortecnet, Voisins les Bretonneux, France). Après clivage de la résine à l'acide trifluoroacétique (TFA), les peptides ont été purifiés par HPLC en phase inverse (Gilson, Villiers-le-Bel, France) en utilisant une colonne C18 préparative (Luna, C18-100 Å-5 μm, Phenomenex, Le Pecq, France), et l'élution des fractions a été suivie par absorption UV de la phase mobile à 214nm. Un gradient acétonitrile/H<sub>2</sub>O avec 0,1% constant de TFA a été utilisé comme phase mobile, le solvant A utilisé est composé de 10% d'acétonitrile et 0,1% de TFA, le solvant B composé de 99,9% d'acétonitrile et 0,1% de TFA. Le gradient commence à 35% d'acétonitrile et termine à 70% en 20 minutes. L'identité et la pureté du peptide au sein des fractions collectées a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-TOF Autoflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

	1	5	10	15	20	25	
LAH4	KKALL	ALALH	HLAHL	ALHLA	LALKK	A	
LAH4-L1	KKALL	AHALH	LLALL	ALHLA	HALKK	A	
LAH4-A4	KKALL	HAALA	HLLAL	AHLLL	ALLKK	A	

Figure 21 – Alignement de séquence des peptides LAH4 synthétisés. Tous les peptides possèdent la même composition en termes de résidus, leur donnant la même masse moléculaire de 2778,48 Da. Le principal facteur qui différencie ces peptides est la disposition des histidines au sein de la séquence<sup>58</sup>.

## 2.2 Surexpression du marqué $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1

Afin de pouvoir réaliser une étude poussée des fibres de la Vectofusin-1, il est nécessaire de disposer de peptides isotopiquement marqués  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  de manière uniforme pour pouvoir faire des études structurales par RMN. Jusqu'à présent, la production du peptide avait été réalisée par synthèse peptidique et permettait des études en abondance naturelle ou avec des marquages sélectifs seulement sur certains résidus car le marquage uniforme du peptide est trop onéreux par synthèse en phase solide.

Le marquage de protéines consiste à introduire des atomes marqués isotopiquement dans une protéine ou un peptide, afin d'étudier la structure, la dynamique et les interactions de la protéine à l'aide de la spectroscopie RMN. Le marquage isotopique peut être réalisé en faisant exprimer la protéine ou le peptide par un système recombinant qui peut être un organisme vivant ou un système in vitro dans un milieu contrôlé où les seules sources de carbone, d'azote ou de deutérium sont celles apportées au milieu sous formes de précurseurs enrichis en isotopes<sup>19</sup>. Les marquages isotopiques les plus couramment utilisés pour la spectroscopie RMN des protéines sont le  $^{15}\text{N}$ , le  $^{13}\text{C}$  et le  $^2\text{H}$ . L'utilisation de systèmes d'expressions recombinants permet le marquage uniforme des protéines à un coût largement réduit comparé à la synthèse peptidique.

Le marquage des protéines permet d'effectuer des expériences RMN multidimensionnelles qui auraient un temps d'acquisition bien trop long avec des protéines en abondance naturelle. En effet, en abondance naturelle, la fréquence d'apparition de deux noyaux d'un isotope détectable est bien trop faible (1,07% pour le  $^{13}\text{C}$  et 0,364% pour le  $^{15}\text{N}$ ). Ces expériences permettent de déterminer la structure 3D de la protéine ou du peptide étudié, ainsi que d'identifier les interactions intermoléculaires avec des ligands, d'autres protéines ou des acides nucléiques. Le marquage isotopique améliore également la sensibilité des expériences de RMN, en permettant la détection d'espèces peu abondantes et la mesure des temps de relaxation et des déplacements chimiques avec une grande précision.

### 2.2.1 Principes biologiques de la surexpression

Dans le cadre d'une expression par un système recombinant il existe plusieurs méthodes de marquage des protéines, notamment le marquage uniforme et le marquage sélectif. Dans les deux cas, la réalisation du marquage consiste à introduire des précurseurs marqués isoto-

piquement dans le milieu de croissance de l'organisme ou du système in vitro, ce qui entraîne l'incorporation des atomes marqués dans tous les acides aminés de la protéine ou du peptide soit sur toutes les positions dans le cas d'un marquage uniforme soit uniquement sur certaines positions des chaînes latérales et du squelette peptidique dans le cas d'un marquage sélectif.

Le marquage sélectif peut être particulièrement utile pour l'étude de protéines de grande taille, où un marquage uniforme peut entraîner un chevauchement des signaux et une diminution de la sensibilité. Ce marquage vise généralement à réduire le nombre de signaux et donc le degré de chevauchement spectral et d'encombrement. Un exemple de marquage sélectif est l'utilisation de [1,3-<sup>13</sup>C]-glycerol et de [2-<sup>13</sup>C]-glycerol dans le milieu de culture des bactéries produisant la protéine recombinante. Ainsi, les acides aminés synthétisés par la voie de l'acide citrique donnent lieu à un mélange de différents isotopomères<sup>41</sup>.

Le système recombinant choisi pour effectuer l'expression de la Vectofusin-1 est la bactérie *E.coli*. Les bactéries de cette espèce présentent l'avantage d'avoir une croissance rapide (temps de génération de 30 minutes pour certaines souches) avec des densités très hautes dans des milieux peu onéreux. De plus, *E.coli* est l'espèce bactérienne la plus étudiée et donc la mieux documentée<sup>78</sup>, ainsi, un grand nombre de différentes souches d'*E.coli* optimisées pour les différents systèmes d'expressions selon les besoins de production ont été créés.

La multitude de vecteurs d'expression et de souches bactériennes mutées disponibles permettant un grand contrôle sur la régulation de l'expression protéique rendent ce système d'expression très attractif. Ces caractéristiques font d'*E.coli* un outil rapide et économique pour la production de protéines recombinantes, et c'est pourquoi *E.coli* est un des hôtes le plus souvent utilisé pour la production de protéines recombinantes en grandes quantités<sup>11</sup>. De façon générale, pour surexprimer une protéine chez *E.coli*, il est nécessaire de cloner le gène qui code pour la protéine d'intérêt dans un vecteur d'expression dont les caractéristiques seront développées par la suite. Celui-ci est alors introduit dans la cellule hôte par méthode physique (électroporation) ou chimique (CaCl<sub>2</sub>).

L'expression de la protéine d'intérêt est alors effectuée en utilisant la machinerie de la cellule bactérienne, il est ainsi nécessaire d'en réguler l'expression. De plus, l'expression de gènes provenant d'un autre organisme par *E.coli* peut souvent s'avérer être délétère pour la bactérie dû à une toxicité engendrée par la protéine exprimée. Dans notre cas, la Vectofusin-1 étant un dérivé de peptide antimicrobien, sa production en système bactérien engendre une forte toxicité qui doit être réduite afin de pouvoir produire le peptide en quantités suffisantes

pour l'étude par RMN du solide. La Vectofusin-1 a montré une concentration minimale inhibitrice (MIC) de  $12\mu\text{M}$  à pH5, indiquant une forte capacité de réduction de la viabilité des bactéries<sup>8,61</sup>.

## 2.2.2 L'utilisation de protéines de fusion pour l'expression en systèmes recombinants

Afin de contourner la toxicité des peptides lors de l'expression par *E.coli*, la stratégie que nous avons adoptée est l'utilisation d'une protéine de fusion<sup>93</sup>. L'utilisation de protéines en tant que partenaires de fusion pour l'expression d'une protéine ou d'un peptide peut avoir plusieurs objectifs. Dans le cas de plus grandes protéines pour lesquelles on cherche une expression sous forme soluble et avec un refolding à l'état natif, l'utilisation de protéines SUMO comme partenaire de fusion est une pratique répandue<sup>14</sup>.

Dans le cas de protéines difficiles à purifier, l'utilisation de la glutathion-S-transferase (GST) en tant que partenaire de fusion apporte la possibilité de réaliser une séparation par affinité de cette protéine grâce à son interaction spécifique avec le glutathion<sup>36</sup>. Dans le cas des peptides antimicrobiens, la plupart des systèmes de fusion ont pour objectif que l'expression soit faite de manière insoluble et aboutisse à la formation de corps d'inclusion, permettant ainsi de réduire voire neutraliser la toxicité des peptides. Pour cela, plusieurs partenaires de fusion insoluble comme la polyedrine du baculovirus<sup>114</sup>, la ketostéroïde isomérase<sup>65</sup> ou encore le fragment de 74 l'opéron tryptophane<sup>95</sup> ont été utilisés. Il se peut aussi que la protéine soit exprimée en corps d'inclusions alors que le partenaire de fusion est une protéine soluble<sup>82</sup>. Selon les partenaires de fusion utilisés, les méthodes de clivage ainsi que les quantités de peptide d'intérêt produit sont variables, c'est pourquoi le choix d'un bon partenaire de fusion est crucial.

Dans le cas de la production de la Vectofusin-1, nous avons choisi d'utiliser le facteur de transcription humain TAF12 (TATA-box binding protein associated factor 12) comme partenaire de fusion. TAF12 est originellement une protéine de 8 kDa qui est trouvée dans les noyaux des cellules humaines et qui s'associe avec l'ARN polymérase II en complexes qui se lient à des éléments régulateurs situés à proximité du site de départ de la transcription. L'utilisation de la protéine TAF12 comme partenaire de fusion s'est avérée fructueuse dans le cas de l'expression du peptide LAH4 en système recombinant *E.coli*, la même approche a donc été choisie pour l'expression de la Vectofusin-1<sup>109</sup>. La figure 22 présente la composition

de la séquence de cette protéine de fusion.

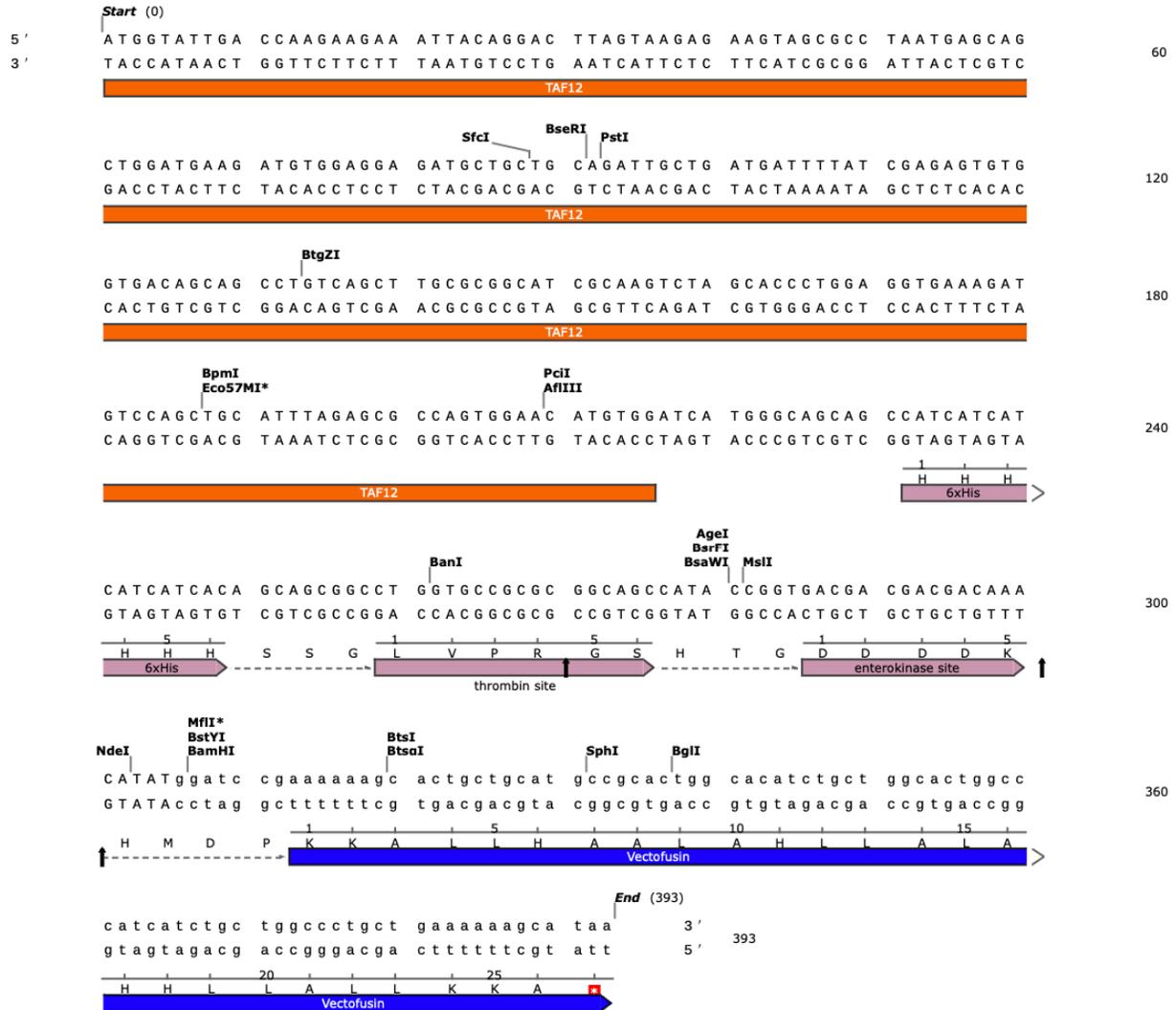


Figure 22 – Représentation schématique de la séquence du gène codant pour la protéine de fusion TAF12-Vectofusin-1. Cette séquence contient l'ORF (Open Reading Frame) de la protéine TAF12 suivie d'une étiquette 6 histidines qui peut être utilisée pour une étape de purification par chromatographie d'affinité. Suite à cela on trouve les séquences de clivage spécifiques de la protéase thrombine et de l'entérokinase. Enfin, on retrouve la séquence de la Vectofusin-1 précédée d'un site Aspartate Proline utilisé pour réaliser le clivage chimique à l'acide formique.

La séquence de la protéine de fusion TAF12-Vectofusin-1 a été clonée dans un vecteur d'expression pTIPX4 (TAF12-mediated Insoluble Peptide eXpression) détaillé dans la figure 23, ce vecteur est dérivé du vecteur pET28b.

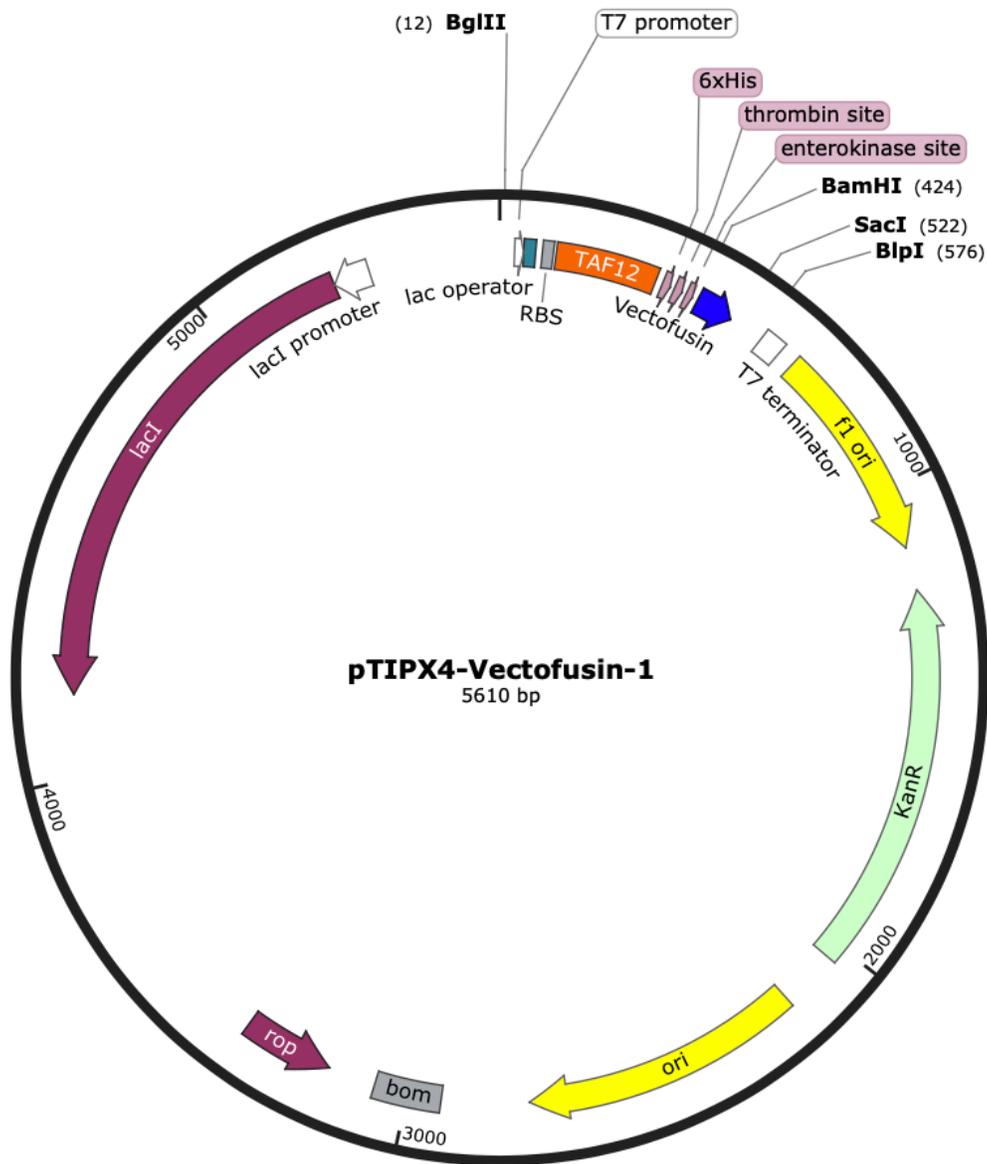


Figure 23 – Représentation schématique du vecteur pTIPX4-Vectofusin-1 utilisé pour la sur-expression de la protéine de fusion TAF12-Vectofusin-1. Ce vecteur contient un promoteur fort T7 (T7 promoter), le gène codant le répresseur lacI qui régule le promoteur T7 en se fixant sur l'opérateur lac (lac operator). On trouve ensuite des sites de clonage multiples (MCS) qui permettent l'insertion du gène d'intérêt ainsi que le terminateur de transcription (T7 terminator), Ce vecteur contient également un gène de résistance à la kanamycine et une origine de réplication (ori).<sup>78</sup>

Le système d'expression pET est l'un des systèmes les plus utilisés pour le clonage et l'expression in vivo de protéines recombinantes chez *E. coli*. Ce système est basé sur l'utilisa-

tion de l'ARN polymérase du bactériophage T7 qui possède une grande sélectivité pour ses séquences promotrices ainsi qu'un niveau élevé d'activité et une bonne efficacité de la traduction qui est gérée par les signaux d'initiation de la traduction du gène T7 10. Les souches bactériennes utilisées en conjonction avec ce système d'expression possèdent dans leur chromosome le gène (fragment DE3 du prophage) codant pour la polymérase T7 sous contrôle du promoteur lacUV5 de l'opéron lactose régulé par l'opérateur lac. Sur ce chromosome se trouve aussi le gène qui code pour le répresseur lacI. Celui-ci, sous forme de tétramère, se fixe sur l'opérateur lac ce qui empêche l'initiation de la transcription de l'ARN T7 polymérase<sup>78</sup> (figure 24).

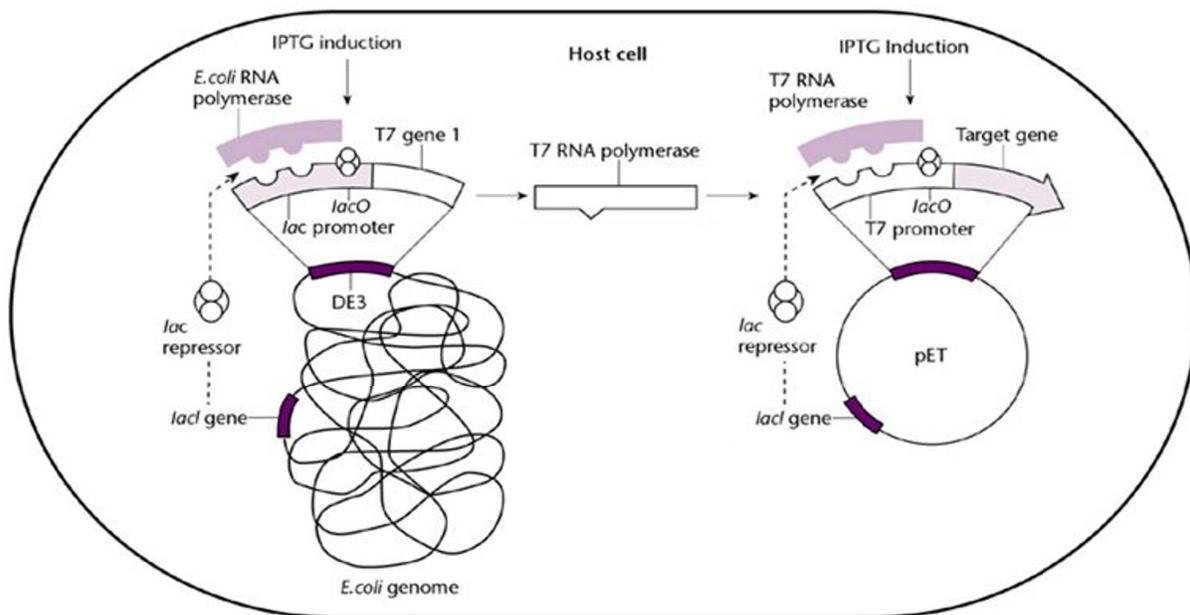


Figure 24 – Représentation schématique de la régulation de la transcription du système pET. Le répresseur LacI empêche la production de l'ARN polymérase T7. Lors de l'induction par isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), cette répression est levée et l'ARN polymérase T7 est produite. L'ARN polymérase se fixe ensuite au promoteur T7 situé sur le vecteur pET afin de transcrire le gène codant pour la protéine d'intérêt. Figure adaptée de<sup>77</sup>.

Dans le système pET, la séquence codante de la protéine d'intérêt est clonée en aval du promoteur T7 et des séquences d'initiation du gène T7 10. La souche *E. coli* d'intérêt sera alors transformée par ce nouveau vecteur d'expression. L'étalement des bactéries sur gélose en présence de l'antibiotique (ici la kanamycine) permet de sélectionner celles ayant intégré le vecteur d'intérêt et donc à même d'exprimer le peptide d'intérêt. Les colonies sont

alors mises en culture avant de procéder à l'induction de l'expression par l'IPTG. L'IPTG active un ensemble de gènes intégrés dans le chromosome bactérien où l'ARN polymérase T7 est exprimée à partir du promoteur lacUV5. En raison de la spécificité du promoteur T7, l'expression basale des gènes cibles clonés est extrêmement faible dans les souches dépourvues d'une source d'ARN polymérase T7. L'ARN polymérase T7 induite est hautement active et son activité surpasse essentiellement celle de l'ARN polymérase de l'hôte. Ce phénomène, associé à une traduction très efficace, permet d'atteindre des niveaux d'expression dans lesquels la protéine cible peut constituer la majorité des protéines cellulaires, et ce après seulement quelques heures.

### **2.2.3 Matériel et méthode : Expression de la protéine de fusion TAF12-Vectofusin-1**

L'expression de la protéine de fusion TAF12-Vectofusin-1 a été réalisée dans des cellules compétentes *E.coli* DE3 Oneshot BL21 Star <sup>TM</sup> (Invitrogen, Cat. No. C6010-03) qui présentent une délétion du gène codant pour la RNase E, permettant ainsi de réduire la dégradation des ARN messagers au sein de la cellule. La séquence codant pour la protéine de fusion TAF12-PVF1 a été clonée dans le vecteur pTIPX4.

Une colonie de bactéries transformées par le vecteur pTIPX4-Vectofusin-1 a été utilisée pour ensemercer un Erlenmeyer contenant 20mL de milieu M9 marqué isotopiquement <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N (composition détaillée dans le tableau 2.1) traité à une concentration de 25µg/mL de kanamycine puis incubés à 37°C pendant 18h sous agitation constante. Cette préculture a ensuite été ajoutée à un Erlenmeyer contenant 1L de milieu M9 marqué isotopiquement <sup>13</sup>C<sup>15</sup>N puis incubé à 37°C sous agitation constante jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm de la culture atteigne une valeur de 0,8 (environ 3h). L'induction de l'expression protéique est alors réalisée par ajout d'IPTG à une concentration finale de 1mM. La culture est ensuite incubée à 37°C sous agitation constante durant 4h. La culture est ensuite centrifugée à 10000g pendant 10 minutes à 4°C afin de récupérer le culot bactérien.

Tableau 2.1 – Composition des milieux M9

<b>Milieu M9</b>		
<b>Solutions</b>	<b>Concentration finale (mM)</b>	<b>Concentration finale (g/L)</b>
Sels M9		0,5
NH <sub>4</sub> Cl		0,5
Glucose		4
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2	
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,1	
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O		0,0001
Thiamine		0,01
Biotine		0,01
Kanamycine		0,05

<b>Sels M9</b>	
<b>Sels</b>	<b>Concentration finale (mM)</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	316,99
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	183,71
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	545,35
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	68,86

## 2.2.4 Résultats et conclusions

L'évolution de culture a été réalisée par spectrophotométrie d'absorption à 600nm. La figure 25 représente graphiquement cette évolution.

Une quantité de 6,6g de culot bactérien a été obtenue par litre de culture.

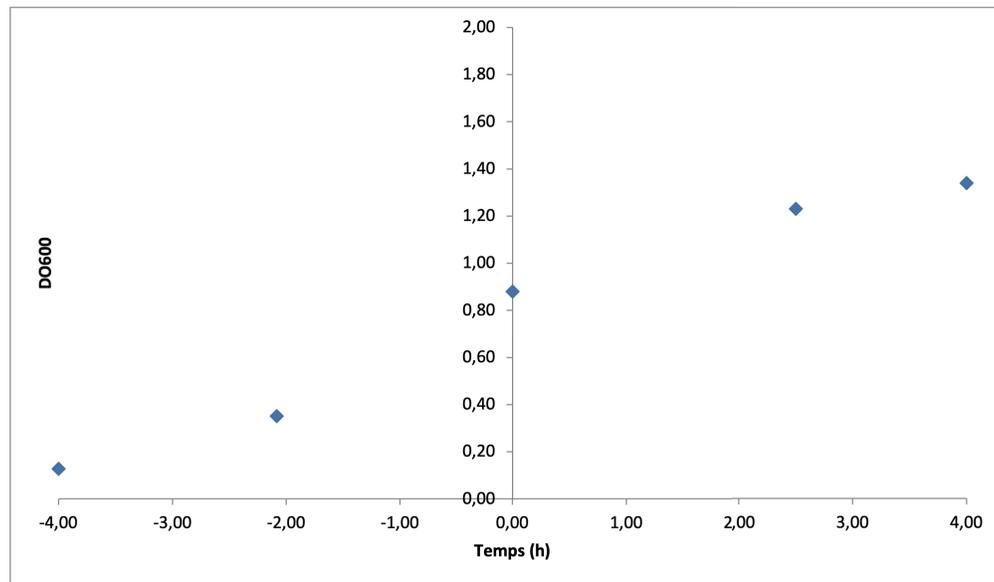


Figure 25 – Suivi de la culture bactérienne par spectrophotométrie d'absorption à 600nm. Le temps 0h représente le temps auquel l'induction à l'IPTG est effectuée.

## 2.3 Purification du peptide $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1

### 2.3.1 Introduction

La purification des protéines et des peptides est une étape cruciale en biologie moléculaire et en biochimie. La purification permet d'isoler et de concentrer spécifiquement une protéine ou un peptide d'intérêt à partir d'un mélange complexe, comme un lysat cellulaire ou une solution synthétique. Cependant, les procédures de purification peuvent varier en fonction de la source de la protéine ou du peptide.

Les différences fondamentales entre la purification d'une synthèse peptidique et celle d'un produit d'expression bactérienne résident dans leur origine et leurs propriétés intrinsèques. Les peptides synthétiques sont généralement de petite taille, souvent inférieure à 50 acides aminés, ce qui facilite leur purification par des méthodes chromatographiques directes. En revanche, les protéines issues d'expression bactérienne sont plus grandes et peuvent être accompagnées de contaminants cellulaires, tels que protéines hôtes, ADN, ARN et lipides. Leur purification nécessite donc des techniques plus sophistiquées et spécifiques.

Les étapes communes de purification pour les protéines et les peptides incluent l'extraction de la source (organisme recombinant ou SPPS), suivie d'une ou plusieurs étapes de séparation basées sur des propriétés physiques ou chimiques spécifiques, telles que la taille, la charge, l'affinité, l'hydrophobicité, etc. Ces méthodes peuvent inclure la chromatographie, la centrifugation, la filtration et la précipitation entre autres techniques.

## **2.3.2 Matériel et méthode : purification de peptides d'origine bactérienne**

### **Lyse bactérienne**

Le culot bactérien obtenu à la suite de la surexpression est repris dans un tampon de lyse 500 mM Tris, 3 M NaCl, 1% Triton X-100 pH 8,2. Les cellules sont ensuite lysées mécaniquement par sonication, 10 cycles de 15 pulsations suivies de 50 secondes de repos. Les tubes sont ensuite centrifugés à 10000g durant 30 minutes à 4°C. Ce protocole est répété deux fois avec le même tampon puis une à deux fois avec un tampon sans Triton X-100 afin d'éliminer la présence de détergent.

### **Clivage de la protéine de fusion**

Les culots bactériens ont été resuspendus dans 2mL d'acide formique 100% puis après vortex dilués avec une solution à 50% d'acide formique jusqu'à un volume de 12mL. L'échantillon est alors incubé à 50°C durant 24h dans un bain-marie afin de cliver la liaison peptidique entre l'Aspartate et la Proline situés entre la protéine TAF12 et le peptide Vectofusin-1. La protéine TAF12 qui possède un seul site DP au sein de sa séquence a été modifiée par mutagenèse dirigée afin de ne pas présenter d'autre site de clivage à l'acide formique. Suite à l'incubation, l'échantillon est centrifugé à 10000g durant 30 minutes puis le culot est lyophilisé sur la nuit. Après cette étape de clivage chimique, un résidu proline reste sur la séquence du peptide Vectofusin-1 en N-terminal.

### **Purification par HPLC**

Le peptide a finalement été purifié par HPLC en phase inverse (Gilson, Villiers-le-Bel, France) en utilisant une colonne préparative C4 (Jupiter, C4-300 -5  $\mu$ m, Phenomenex, Le Pecq, France). Un gradient acétonitrile/H<sub>2</sub>O avec 0,1% constant de TFA a été utilisé comme phase mobile. Le solvant A utilisé est composé de 10% d'acétonitrile et 0,1% de TFA, le solvant B composé de 99,9% d'acétonitrile et 0,1% de TFA. Le gradient commence à 35% de solvant B et termine à 70% en 20 minutes. L'élution des fractions a été suivie par absorption UV de la phase mobile à 214nm. L'identité et la pureté du peptide au sein des fractions collectées a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-TOF Autoflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

### 2.3.3 Résultats et conclusions

En utilisant le protocole de purification des peptides LAH4 surexprimés en système *E. coli* précédemment mis au point par notre équipe<sup>109</sup>, une coélution de la Vectofusin et du TAF12 a pu être observée lors de l'étape de purification par HPLC (figures 26 et 27).

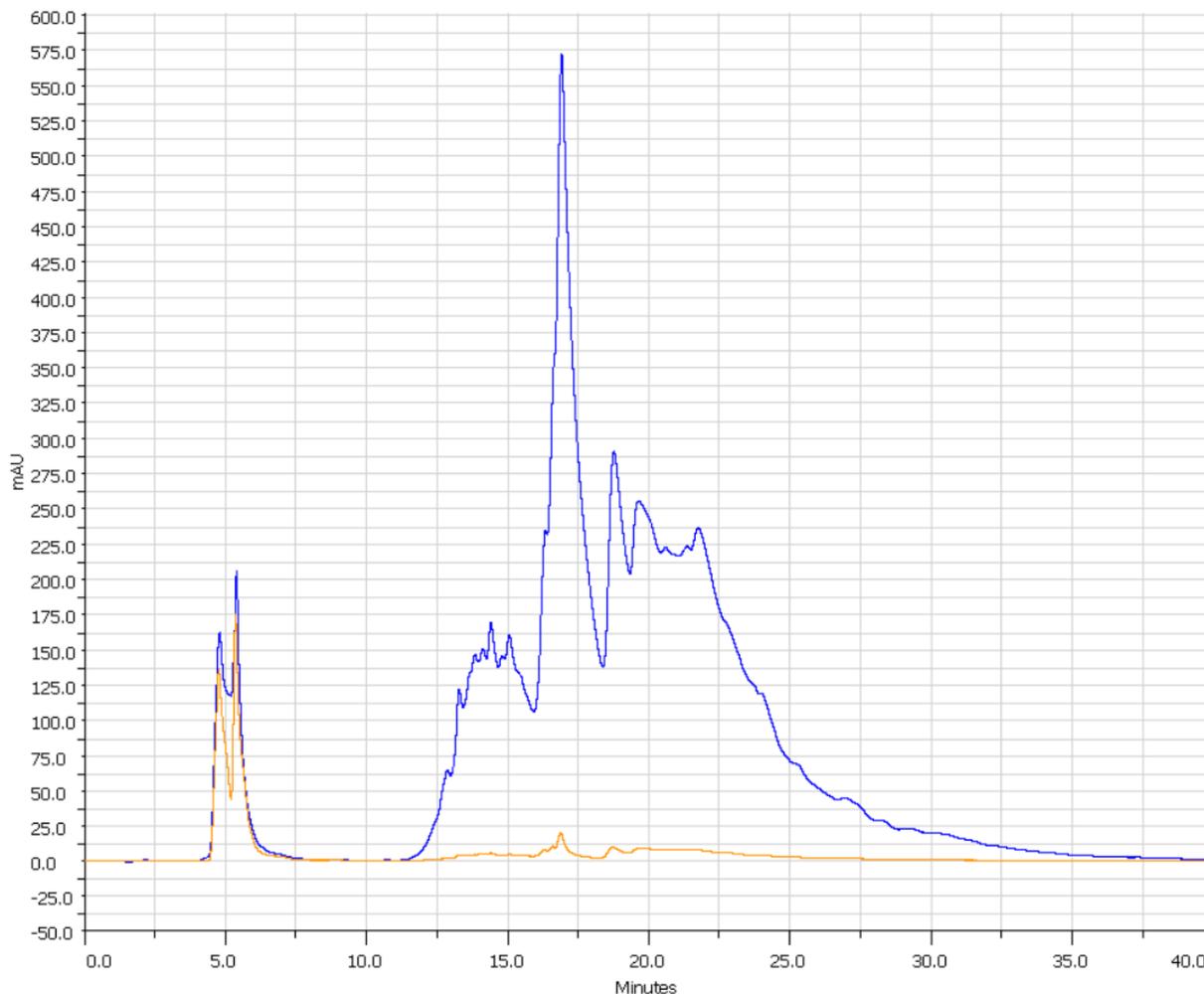


Figure 26 – Chromatogramme de la purification de Vectofusin-1 par HPLC en phase inverse. Le chromatogramme jaune représente la détection UV 280nm, le chromatogramme bleu représente la détection UV 214nm. La coélution de Vectofusin-1 et TAF12 est retrouvée dans la fraction contenant le pic principal sortant à 16 minutes (Issu de Wolf 2018)<sup>117</sup>

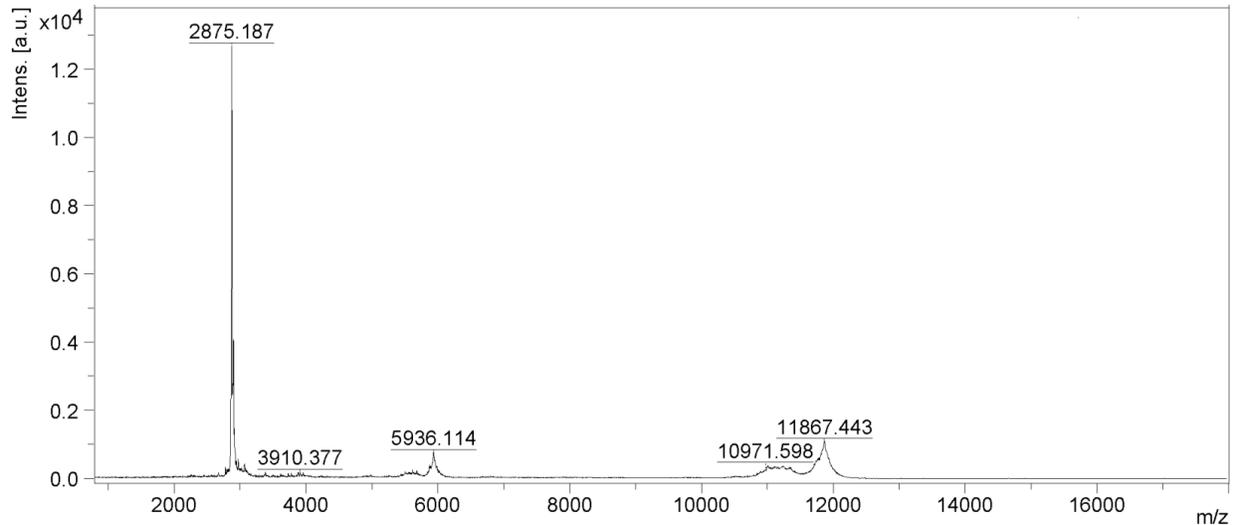


Figure 27 – Spectre de masse MALDI-TOF de la fraction HPLC de la purification de Vectofusin-1 décrit dans la figure 26. Le pic à 2875 Da correspond au peptide Vectofusin-1, les autres pics correspondent aux différents états de charges du TAF12 (Masse : 11867 Da)<sup>117</sup>

L’hypothèse qui avait été avancée pour expliquer la coélution de Vectofusin-1 et TAF-12 est que malgré de grandes similitudes de séquences, les peptides peuvent présenter une répartition des charges apparentes différentes, ce qui entraîne des temps de rétention différents sur les colonnes de phase inverse. Par ailleurs, l’expression bactérienne, la complexité du milieu et, dans notre cas, la présence de TAF12 peuvent également induire des modifications du profil d’élution.

Ainsi, une adaptation du protocole a donc été nécessaire afin d’obtenir une seule fraction HPLC ne contenant que la Vectofusin-1.

## 2.4 Séparation de la Vectofusin-1 du TAF12

Afin de remédier au problème de coélution du TAF12 avec la Vectofusin-1, plusieurs méthodes avaient été tentées précédemment par la Dr. Wolf. Différents solvants utilisés pour la solubilisation du culot obtenu après clivage à l'acide formique, avant l'étape de purification par HPLC ont été testés. Ni le HFIP, ni l'ACN à 10%, ni l'acide formique à 50% n'avaient permis de séparer Vectofusin-1 et TAF12 par HPLC bien qu'un décalage dans les différents profils d'élution était observable. De même, une dénaturation dans 6M de chlorure de guanidinium a été tentée mais n'a pas permis de séparer Vectofusin-1 et TAF12 avec à nouveau un effet notable sur les profils d'élution par HPLC<sup>117</sup>.

De plus, une étape de purification par affinité avait été testée en utilisant le His-tag présent entre TAF12 et la Vectofusin-1. Une fraction HPLC avait été chargée sur des billes de nickel et des éluions d'affinité compétitives avaient été réalisées en utilisant des concentrations croissantes d'imidazole. Malheureusement, cette méthode n'a pas été fructueuse et le TAF12 et une petite quantité de Vectofusin-1 se retrouvaient récupérées dans le flow-through et seuls des peptides clivés de poids moléculaires inférieurs à celui de la Vectofusin-1 étaient élués avec l'imidazole<sup>117</sup>.

### 2.4.1 Nouvelles approches expérimentales

Nous avons mis au point plusieurs approches mettant en oeuvre différentes techniques pour séparer la Vectofusin-1 du TAF12. Les potentielles causes de cette coélution en HPLC sont multiples. Ainsi, les différentes techniques que nous avons mis en oeuvre ont toutes pour objectif de jouer sur un élément physique ou chimique susceptible de provoquer la coélution.

#### **Séparation par exclusion de taille**

Nous avons tenté de réaliser une séparation par exclusion de taille. La purification des protéines par exclusion de taille est un processus de purification commun qui est généralement réalisé à l'aide de chromatographie via l'utilisation de résines comme phases stationnaires. Il a été montré que l'utilisation de la filtration au travers de membranes est une méthode efficace en tant qu'outil pour la purification et le fractionnement peptidiques<sup>96</sup>. C'est donc cette méthode que nous avons tenté d'appliquer. En effet la séquence protéique décrite dans la figure 22 contenant le TAF12 suivi de l'étiquette 6 histidine et des sites Thrombine, entérokinase et du site de clivage Aspartate Proline forme après clivage une protéine de 12

KDa. Cette protéine étant de bien plus grande taille que le peptide Vectofusin-1 (2.7 KDa), dans l'hypothèse selon laquelle le clivage a été efficace et qu'aucune interaction résiduelle n'est présente entre le TAF12 et la Vectofusin-1, une séparation par la taille pourrait nous permettre séparer les plus petites particules de Vectofusin-1 du TAF12 par utilisation d'une membrane.

### **Utilisation des propriétés d'autoassemblage de la Vectofusin-1**

La fibrillation du peptide Vectofusin-1 étant réversible<sup>108</sup>, nous avons testé un protocole de purification dans lequel la fraction HPLC contenant le peptide associé au TAF12 est mis dans les conditions de fibrillation décrites par Lointier *et al.*<sup>58</sup> pour ensuite séparer les fibrilles obtenues par centrifugation et enfin défibriller le culot obtenu.

### **Précipitation au sulfate d'ammonium**

Nous avons aussi formulé l'hypothèse de la formation d'une possible interaction entre la Vectofusin-1 et le TAF12, liant ainsi la protéine et le peptide, empêchant de ce fait la séparation par les méthodes physiques que nous avons jusqu'alors employées. Plusieurs méthodes de purification protéique ayant pour effet de rompre les interactions entre protéines existent. La précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium est une technique couramment utilisée pour purifier les protéines à partir de mélanges complexes. Cette méthode exploite les variations de solubilité des protéines en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium. Les protéines ont tendance à précipiter lorsque la concentration de sulfate d'ammonium augmente, ce qui permet leur séparation du reste des composants de la solution<sup>116</sup>. Cette technique permet aussi d'influer sur les interactions protéines-protéines d'un mélange hétérogène<sup>83</sup>.

### **Précipitation à l'éther**

Enfin, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle la présence d'interactions résiduelles entre les protéines et des potentielles parties membranaires encore présentes dans l'échantillon seraient la cause de la coélution. La précipitation à l'éther est une technique utilisée pour la purification des peptides en solution. Elle implique l'ajout de la solution de peptide à un solvant organique, tel que l'éther diéthylique, ce qui entraîne la précipitation du peptide. Les composants hydrophobes de la solution restent dans la phase organique tandis que le peptide forme un précipité solide qui peut être isolé par centrifugation<sup>12</sup>. Dans notre cas, cette étape de précipitation à l'éther a été réalisé directement sur le culot séché obtenu suite à l'étape de clivage à l'acide formique.

## 2.4.2 Matériels et méthodes

### Séparation par exclusion de taille

Un échantillon de 1mg d'une des fractions HPLC contenant la coélution de TAF12 et Vectofusin-1 a été solubilisé dans un volume de 5mL de tampon Tris 10mM à pH 7.5 puis chargé dans un système de filtration présentant un seuil de poids moléculaire (MWCO) de 10 KDa (Amicon Ultra-15, 10000 MWCO) puis centrifugé à une vitesse de rotation de 5000g jusqu'à un passage de 100% du volume à travers la membrane. La membrane a été lavée avec un volume de 5 mL de tampon. Un aliquot de 40  $\mu$ L de la fraction filtrée et de la fraction de lavage de la membrane a été prélevé afin d'être analysé par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en coloration à l'argent.

### Séparation par fibrillation

Un échantillon de 1mg d'une des fractions HPLC contenant la coélution de TAF12 et Vectofusin-1 a été solubilisé à une concentration finale de 10mM dans 50% d'éthanol. L'échantillon est ensuite mis au bain de sonication durant 5 minutes avant d'être dilué à une concentration de 0,5mM dans un tampon de fibrillation à 10mM de phosphate pH 7,5 ce qui débute le processus d'auto-assemblage. L'échantillon est ensuite incubé durant 48h à une température de 21°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432. Les fibres ainsi formées sont centrifugées durant 10 minutes à 10000g. Un aliquot de 40 $\mu$ L du surnageant a été prélevé pour analyse par SDS-PAGE, le surnageant retiré a été remplacé par une quantité équivalente d'eau ultrapure, condition dans laquelle les fibres ne sont pas stables. L'échantillon a ensuite été passé au bain de sonication jusqu'à dissociation totale des fibrilles. Un aliquot de 40 $\mu$ L est alors prélevé pour analyse par SDS-PAGE en coloration à l'argent.

### Précipitation au sulfate d'ammonium

Afin de séparer la Vectofusin du TAF12, par précipitation au sulfate d'ammonium, un échantillon de 1mg d'une des fractions HPLC contenant la coélution de TAF12 et Vectofusin-1 a été solubilisé dans un volume de 5mL d'H<sub>2</sub>O. 0,89g ; 0,64g et 0,8g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ont été ajoutés successivement à l'échantillon afin de créer une solution respectivement à 30% , 50% et 80% de sulfate d'ammonium. Aucune précipitation n'a été observée pour la solution à 30% de sulfate d'ammonium, les précipités des solutions à 50% et 80% ont été isolés par centrifugation puis resuspendus dans un volume de 1mL de Tris 10mM à pH 7,5 avant d'être analysés par SDS-PAGE en coloration à l'argent.

## **Electrophorèse sur gel SDS-PAGE**

Les gels utilisés ont été réalisés en suivant le protocole décrit par H.Schägger<sup>103</sup>. Nous avons utilisé un système de séparation en gel SDS composé de 3 parties avec des pourcentages différents en acrylamide/bis-acrylamide : mélange de gel à 4% pour la partie où le dépôt est réalisé, 10% pour la moitié haute et 16% pour la moitié basse du gel afin d'obtenir une meilleure séparation des composés durant l'électrophorèse. Enfin, nous avons choisi la coloration à l'argent comme méthode de coloration en raison de la sensibilité accrue apportée par cette méthode (possibilité de détection de nanogrammes de protéine)<sup>103</sup>.

## **Précipitation à l'éther**

Le culot de l'étape de clivage séché a été repris dans un volume de 10mL d'acétonitrile à 10% avant d'être ajouté au goutte à goutte dans un volume de 30mL de diéthyl éther dans un bain de glace. Le mélange est ensuite mélangé au vortex puis centrifugé à 10000g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est alors éliminé et le culot lavé en utilisant le même protocole à trois reprises afin d'assurer que toutes les molécules hydrophobes tels que les lipides sont retirées de l'échantillon protéique.

## **Analyse par LC-MS**

Suite à l'étape de précipitation à l'éther, la partie insoluble a été solubilisée à 10 mg/mL dans une solution de 35% d'acétonitrile avant d'être analysée par LC-MS UltiMate 3000 RSLCnano System, (Thermo Electron, Villebon sur Yvette, France) en utilisant une colonne préparative C18 (Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18; 1.7 $\mu$ m; 1.0x 150mm). Un gradient acétonitrile/H<sub>2</sub>O avec 0,1% constant d'acide formique a été utilisé comme phase mobile. Le solvant A utilisé est composé de 10% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique, le solvant B composé de 99,9% d'acétonitrile et 0,1% d'acide formique. Le gradient commence à 35% de solvant B et termine à 70% en 20 minutes. Les spectres de masse obtenus ont été analysés à l'aide des logiciels Thermo Scientific Xcalibur et UniDec (Universal Deconvolution of Mass Spectra) de l'université d'Oxford.

### 2.4.3 Résultats et conclusions

#### Séparation par exclusion de taille

Comme le montre la figure 28 la majorité des protéines est stoppée par la membrane de filtration. Une des hypothèses que nous avons avancé pour expliquer cet effet serait qu'une potentielle aggrégation, soit des peptides Vectofusin-1 entre eux, soit des peptides avec le TAF12, entraîne la formation de particules de taille supérieure à 10000KDa empêchant ainsi le passage à travers la membrane.

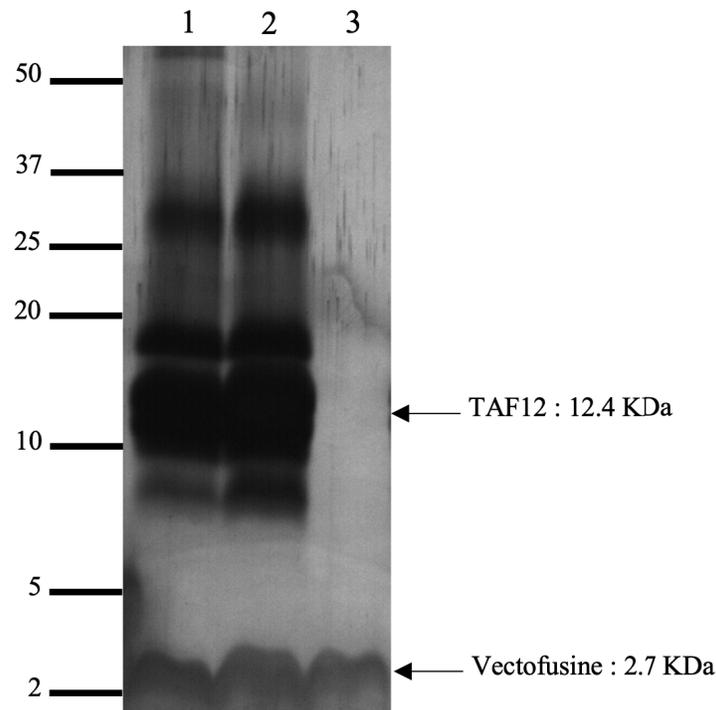


Figure 28 – Gel SDS-PAGE des fractions purifiées par exclusion de taille. La fraction 1 correspond à l'échantillon de départ contenant la Vectofusin-1, le TAF12 et d'autres contaminants; la fraction 2 correspond au lavage de la membrane contenant la Vectofusin-1, le TAF12 et d'autres contaminants; la fraction 3 correspond au filtrat contenant une faible concentration de Vectofusin-1.

#### Séparation par fibrillation

Comme le montre la figure 29 cette méthode n'a pas permis de séparer la Vectofusin-1 du TAF12. En effet un mélange de Vectofusin-1 avec l'intégralité des contaminants présent dans l'échantillon est retrouvé dans le culot de fibrilles ainsi que dans le surnageant. Ces résultats

nous ont amené à formuler deux hypothèses. La première selon laquelle une interaction résiduelle entre la Vectofusin-1 et le TAF12 doit encore être présente même après le clivage à l'acide formique. La seconde selon laquelle les contaminants sont cocentrifugés dans les conditions de fibrillation.

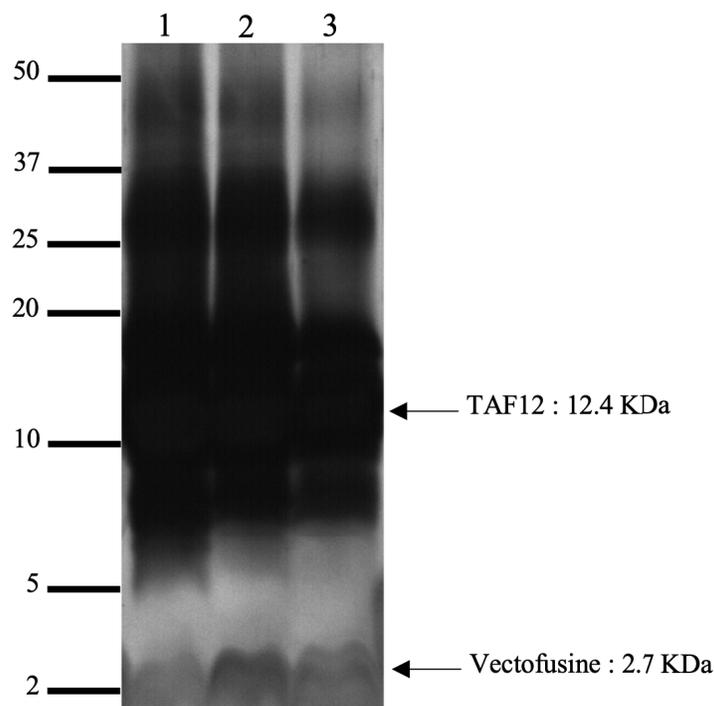


Figure 29 – Gel SDS-PAGE des fractions purifiées par fibrillation. La fraction 1 correspond à l'échantillon de départ contenant la Vectofusin-1, le TAF12 et d'autres contaminants ; la fraction 2 correspond au culot de fibrilles contenant la Vectofusin-1, le TAF12 et d'autres contaminants ; la fraction 3 correspond au surnageant contenant la Vectofusin-1, le TAF12 et d'autres contaminants.

### Précipitation au sulfate d'ammonium

Comme le montre la figure 30, une proportion équivalente de TAF12 et de Vectofusin-1 ont été isolées par les précipitations au sulfate d'ammonium successives, indiquant alors que l'interaction reliant le peptide et la protéine n'est pas de nature électrostatique.

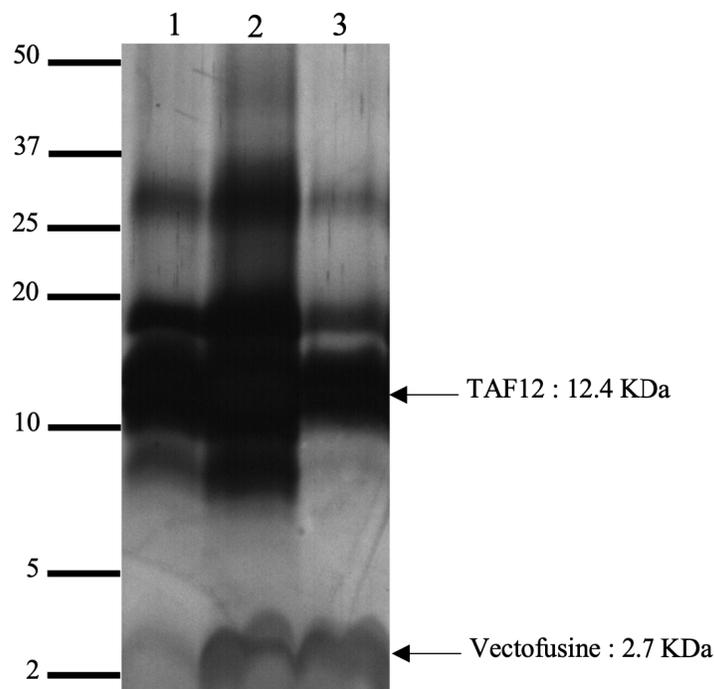


Figure 30 – Gel SDS-PAGE des fractions purifiées après précipitation au sulfate d’ammonium. La fraction 1 correspond à l’échantillon de départ contenant la Vectofusin-1, le TAF12 et d’autres contaminants; la fraction 2 correspond au précipité de la solution à 50% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  contenant la Vectofusin-1, le TAF12 et d’autres contaminants; la fraction 3 correspond au précipité de la solution à 80% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  contenant la Vectofusin-1, le TAF12 et d’autres contaminants.

### Précipitation à l’ether

La figure 31 montre qu’après avoir effectué une étape de précipitation à l’ether, il est désormais possible de séparer la Vectofusin-1 du TAF12 par chromatographie en phase inverse. La figure 32 montre que le pic d’élution sortant à 10,21 minutes en LC contient une seule espèce correspondant à la  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1, on y retrouve la masse attendue de 3049 Da. La figure 33 montre le contenu de la fraction sortant à 12,04 minutes qui contient plusieurs espèces du TAF12 sous différents états de charges ainsi que le peptide Vectofusin-1 ayant subi une formylation à 3077 Da (3049 + 28 Da). Nous en avons conclu que l’interaction qui provoquait la coélution du TAF12 avec la Vectofusin-1 devait être d’origine hydrophobe avec de potentiels résidus lipidiques des membranes bactériennes.

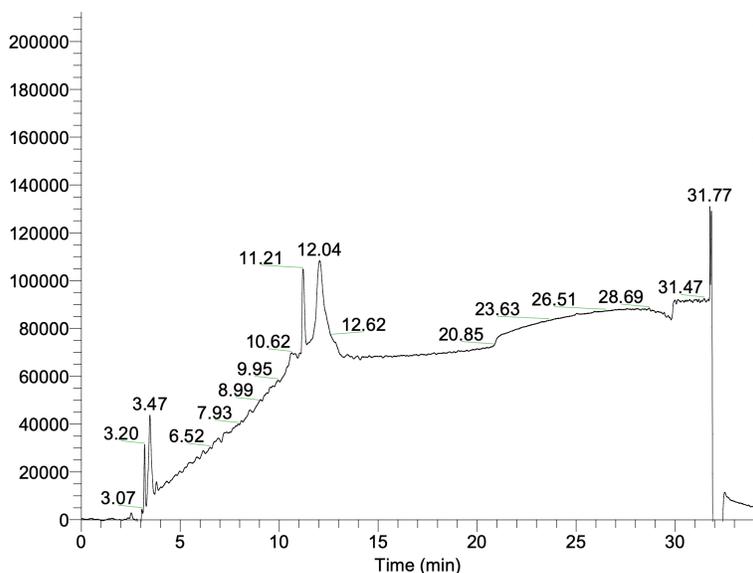


Figure 31 – Chromatogramme de la détection UV à 214nm de l'analyse de la séparation de TAF12 et Vectofusin-1 par LC-MS. Les spectres de masse des pics d'élution sortant à 10,21 minutes et 12,04 sont décrits dans les figures 32 et 33.

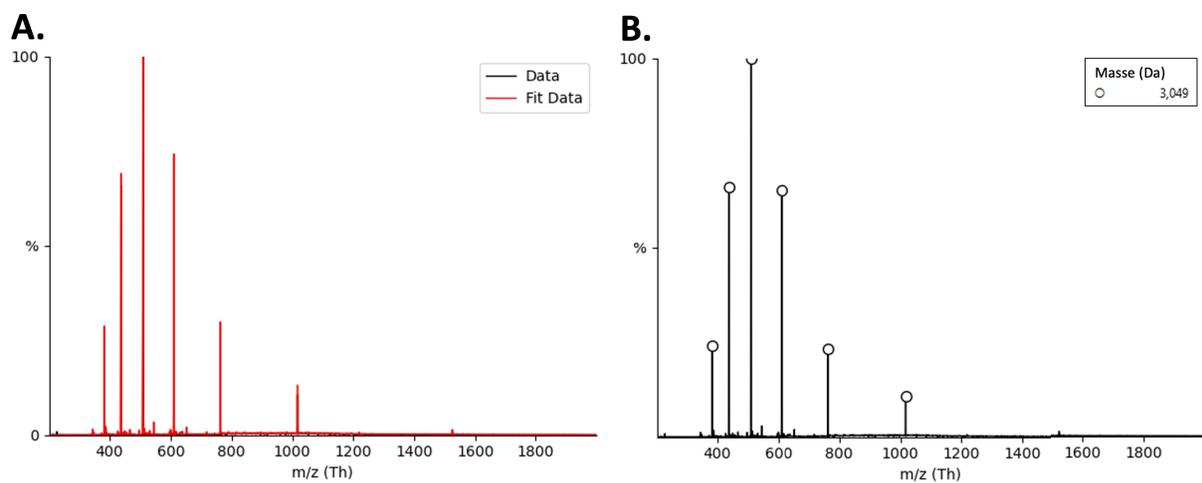


Figure 32 – Spectre de masse du pic d'élution sortant à 10,21 minutes en LC. A. Le spectre noir correspond au spectre de Masse obtenu et le spectre rouge correspond au fitting du logiciel UniDec. B. Analyse de la signature de masse du pic par le logiciel UniDec correspondant à la masse la  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 de 3049 Da.

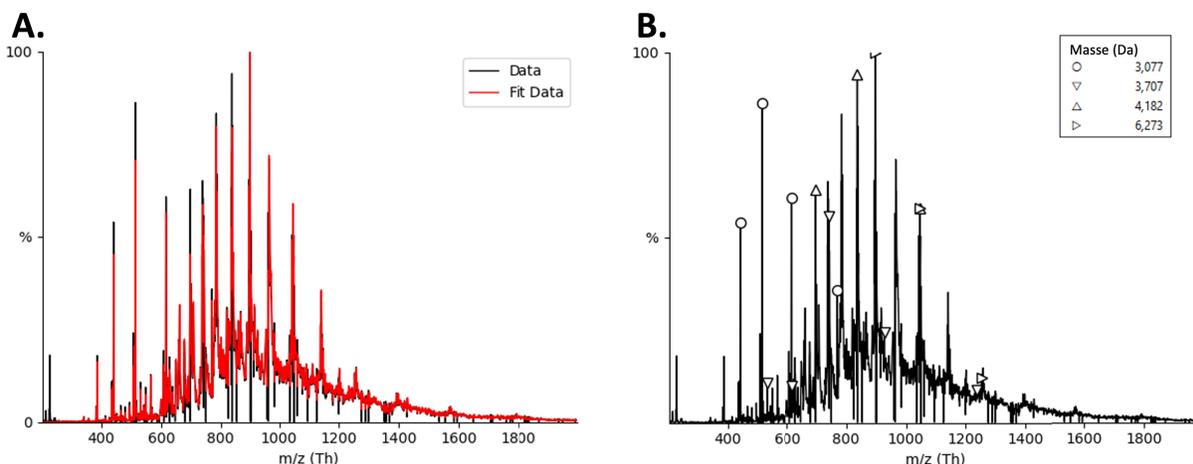


Figure 33 – Spectre de masse du pic d'éluion sortant à 12,04 minutes en LC. A. Le spectre noir correspond au spectre de Masse obtenu et le spectre rouge correspond au fitting du logiciel UniDec. B. Analyse de la signature de masse des pics par le logiciel UniDec : 3077 Da correspond à la masse la  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 ayant subi une formylation, les autres signatures correspondent aux différentes charges du TAF12.

Les peptides séparés du TAF12 par précipitation à l'éther ont été purifiés par HPLC (figure 34) puis dissous dans une solution à 4% d'acide acétique à une concentration de 1mg/mL puis évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi, rotavapor R-210) avant d'être lyophilisés. Ce procédé a été réitéré à 3 reprises afin d'assurer l'échange des ions TFA avec les ions acétate. Le peptide pur lyophilisé a enfin été stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le rendement final de cette purification est de 4mg de peptide lyophilisé par litre de culture bactérienne.

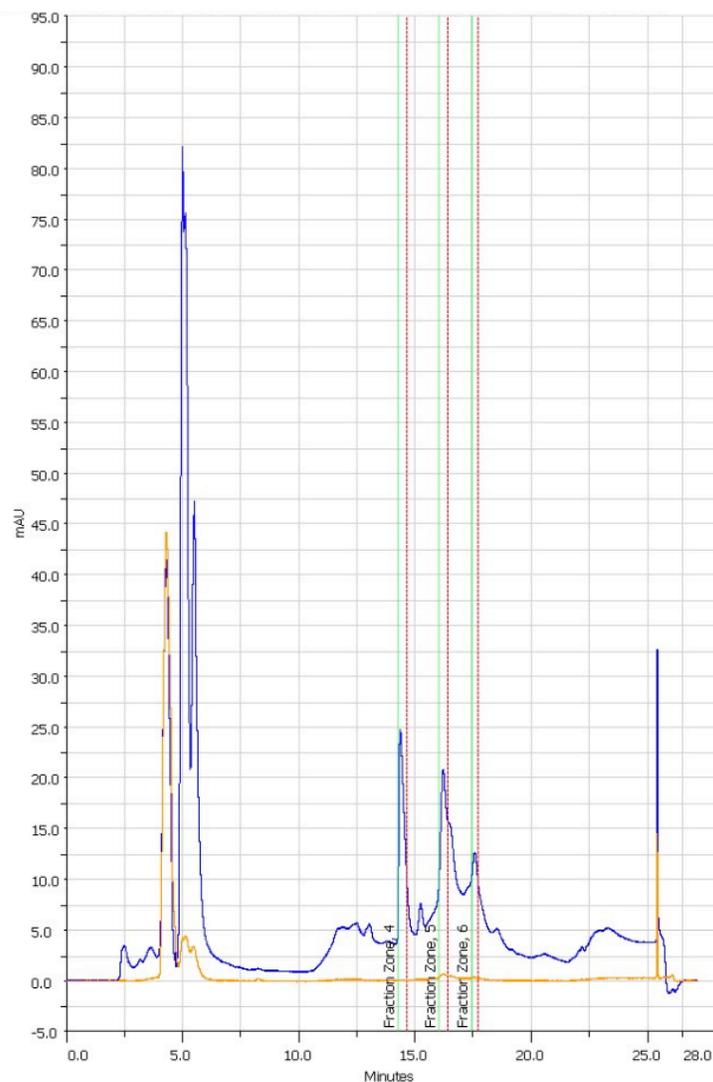


Figure 34 – Chromatogramme de l'étape de purification de Vectofusin-1 par HPLC. La courbe orange représente la détection UV à 280nm et la courbe bleue la détection UV à 214 nm. La fraction collectée notée zone 4 sortant à 14 minutes correspond au pic de la Vectofusin-1.

Ce nouveau protocole nous a donc permis d'obtenir le peptide  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 de manière pure et utilisable pour la préparation d'échantillons RMN MAS (figure 35 et 36). L'utilisation de ce protocole nous a permis d'obtenir un rendement de 4mg de peptide marqué  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 par litre de culture en milieu minimum M9. Ce rendement bien que très faible par rapport aux rendements obtenus en synthèse peptidique (200 mg par synthèse) reste suffisant pour la formation d'un échantillon destiné à être utilisé en RMN du solide à très haute vitesse MAS dans des rotors 1.3mm ou 0.7mm.

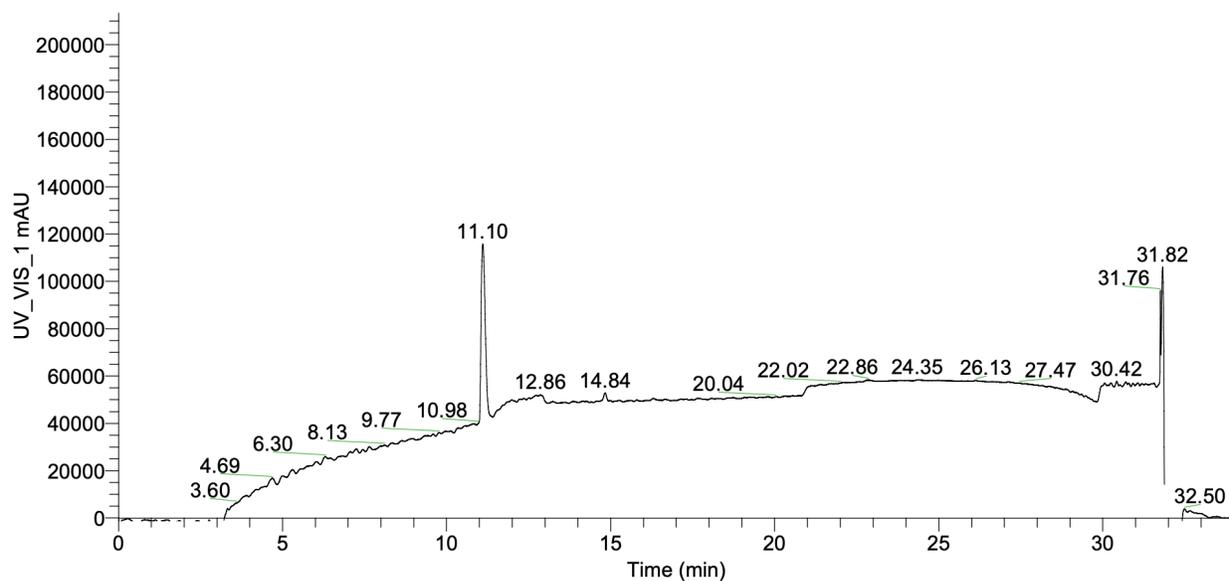


Figure 35 – Chromatogramme de la fraction purifiée de Vectofusin-1 obtenu par LC-MS. Le pic UV214 nm sortant à 11 minutes correspond à la Vectofusin-1 *cf.*figure 32

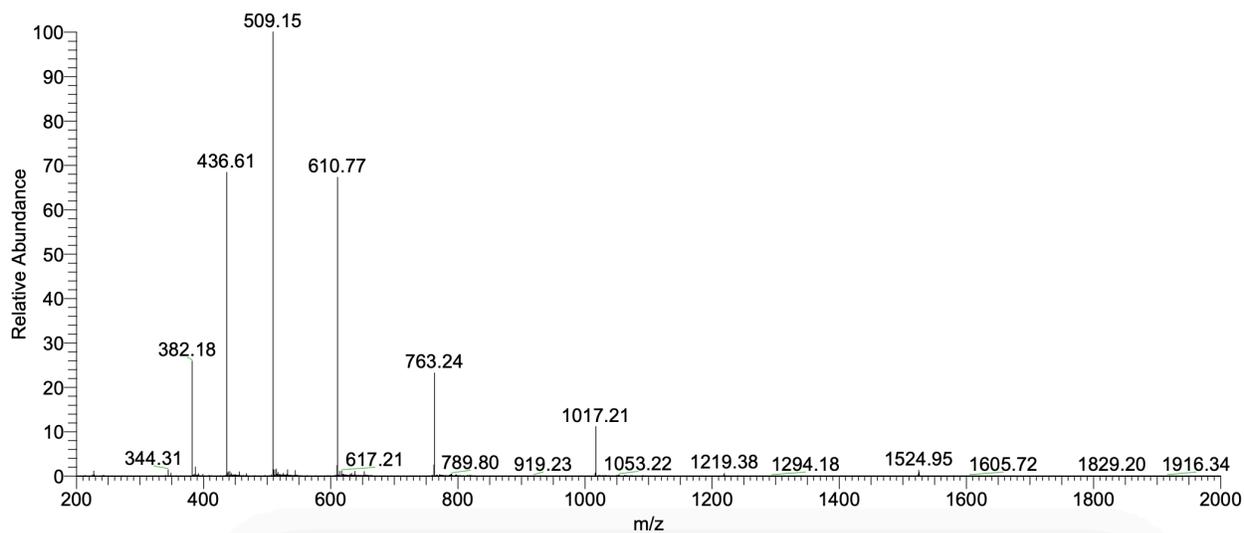


Figure 36 – Spectre de masse du pic de la Vectofusin-1 présenté dans la figure 35 obtenu par LC-MS. La signature obtenue correspond à la masse du peptide Vectofusin-1 marqué uniformément en  $^{13}\text{C}$  et en  $^{15}\text{N}$  *cf.*figure 32

# Chapitre 3

## Etude structurale des auto-assemblages du peptide Vectofusin-1

### 3.1 Etude sur la variation des conditions environnementales menant à la formation d'assemblages supramoléculaires

L'agrégation des peptides de la famille LAH4 dépend fortement du pH ainsi que des ions composant le tampon dans lequel le peptide est solubilisé. L'augmentation du pH est associée à la déprotonation des histidines et à une plus grande propension aux interactions hydrophobes. La structure secondaire adoptée par les assemblages de ces peptides dépend de leur séquence. Le peptide LAH4 forme des assemblages structurés en feuillets  $\beta$  alors que d'autres peptides de cette famille adoptent une structure  $\alpha$ -hélicoïdale lors de l'assemblage, c'est le cas pour les peptides LAH4-L1 et Vectofusin-1<sup>108</sup>. Peu d'informations sont disponibles sur les structures tertiaires et quaternaires adoptées par ces auto-assemblages, de plus, les assemblages de peptides structurés en hélices sont bien moins documentés que ceux structurés en brins  $\beta$  tels que les fibres amyloïdes<sup>33,71</sup>.

C'est pourquoi dans ce manuscrit, nous chercherons à définir les conditions qui conduisent à l'auto-assemblage de ces fibrilles peptidiques ainsi qu'à la structure de ces assemblages.

En effet, les différents protocoles de fibrillation mis au point par notre équipe<sup>117, 58</sup> nous ont montré que la modification des conditions dans lesquelles les peptides s'assemblent a une forte influence sur la structure quaternaire adoptée par ceux ci.

Notre objectif dans ce chapitre est donc de comprendre les interactions mises en jeu dans ces assemblages afin de pouvoir orienter l'assemblage des peptides et ainsi créer des structures supramoléculaires à façon. Pour cela, nous avons employé deux techniques biophysiques, la microscopie électronique à transmission et la RMN à l'état solide. Nous avons aussi réalisé des prédictions de structures par modélisation moléculaire.

### 3.1.1 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission est une technique d'imagerie utilisée dans divers domaines scientifiques, notamment en science des matériaux et en biologie. Cette technique permet d'observer des structures à l'échelle micrométrique grâce à des grossissements extrêmement élevés, permettant ainsi de fournir des informations détaillées sur la morphologie des échantillons étudiés.

Cette technique repose sur le principe de la transmission d'un faisceau d'électrons à travers un échantillon mince, suivi de la capture des électrons transmis pour former une image. Les électrons ont des longueurs d'onde beaucoup plus courtes que la lumière visible, ce qui permet d'atteindre une résolution plus fine<sup>115</sup>. Un microscope électronique comprend un canon à électrons qui émet un faisceau d'électrons, une série de lentilles électromagnétiques pour focaliser et contrôler le faisceau d'électrons, un porte-échantillon et un système de détection et de traitement du signal pour capturer les électrons transmis et former une image<sup>38</sup>. Plusieurs types d'images peuvent être produit par TEM, notamment des images en champ clair et des images en champ sombre. Les images en champ clair montrent les régions de l'échantillon qui transmettent plus d'électrons, tandis que les images en champ sombre montrent les régions qui diffusent davantage d'électrons<sup>122</sup>.

En biologie cellulaire et moléculaire, la TEM est utilisée pour examiner les organites, les structures protéiques, les virus et autres composants cellulaires. La TEM est ainsi devenue un outil essentiel pour caractériser les matériaux et assemblages tels que les nanoparticules et les nanotubes<sup>76</sup>.

Dans le cas des peptides de la famille LAH4, nous avons utilisé la microscopie électro-

nique à transmission comme technique d'étude préliminaire de la morphologie des différentes structures formées par les assemblages supramoléculaires de peptides, celles-ci étant largement influencées par les conditions de fibrillation.

Certains paramètres tels que le choix du tampon, son effet sur la formation et la stabilité des fibres déjà été étudiés et définis précédemment par notre équipe<sup>117, 58</sup>.

Ainsi, les paramètres que nous avons étudiés dans ce travail sont :

- Le solvant utilisé pour la solubilisation initiale des peptides à 10mM.
- Le pH du tampon phosphate utilisé lors de la fibrillation.
- L'effet de la sonication sur la formation d'assemblages.
- Le pH du tampon utilisé pour l'auto-assemblage des peptides.
- La température à laquelle l'assemblage des peptides est réalisée.
- Le type d'agitation utilisé durant l'assemblage des peptides (douce ou vigoureuse).
- Le temps de fibrillation, c'est à dire le temps d'incubation des peptides dans le tampon phosphate utilisé pour la fibrillation.

### **3.1.2 Matériel et méthode**

#### **3.1.3 Fibrillation des peptides de la famille LAH4**

La processus de fibrillation des peptides de la famille LAH4<sup>58</sup> peut être découpé en 4 étapes :

Etape 1 : 1mg de peptide lyophilisé est solubilisé dans un microtube à une concentration finale de 10mM dans 50% éthanol.

Etape 2 : L'échantillon est ensuite passé au bain de sonication durant 5 minutes

Etape 3 : L'échantillon est dilué à une concentration de 0,5mM dans un tampon de fibrillation 10mM de phosphate pH 7,5 ce qui débute le processus d'auto-assemblage.

Etape 4 : L'échantillon est ensuite incubé durant 48h à une température de 21°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432.

Les fibrilles ainsi formées ont été centrifugées durant 10 minutes à 10000g avant d'être lavées avec le tampon de fibrillation afin de retirer de l'échantillon tout peptide n'ayant pas fibrillé.

### **Impact du temps de fibrillation**

Les étapes 1, 2 et 3 ont été réalisées sur 3 échantillons de peptide Vectofusin-1 selon le protocole décrit dans la section 3.1.3. Les échantillons ont ensuite été incubés respectivement durant 48h, 7 jours et 3 mois à une température de 21°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432.

### **Impact de la température**

Les étapes 1, 2 et 3 ont été réalisées sur 3 échantillons de peptide Vectofusin-1 selon le protocole décrit dans la section 3.1.3. Les échantillons ont ensuite été incubés respectivement durant 48h à des température de 21°C et 37°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432.

### **Impact de l'agitation**

Les étapes 1, 2 et 3 ont été réalisées sur 3 échantillons de peptide Vectofusin-1 selon le protocole décrit dans la section 3.1.3. Les échantillons ont ensuite été incubés respectivement durant 48h à une température de 21°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432 pour une agitation vigoureuse, ou sur un agitateur rotatif LD79 Digital Test-Tube Rotator (LABINCO BV, Hollande) pour une agitation douce.

### **Impact de la sonication**

Les étapes 1, 2 et 3 ont été réalisées sur 2 échantillons de peptide Vectofusin-1 selon le protocole décrit dans la section 3.1.3. Une étape de sonication supplémentaire a été appliquée entre les étapes 3 et 4. Durant cette étape, les échantillons ont été mis au bain de sonication pour une durée de 5 minutes ou une heure. Les échantillons ont ensuite été incubés respectivement durant 48h à des température de 21°C et 37°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432.

## **Impact du pH**

Les étapes 1 et 2 sont réalisées sur 4 échantillons de peptide Vectofusin-1 selon le protocole décrit dans la section 3.1.3.

Les échantillons ont ensuite été dilués à une concentration de 0,5mM dans des tampon de fibrillation 10mM de phosphate de pH = 4 ; pH = 6 ; pH = 7,5 et pH = 9,6.

L'étape 4 a ensuite été réalisée selon le protocole décrit dans la section 3.1.3.

## **Impact du solvant**

4 échantillons de 1mg de peptide Vectofusin-1 lyophilisé ont été solubilisés dans un microtube à une concentration finale de 10mM dans des concentrations d'éthanol de 10%, 30%, 50% et 80%.

4 autres échantillons ont été solubilisés dans des concentrations de méthanol de 10%, 30%, 50% et 80%.

Les étapes 2, 3 et 4 ont été réalisées sur les échantillons de peptide Vectofusin-1 selon le protocole décrit dans la section 3.1.3.

## **Dépot sur grille et microscopie**

Chaque échantillon a été déposé sur une grille formvar (CFT200-Cu, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, United States). Après 2 minutes, l'excès d'échantillon a été retiré de la grille à l'aide d'un papier buvard puis la grille a été laissée à sécher à l'air libre durant 30 minutes. Les grilles ont ensuite été rincées abondamment à l'eau ultrapure afin de retirer les sels du tampon de fibrillation. Aucun agent de contraste n'a été ajouté. Les images ont été collectées en utilisant un microscope Hitachi H7500 Electron microscope à 80 KeV.

### 3.1.4 Résultats et discussion

#### Impact du temps de fibrillation

La figure 37 présente des clichés de TEM obtenus après différents temps d'incubation, on peut y observer que lorsque le temps de formation est le plus court (a), les fibrilles adoptent une morphologie plutôt courte (entre 100 et 500  $\mu\text{m}$ ) qui ont tendance à s'agréger en matrices alvéolées. Après une semaine d'incubation (b), peu de fibres individuelles sont observables, les fibrilles sont agrégées en amas de taille similaire à la condition (a). Au bout de trois mois (c), les amas observés sont devenus denses et uniformes et perdent leur aspect alvéolé.

On peut donc observer un effet de compaction des fibrilles au cours du temps.

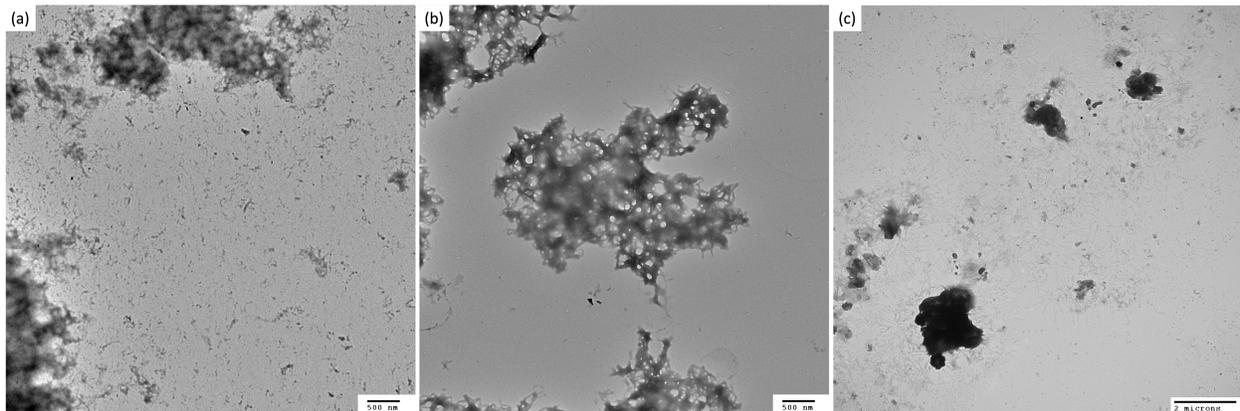


Figure 37 – Fibrilles de Vectofusin-1 formées durant différents temps d'incubation (a) 48h ; (b) 7 jours ; (c) 3 mois.

#### Impact de la température

La figure 38 présente des clichés de TEM de fibrilles de Vectofusin-1 obtenues après incubation à différentes températures. On peut y observer que les fibrilles formées à température ambiante (a) forment un tapis uniforme sur la grille avec des fibrilles peu denses. Au contraire, les fibrilles formées à température physiologique (b) sont plus denses (intensité champ clair plus élevée) et plus éparpillées à la surface de la grille. La température appliquée aux peptides durant l'assemblage influe donc sur la cinétique d'assemblage des fibrilles de Vectofusin-1.

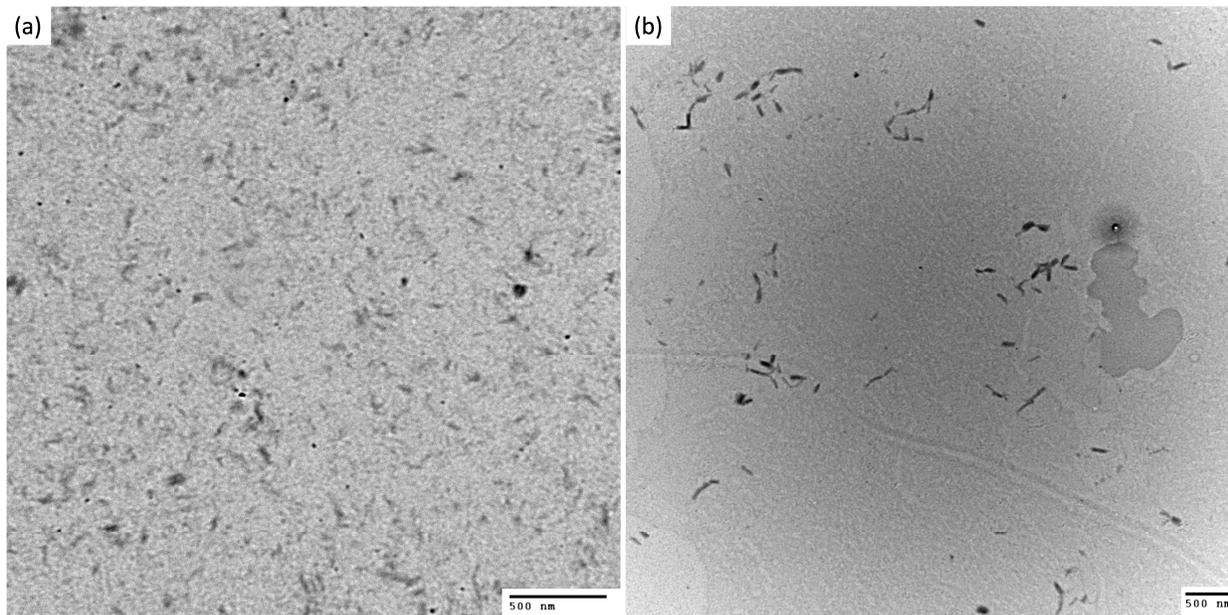


Figure 38 – Fibrilles de Vectofusin-1 formées à différentes températures (a) 21°C ; (b) 37°C.

### Impact de l'agitation

La figure 39 présente des clichés de TEM de fibrilles de Vectofusin-1 obtenues après incubation sous différentes sources d'agitation, on peut y observer que les fibrilles formées avec une agitation par rotation (a) sont courtes, en effet, les fibres formées de cette manière ne dépassent en moyenne pas les 100nm. Au contraire, les fibrilles formées avec une agitation vigoureuse (b) présentent une morphologie plus longue, avec une taille variant autour de 500nm de long. Il y a donc un effet notable d'élongation des fibres lorsque des vibrations sont appliquées aux peptides lors de l'incubation.

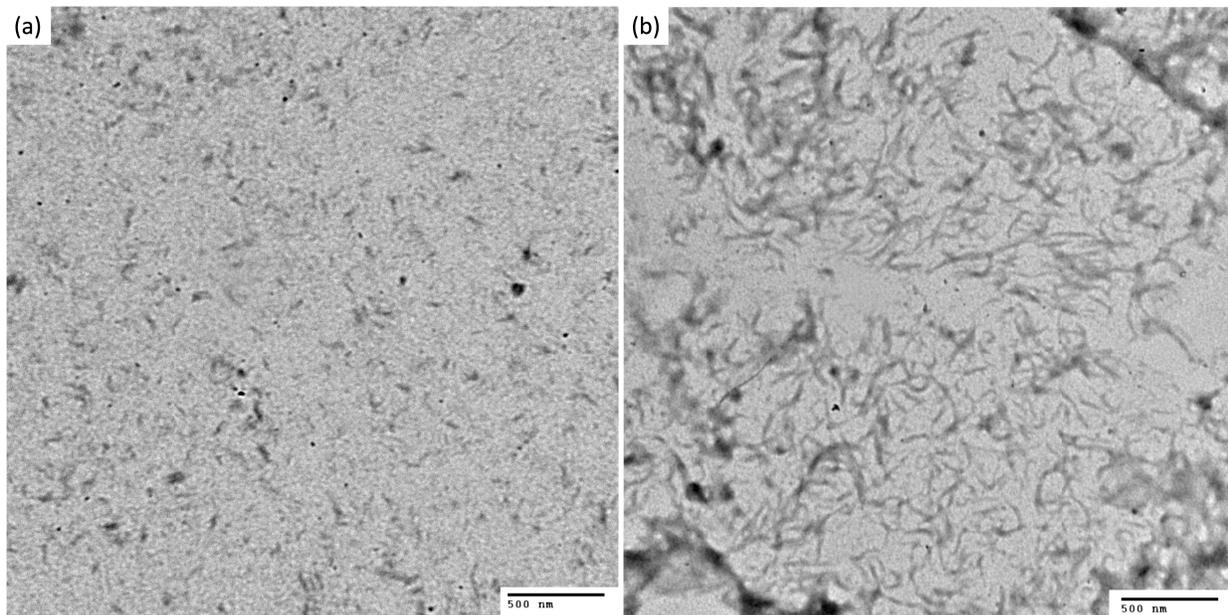


Figure 39 – Fibrilles de Vectofusin-1 formées sous différentes sources d’agitation (a) fibrilles formées sous agitation douce (b) fibrilles formées sous agitation vigoureuse

### **Impact de la sonication**

La figure 40 présente des clichés de TEM de fibrilles de Vectofusin-1 obtenues après incubation en ayant subi une étape de sonication. On peut y observer que les fibrilles formées avec une étape de sonication courte (a) ont une morphologie plus épaisse, plus dense et ne dépassent pas les 100nm de long. Le même constat peut être effectué pour des fibrilles ayant subi une étape de sonication d’une heure (b).

Il y a donc un effet notable de compaction des fibres due à l’étape de sonication qui apparaît même après de courtes étapes de sonication.

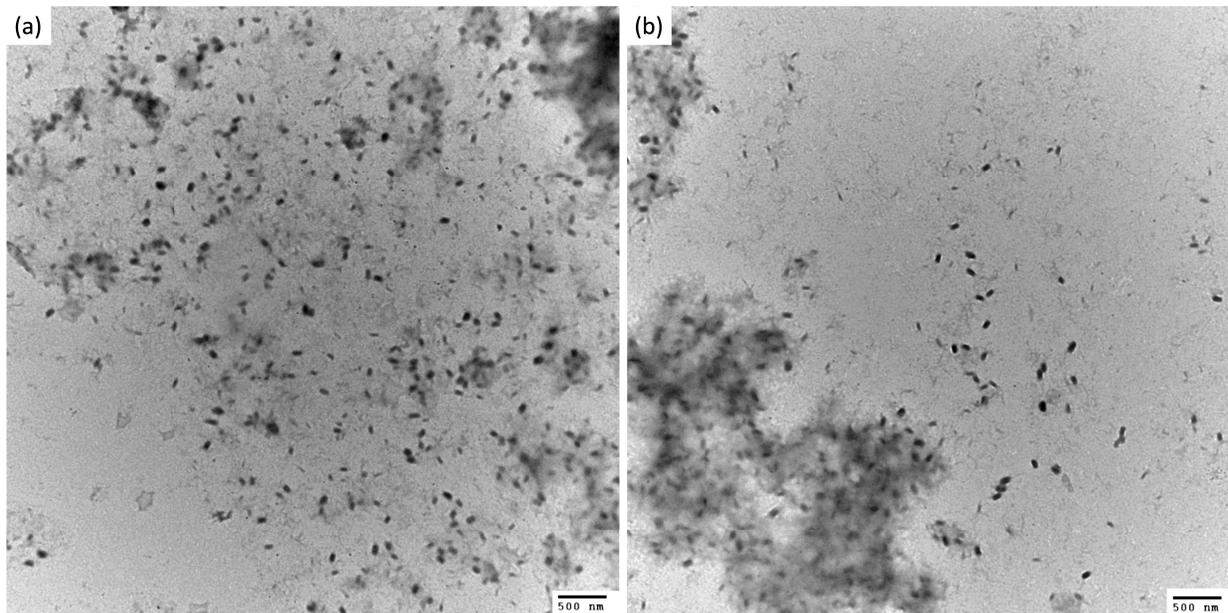


Figure 40 – Fibrilles de Vectofusin-1 formées à différents temps de sonication (a) fibrilles formées après 5 minutes de sonication (b) fibrilles formées après une heure de sonication

### Impact du solvant

Dans les conditions de solubilisation utilisant 30%, 50% et 80% d'éthanol (figure 41(a)) ainsi que dans les conditions utilisant 10%, 30% et 50% de méthanol (figure 42(a)), on observe que la morphologie adoptée par les fibrilles de Vectofusin-1 correspond à celle décrite par Lointier *et al.*<sup>58</sup>.

Cependant, comme le montrent les figures 41(b) et 42(b), l'utilisation de 10% d'éthanol ou de 80% de méthanol en tant que solvant lors de l'étape de solubilisation des peptides lyophilisés amène à la formation de superstructures. Ces superstructures prennent une forme semblable à des microtubules aux extrémités fermées pouvant atteindre une taille de 10 $\mu$ m.

Ces résultats étaient potentiellement attendus pour le peptide Vectofusin-1, en effet, il a été montré par C.L. Shen et R.M. Murphy<sup>105</sup> que l'utilisation de différents solvants pour la solubilisation de peptides influence la formation de différents conformères lors de l'assemblage de peptides en structures supramoléculaires dans le cadre d'une étude sur la formation de fibrilles  $\beta$ -amyloïdes.

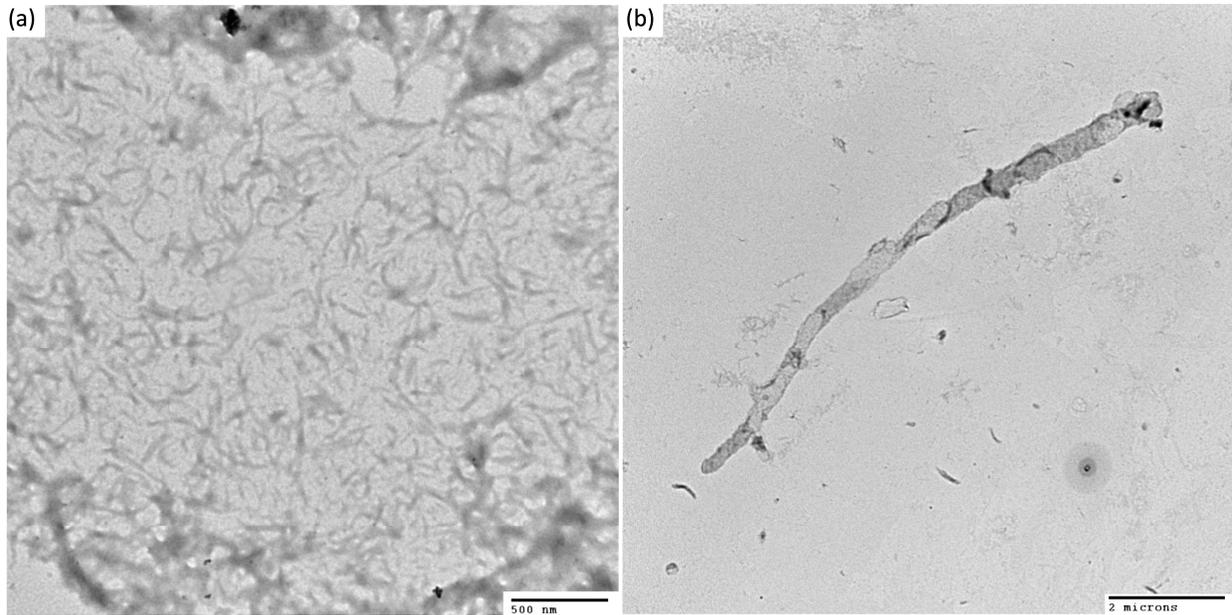


Figure 41 – Fibrilles de Vectofusin-1 formées en solubilisant les peptides dans de l'éthanol (a) éthanol 50% (b) éthanol 10%

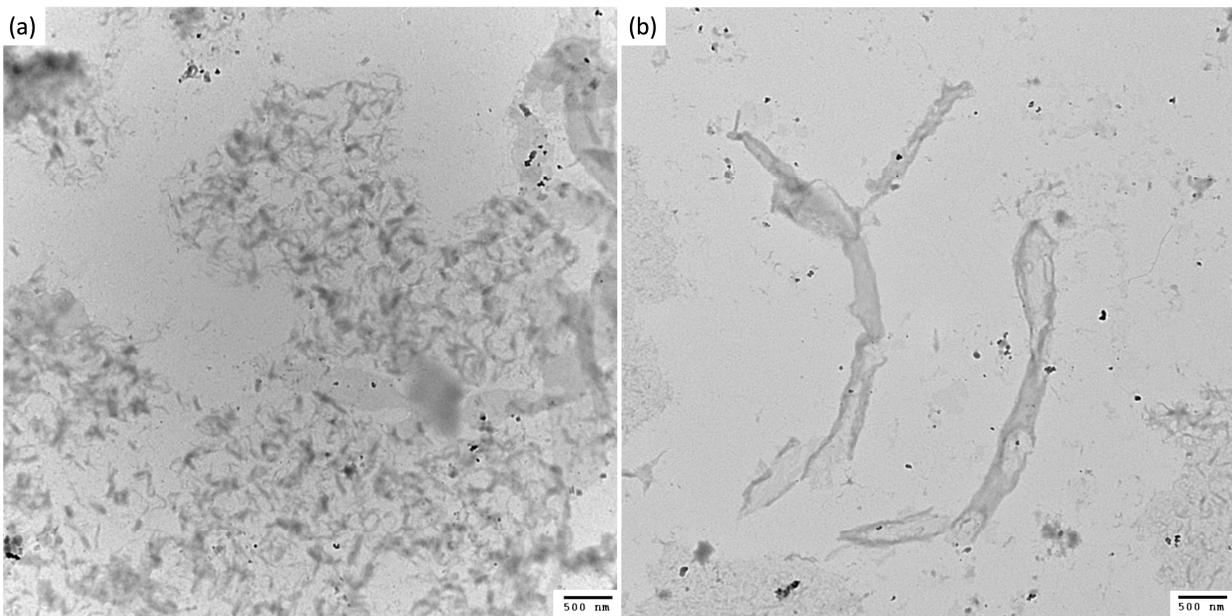


Figure 42 – Fibrilles de Vectofusin-1 formées en solubilisant les peptides dans du méthanol (a) Méthanol 50% (b) Méthanol 80%

Cette propriété de la Vectofusin-1 à former des microtubules pourra à l'avenir être utilisée pour différentes applications de biotechnologies telles que des cages moléculaires<sup>18</sup>.

Cependant, afin de d'améliorer le processus d'assemblage des peptides LAH4 en assemblages supramoléculaires, l'obtention de plus amples informations sur les interactions fondamentales provoquant la fibrillation des peptides Vectofusin-1 est nécessaire. Ainsi, comprendre les interactions qui permettent d'associer deux monomères ensemble ainsi que les interactions entre les monomères et le groupement phosphate nécessaire au processus de fibrillation pourra à l'avenir nous permettre d'orienter l'assemblage supramoléculaire des fibrilles de Vectofusin-1.

## Impact du pH

Les conditions de fibrillations utilisant des pH de 4 et 6 n'ont pas induit d'agrégation visible et après centrifugation, aucun culot n'a été observé. Les surnageants ont été déposés sur grille et aucune formation de fibres a été observée. La figure 43 présente des clichés de TEM de fibrilles de Vectofusin-1 obtenues en utilisant des tampons à pH 7,5 (a), 9,6 (b) et 11 (c). Les fibrilles formées à pH 7,5 sont conformes à la morphologie décrite par Lointier *et al.*<sup>58</sup>, les fibres sont de longueur proche de 500nm et s'assemblent en matrices alvéolées. En revanche, les agrégats formés en utilisant un tampon à pH 9,6 ne forment pas de fibrilles allongées mais forment de larges feuillets de plusieurs  $\mu\text{m}^2$  de surface qui ont tendance à se replier sur eux-mêmes. Enfin, pour les fibrilles formées à un pH de 11, on n'observe plus aucune organisation en fibrilles mais des amas de peptides sphériques très denses d'environ 10 nm.

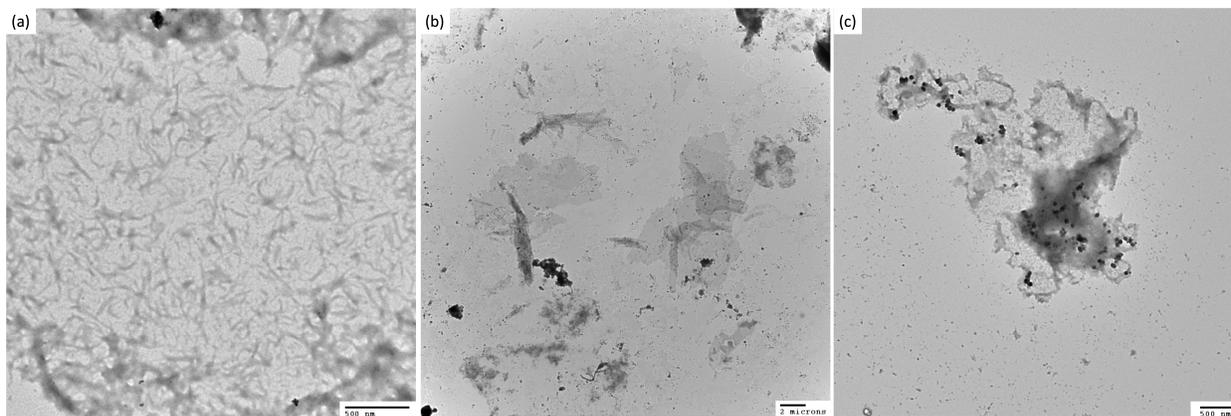


Figure 43 – Fibrilles de Vectofusin-1 formées à différents pH (a) pH 7,5 ; (b) pH 9,6 (c) ; pH 11

Les acides aminés lysine et histidine jouent un rôle clé dans la structure et la fonction des protéines, en grande partie en raison de leurs pKa respectifs. La lysine possède une chaîne latérale avec un groupe amine dont le pKa est d'environ 10,5. Cela signifie qu'à un pH inférieur à cette valeur, le groupe amine reste protoné et donc chargé positivement, tandis qu'à un pH supérieur à 10,5, il perd son proton et devient neutre. L'histidine, quant à elle, contient un noyau imidazole dont le pKa est autour de 6,0. Ce pKa relativement bas signifie qu'à un pH inférieur à 6,0, l'histidine est principalement protonée et chargée positivement, alors qu'à un pH plus élevé, elle est déprotonée et neutre. Ces propriétés de pKa influencent la manière dont ces acides aminés interagissent dans les protéines, affectant ainsi la structure, la stabilité et la fonction des protéines dans les environnements biologiques.

Dans le cadre des assemblages de Vectofusin-1, les peptides au sein des fibrilles formées à un pH de 7,5 ont donc les chaînes latérales des histidines déprotonées et les chaînes latérales des lysines entièrement protonées.

En revanche, dans les assemblages formées à pH 9,6, le pH est suffisamment proche du pKa des chaînes latérales des lysines pour qu'une partie d'entre elles soient déprotonées. Enfin, à un pH de 11, l'ensemble des chaînes latérales sont déprotonées.

Notre hypothèse est donc que les résidus lysines et histidines sont les résidus clés de l'assemblage des peptides Vectofusin-1 en fibrilles. De plus, le pH influence de manière cruciale l'assemblage des peptides en modifiant l'état de protonation des chaînes latérales des résidus, ce qui entraîne une variation de la charge apparente du peptide. Cette variation de charge affecte directement les interactions entre les peptides eux-mêmes ainsi que leurs interactions avec le solvant environnant.

Il est par conséquent nécessaire de caractériser les interactions entre les peptides et les interactions entre les peptides et leur environnement, le tampon phosphate, afin de pouvoir établir un modèle des fibrilles de Vectofusin-1.

## 3.2 Modélisation moléculaire et prédictions de structures des assemblages de Vectofusin-1

La compréhension des structures formées par les assemblages supramoléculaires de la Vectofusin-1 est cruciale pour l'exploitation de ses propriétés dans des applications thérapeutiques et biotechnologiques. Notre objectif est de mettre en évidence les caractéristiques structurales des assemblages de Vectofusin-1, d'identifier les interactions clés qui conduisent à leur formation et d'évaluer les implications pour leurs propriétés fonctionnelles. Cependant, la nature complexe des interactions non covalentes et du comportement dynamique des chaînes peptidiques représente un défi pour établir des modèles moléculaires<sup>100</sup>.

Dans ce contexte, les approches *in silico* de modélisation moléculaire, sont devenues des outils très utiles. En particulier, les algorithmes de prédiction de structures protéiques 3D à partir de séquence primaire ont connu de grandes avancées ces dernières années<sup>21,68</sup>.

AlphaFold, un système de prédiction de structures 3D basé sur l'IA développé par DeepMind a révolutionné le domaine de la biologie structurale en atteignant une précision sans précédent dans la prédiction de la structure des protéines. En utilisant des techniques d'apprentissage (deep learning) et les bases de données de structures protéiques déterminées expérimentalement (X-ray-diffraction, RMN, Cryo-EM), AlphaFold peut prédire la structure 3D des peptides et des protéines à partir de leurs séquences d'acides aminés avec précision. Cette capacité s'étend à la prédiction d'assemblages supramoléculaires, offrant un aperçu de leur organisation structurale et de leurs fonctionnalités potentielles<sup>45</sup>.

Dans ce travail, nous avons cherché à utiliser les prédictions de structures d'AlphaFold en plus des méthodes expérimentales afin d'élucider les mécanismes responsables de l'activité et de la stabilité des fibres de Vectofusin-1. En prédisant la structure 3D des assemblages de Vectofusin-1, nous espérons mieux comprendre les préférences conformationnelles et proposer un modèle décrivant les interactions du peptide.

Nous avons utilisé deux versions différentes d'AlphaFold, AlphaFold multimer qui est une version de l'algorithme qui est basée sur AlphaFold 2 et optimisée pour l'élaboration de modèles d'assemblages de protéines oligomériques<sup>25</sup>. Cette version devrait donc être particulièrement utile pour la prédiction de la formation des fibrilles.

La seconde version que nous avons employé est la version AlphaFold 3, cette version est la plus récente et présente des fonctionnalités accrues telles que la possibilité d'ajouter de certains ligands et ions dans le système, ce qui est particulièrement intéressant étant donné le rôle de l'ion phosphate dans le processus d'assemblage. Elle permet en outre d'incorporer des séquences d'acides nucléiques, fonctionnalité qui sera utile pour l'étude des propriétés de vectorisation de nos peptides avec des molécules ADN ou ARN.

### 3.2.1 Indices de confiance

Les deux versions d'AlphaFold que nous avons employé utilisent le même indice de confiance pour déterminer la qualité des modèles fournis<sup>45</sup>.

Le pLDDT (predicted Local Distance Difference Test) est une estimation de la confiance par atome sur une échelle de 0 à 100, où une valeur plus élevée indique une plus grande confiance. Le pLDDT mesure la confiance dans la structure locale, en estimant le degré de concordance entre la prédiction et une structure expérimentale. Il est basé sur le test de différence de distance locale  $C\alpha$  (lDDT- $C\alpha$ ), qui est un score qui ne repose pas sur la superposition mais évalue l'exactitude des distances locales<sup>67</sup>.

Les régions dont le pLDDT est  $> 90$  sont censées être modélisées avec une grande précision. Elles devraient convenir à toute application bénéficiant d'une grande précision (par exemple, la caractérisation des sites de liaison).

Les régions dont le pLDDT est compris entre 70 et 90 devraient être bien modélisées (prédiction généralement bonne du squelette peptidique).

Les régions dont le pLDDT est compris entre 50 et 70 sont peu fiables et doivent être traitées avec prudence.

La version AlphaFold 3 inclut aussi deux autres indices de confiance, la PAE et le pTM.

La PAE (predicted aligned error) est une estimation de l'erreur de position et d'orientation relatives entre deux tokens dans la structure prédite. Des valeurs élevées indiquent une erreur prédite plus importante et donc une confiance plus faible.

Le pTM (predicted template modeling : pTM) et l'ipTM (interface predicted template modeling) sont tous deux dérivés d'une mesure appelée TM (template modeling) qui est un

score de modélisation des modèles. Celui-ci mesure la précision de la structure entière<sup>120</sup>. Un score pTM supérieur à 0,5 signifie que le repliement global prédit pour le complexe pourrait être similaire à la structure réelle.

### 3.2.2 Matériel et méthode

La séquence primaire du peptide Vectofusin-1 (KKALL HAALA HLLAL AHHLL ALLKK A) a été fournie aux deux versions du logiciel et des modèles d'assemblages de 2, 3, 4, 6, 8 et 10 peptides ont été calculés. Cette opération a été répétée 4 fois pour chaque logiciel.

### 3.2.3 Résultats

Parmi tous les modèles obtenus, les modèles possédant les indices de confiance les plus hauts sont ceux obtenus pour un assemblage de 4 peptides Vectofusin-1.

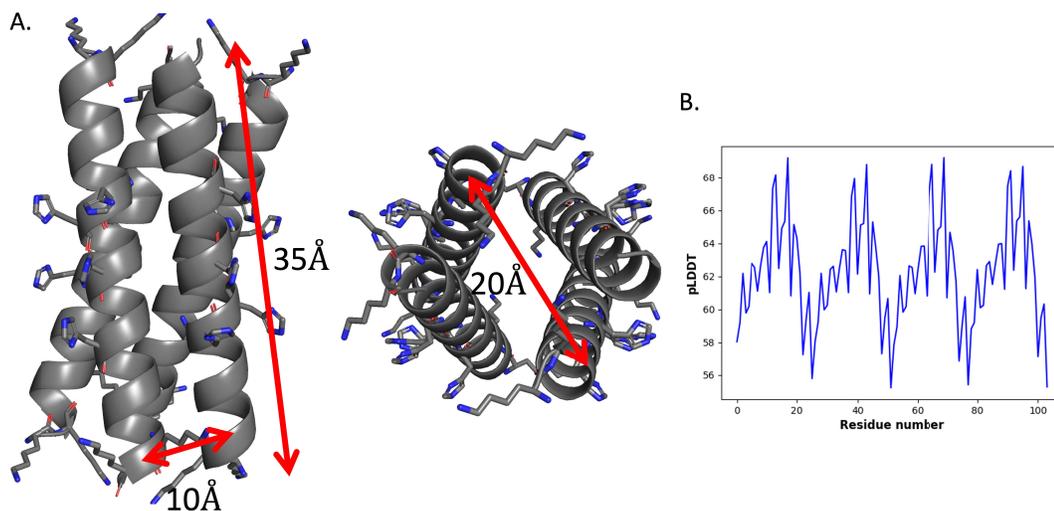


Figure 44 – A. Modèle obtenu pour un assemblage de 4 monomères de peptide Vectofusin-1 via AlphaFold 2 multimer. B. Indice de confiance pLDDT du modèle

Dans le cas d'un assemblage de 4 peptides, le logiciel AlphaFold 2 multimer produit le modèle présenté sur la figure 44. Les peptides sont dans une conformation antiparallèle et plusieurs distances peuvent être mesurées dans ce modèle, chaque hélice possède une longueur de 35 Å, la distance entre deux peptides côte à côte est de 10 Å et la distance entre

deux peptides opposés aux extrémités et de 20Å. Ces distances semblent cohérentes avec les données obtenues précédemment par notre équipe. En effet, les travaux de Vermeer *et al.*<sup>108</sup> ont montré que les fibrilles de Vectofusin-1 sont formées d'une répétition d'unité de 10Å qui a été observée par microscopie à force atomique. De plus, les travaux de Lointier *et al.*<sup>58</sup> ont montré que des spectres SAXS (Small Angle X-ray Scattering) et WAXS (Wide Angle X-ray Scattering) des fibrilles de Vectofusin-1 présentent des distances de 35Å et 4Å correspondant respectivement à la longueur et au pas de l'hélice, ainsi que des distances de 10Å et 20Å qui n'avaient alors pas trouvé d'explications.

L'indice de confiance pour chaque résidu du modèle est présenté sur la figure 44B. On peut observer que l'indice de confiance forme un motif répété et que pour chaque monomère, le pLDDT varie autour de 65 pour les résidus situés au centre des monomères et descend autour de 58 pour les résidus situés aux extrémités des monomères. Cet indice indique que le modèle fourni par AlphaFold 2 multimer est d'un degré de confiance peu élevé et donc peu vraisemblable.

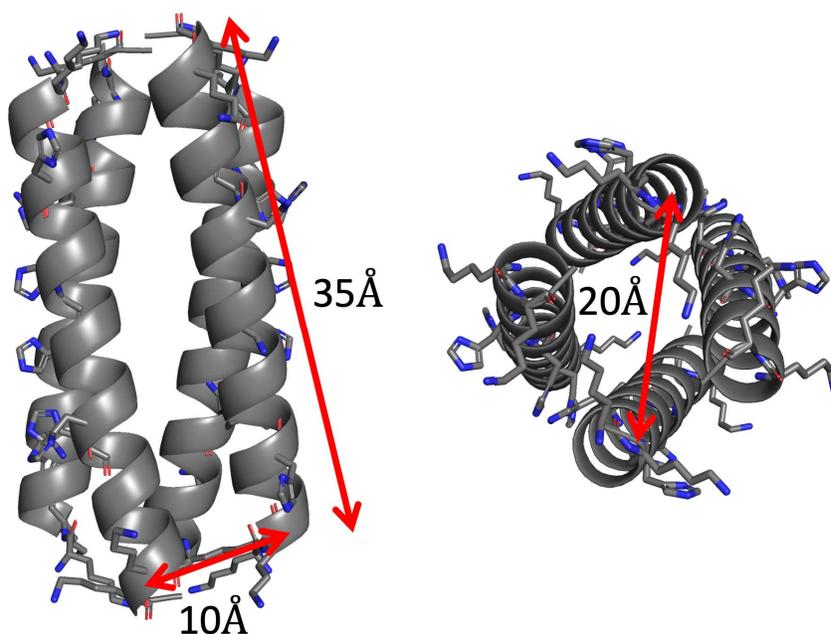


Figure 45 – Modèle obtenu pour un assemblage de 4 monomères de peptide Vectofusin-1 via AlphaFold 3.

Le modèle présenté sur la figure 45 est celui obtenu via AlphaFold 3 pour un assemblage de 4 peptides. A l'instar du modèle produit par AlphaFold multimer, les peptides s'assemblent

de manière antiparallèle et les distances de 10Å et 20Å entre les monomères sont semblables.

Sur la figure 46, on peut observer que l'indice de confiance pLDDT est supérieur à 90 pour la quasi totalité du modèle. De plus, les indices ipTM et pTM pour ce modèle ont respectivement une valeur de 0,73 et 0,77. La figure 47 représente la PAE du modèle, et on peut observer que pour chaque résidu, la PAE est proche de 0Å.

L'ensemble de ces marqueurs indiquent ainsi que le modèle fourni par Alphafold 3 est d'un degré de confiance élevé et donc supposément fiable.

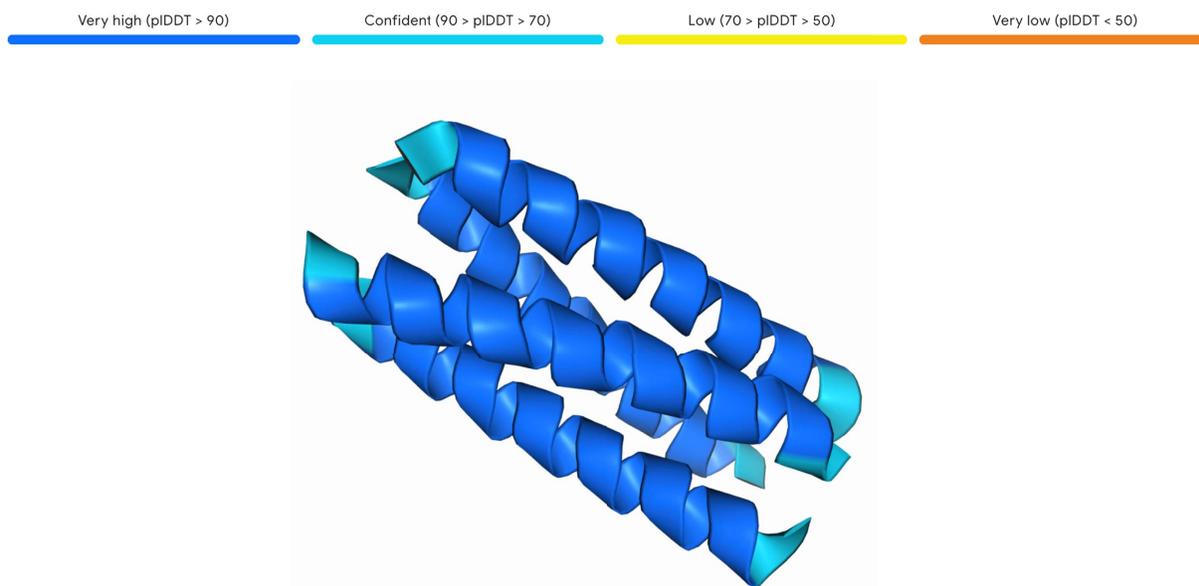


Figure 46 – Indice de confiance pLDDT pour le modèle obtenu pour un assemblage de 4 monomères de peptide Vectofusin-1 via Alphafold 3.

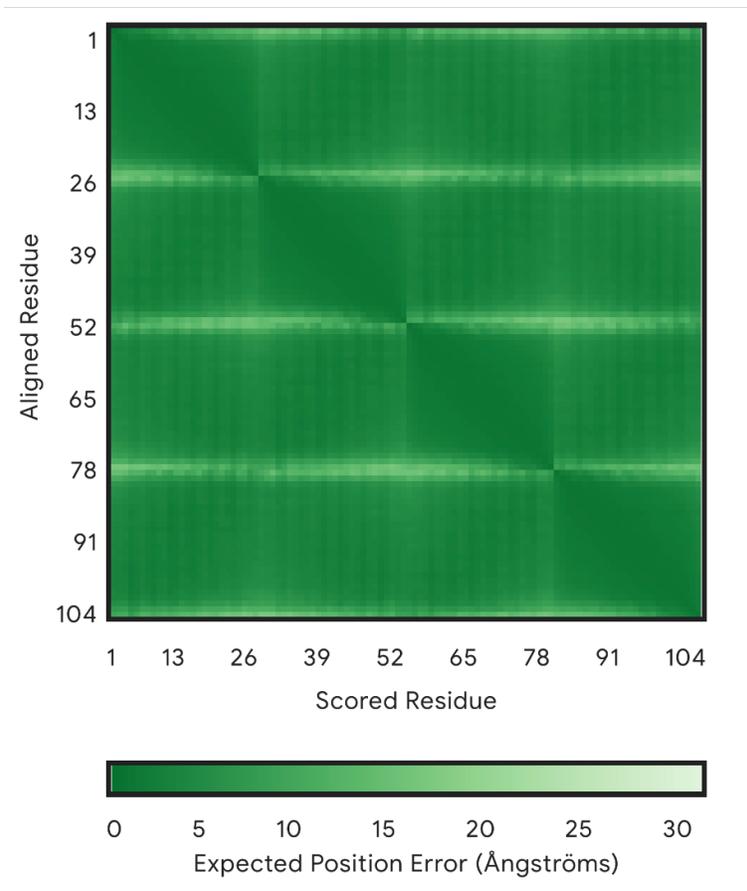


Figure 47 – Score PAE pour le modèle obtenu pour un assemblage de 4 monomères de peptide Vectofusin-1 via Alphafold 3.

## Comparaison entre les modèles

Comme le montre la figure 48, les deux modèles présentent des assemblages similaires, mais l'orientation des peptides au sein de ces assemblages diffère entre les modèles. En effet, sur le modèle prédit par AlphaFold 2 multimer (figure 48A.), on peut observer que les histidines de chaque peptide sont disposées face au solvant, complètement à l'extérieur de l'assemblage.

En revanche, sur le modèle prédit par AlphaFold 3 (figure 48B.) les histidines de deux peptides côte à côte sont proches, suggérant une interaction stabilisatrice de type  $\pi$ -stacking. Cette disposition des histidines pourrait être la raison pour laquelle le modèle prédit par AlphaFold 3 est plus robuste et serait en accord avec les résultats obtenus plus tôt dans ce chapitre insistant sur l'importance des histidines dans la stabilité des assemblages de Vectofusin-1.

De plus, les prédictions d'assemblages formés par 4 peptides Vectofusin-1 proposent des modèles dont la structure semble similaire à d'autres structures  $\alpha$ -hélicales formées par des peptides amphiphiles telles que celles décrites par Beesley et Woolfson<sup>9,79</sup>.

Néanmoins, afin de confirmer les informations prédites par ces modèles, il est indispensable de valider nos hypothèses par des méthodes expérimentales de biologie structurale.

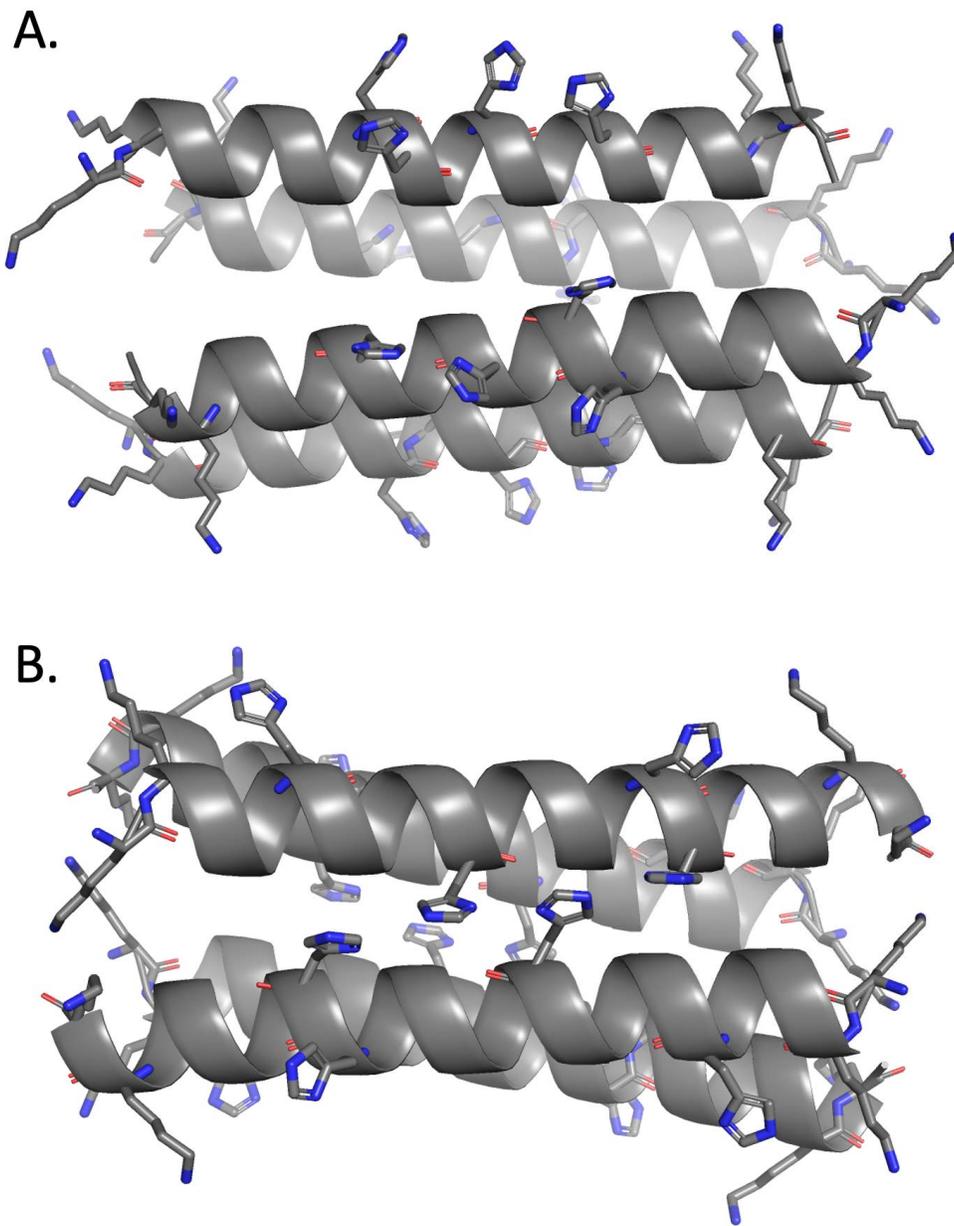


Figure 48 – Comparaison des modèles obtenus pour un assemblage de 4 monomères de peptide Vectofusin-1 : A. Modèle obtenu via AlphaFold 2 multimer. B. Modèle obtenu via AlphaFold 3.

## 3.3 Etude par RMN du solide des interactions dans les assemblages de peptides Vectofusin-1

### 3.3.1 Introduction à la RMN

#### Principes physiques

La Résonance Magnétique Nucléaire est une technique analytique puissante utilisée en chimie et biologie pour déterminer la structure des molécules, analyser les compositions chimiques, et réaliser des images médicales par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique).

Le phénomène de RMN provient du fait que certains noyaux possèdent un spin et un moment magnétique.

L'effet Zeeman décrit l'interaction entre les moments magnétiques nucléaires et le champ magnétique externe appliqué. Lorsque des noyaux possédant un spin sont placés dans un champ magnétique, leurs moments magnétiques s'alignent soit parallèlement, soit antiparallèlement au champ. Ce phénomène divise les niveaux d'énergie des noyaux en deux états distincts, créant une différence d'énergie proportionnelle à l'intensité du champ magnétique appliqué<sup>87, 48, 56</sup>.

Mathématiquement, l'énergie de ces niveaux est donnée par l'expression :

$$E = -\mu \cdot B_0$$

où  $\mu$  est le moment magnétique nucléaire et  $B_0$  est l'intensité du champ magnétique. Les noyaux dans l'état de plus basse énergie (alignés avec le champ) peuvent absorber de l'énergie sous forme d'une onde radiofréquence pour passer à l'état de plus haute énergie (opposé au champ). On observe ensuite le retour à l'équilibre.

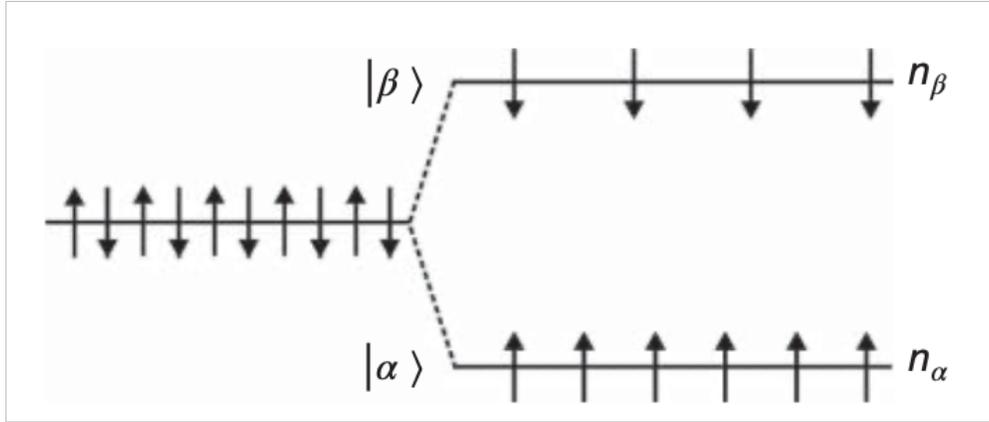


Figure 49 – Représentation schématique des populations des deux états d'un noyau de spin-1/2 sous l'effet d'un champ magnétique externe. Les flèches pointées vers le haut représentent la population  $\alpha$  et les flèches pointées vers le bas représentent la population  $\beta$ . Puisque les deux populations ne sont pas équivalentes, c'est la différence entre les deux états qui est observée. Image tirée de<sup>87</sup>

Cependant, lorsqu'un moment magnétique nucléaire est placé dans un champ magnétique externe  $B_0$ , il ne s'aligne pas immédiatement avec ce champ. Au lieu de cela, il tourne autour de la direction du champ magnétique selon un mouvement circulaire appelé précession<sup>87, 48, 56</sup>.

Ce mouvement de précession est similaire à celui d'une toupie qui, lorsqu'elle penche, tourne autour d'un axe vertical tout en restant inclinée. En RMN, l'axe vertical correspond à la direction du champ magnétique externe  $B_0$ , et le mouvement de rotation correspond à la précession des moments magnétiques des noyaux autour de ce champ.

La fréquence de cette précession est la fréquence de Larmor et est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique  $B_0$  et au rapport gyromagnétique  $\gamma$  du noyau. Elle est donnée par la relation :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

où :

- $\nu_0$  est la fréquence de Larmor.
- $\gamma$  est le rapport gyromagnétique du noyau (une constante propre à chaque type de noyau).
- $B_0$  est l'intensité du champ magnétique externe.

Cette précession est fondamentale pour la RMN, car c'est en appliquant une onde radio-fréquence (RF) à la fréquence de Larmor que l'on peut exciter les noyaux et provoquer une transition entre leurs états d'énergie. Lorsque l'excitation est arrêtée, les noyaux reviennent à leur état d'équilibre en émettant une onde de même fréquence, qui est détectée pour produire le spectre RMN.

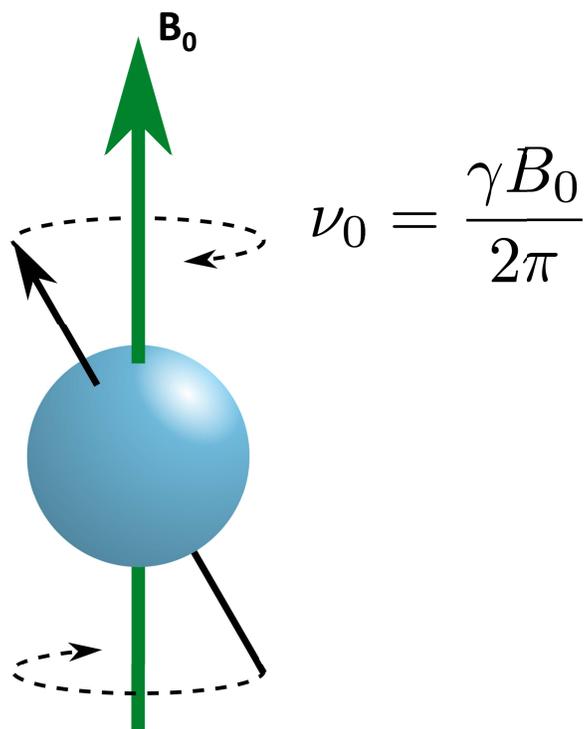


Figure 50 – Représentation schématique de la précession d'un moment magnétique nucléaire autour d'un champ externe  $B_0$

Le rapport gyromagnétique  $\gamma$  qui peut être exprimé par l'équation  $\gamma = \frac{\mu}{J}$  est une propriété fondamentale d'une particule telle qu'un noyau ou un électron, qui détermine son moment magnétique  $\mu$  par rapport à son moment angulaire  $J$ <sup>48,56</sup>.

Chaque noyau possède un rapport gyromagnétique unique, qui détermine sa fréquence de résonance dans un champ magnétique. Le rapport gyromagnétique dépend des propriétés du noyau, telles que sa masse, sa charge et son spin<sup>48,56</sup>.

Le rapport gyromagnétique est un paramètre important en spectroscopie RMN, car il permet de calculer les fréquences de résonance nécessaires à l'élaboration des expériences RMN. La mesure précise et la connaissance des rapports gyromagnétiques de différents noyaux

sont essentielles pour la détermination exacte des déplacements chimiques, des constantes de couplage et d'autres paramètres de la RMN<sup>48,56</sup>.

Les rapports gyromagnétiques des noyaux les plus fréquemment utilisés lors d'études par RMN des biomolécules sont décrits dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 – Caractéristiques des principaux isotopes utilisés en RMN des protéines

Noyau	Spin	Abondance naturelle (%)	Rapport gyromagnétique ( $10^6 \text{ rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$ )
<sup>1</sup> H	1/2	99,9885	267,513
<sup>2</sup> H	1	0,0115	41,066
<sup>12</sup> C	0	98,8	-
<sup>13</sup> C	1/2	1,07	67,262
<sup>14</sup> N	1	99,636	19,338
<sup>15</sup> N	1/2	0,364	-27,116
<sup>16</sup> O	0	99,7	-
<sup>31</sup> P	1/2	100	108,291

## Spin nucléaire

Seuls les noyaux de spin non nul possèdent un moment magnétique et peuvent être étudiés en RMN. En RMN des protéines, les noyaux principalement étudiés sont le <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, le proton et le deutérium.

Le noyau <sup>13</sup>C est utilisé car le <sup>12</sup>C, isotope le plus abondant du carbone, possède un spin nul, il est donc invisible en RMN.

Par ailleurs, il est plus facile d'étudier des noyaux de spin égal à 1/2, d'où la préférence pour l'isotope <sup>15</sup>N de l'azote, pourtant moins abondant que le <sup>14</sup>N.

Le rapport signal/bruit en RMN est proportionnel à  $\gamma^{5/2}B_0^{3/2}$  ( $B_0$  étant le champ magnétique externe)<sup>56</sup>. Les noyaux <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N étant peu abondants et peu sensibles à cause de leur faible  $\gamma$ , il est donc préférable de travailler avec des protéines enrichies isotopiquement en <sup>13</sup>C et <sup>15</sup>N. De plus, pour obtenir un meilleur rapport signal/bruit, il est préférable de travailler à un champ magnétique  $B_0$  aussi haut que possible<sup>104</sup>.

Un spin nucléaire dans un champ magnétique est soumis à des interactions externes entre son moment magnétique et le champ qui lui est appliqué mais il est aussi soumis à des interactions internes avec les autres spins et avec les électrons. La somme de ces interactions est représentée par l'Hamiltonien

$$H_{\text{int}} = H_{\text{CS}} + H_{\text{D}} + H_{\text{J}} + H_{\text{Q}}$$

où :

- $H_{\text{CS}}$  est l'Hamiltonien de déplacement chimique, l'effet d'écran des électrons autour du noyau qui est influencé par l'environnement chimique du noyau déterminé par la forme du nuage électronique.
- $H_{\text{D}}$  représente les interactions dipolaires entre spins voisins dans l'espace.
- $H_{\text{J}}$  sont les couplages scalaires ou couplages J entre deux spins par les électrons de liaison.
- $H_{\text{Q}}$  sont les interactions quadripolaires, pour les noyaux de spin supérieur ou égal à 1 et ne concernent donc pas les noyaux ayant un spin égal à 1/2.

Certaines de ces interactions possèdent une partie anisotrope, c'est-à-dire dépendante de l'orientation des molécules par rapport au champ  $B_0$ .

## Rotation à l'angle magique

La RMN à l'état solide présente des spécificités distinctes par rapport à la RMN du liquide en raison de la différence dans la dynamique moléculaire des échantillons. Dans les solides, les molécules sont immobiles ou très faiblement mobiles, entraînant un fort élargissement des pics de résonance dû aux interactions dipolaires et à l'anisotropie du déplacement chimique. Cela contraste avec la RMN du liquide, où les mouvements rapides des molécules moyennent ces interactions, conduisant à des spectres plus fins et plus faciles à interpréter. Pour atténuer ces effets dans la RMN du solide, des techniques comme la rotation à l'angle magique (MAS) ou le découplage dipolaire sont utilisées afin de rétrécir les raies spectrales et d'obtenir des informations plus précises sur la structure et la dynamique des solides. Ainsi, la RMN du solide nécessite une instrumentation et des méthodes spécifiques, adaptées à la rigidité des échantillons étudiés<sup>48, 56, 87</sup>.

La rotation à l'angle magique est une technique utilisée en RMN à l'état solide pour améliorer la résolution et la qualité spectrale des signaux RMN provenant d'échantillons solides. Elle consiste à faire tourner l'échantillon à un angle spécifique de  $54,74^\circ$ , appelé angle magique, par rapport au champ magnétique externe<sup>3</sup>. Cet effet est détaillé dans la figure 51.

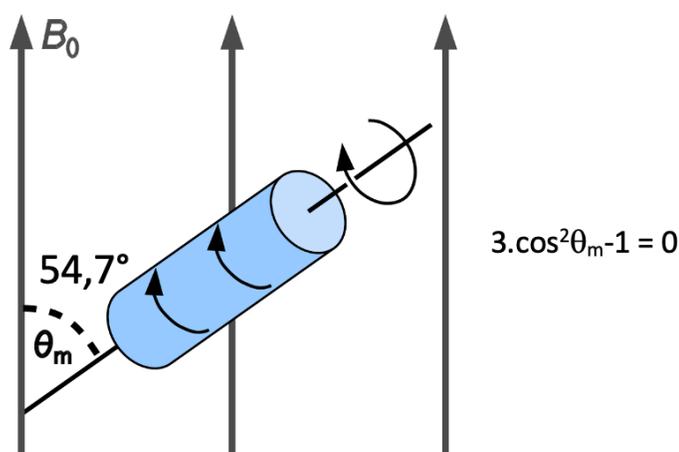


Figure 51 – Schéma descriptif de la rotation à l'angle magique. L'interaction dipolaire nucléaire dépend de  $3 \cos^2 \theta - 1$  où  $\theta$  est l'angle entre l'axe internucléaire et le champ magnétique  $B_0$ . Par conséquent, l'interaction dipolaire est moyennée à l'angle magique  $m = 54,74^\circ$  et l'interaction contribuant à l'élargissement de la raie est supprimée à condition que la vitesse de rotation soit supérieure à l'anisotropie mesurée en Hz.

La technique de rotation à l'angle magique permet de moyenniser les couplages dipolaires anisotropes entre les spins nucléaires de l'échantillon. Lorsque l'échantillon tourne rapidement à l'angle magique, les interactions de couplage dipolaire ainsi que l'effet de l'anisotropie de déplacement chimique sont plus ou moins moyennés en fonction de la vitesse de rotation, ce qui permet d'obtenir des signaux plus fins et ainsi une meilleure résolution spectrale. Cela permet d'étudier des matériaux solides, tels que des cristaux, des polymères et autres échantillons biologiques qui présenteraient autrement des spectres RMN extrêmement larges. Dans un solide, les couplages  $J$  sont souvent négligés car bien plus faibles que les autres types d'interactions<sup>4</sup>.

En utilisant cette technique, des bandes latérales de rotation peuvent apparaître sur les spectres. Ce sont des signaux fins séparés des fréquences de résonances isotropes par un multiple de la vitesse de rotation.

La rotation de l'échantillon est réalisée en pratique par un mécanisme de turbine à air, où le rotor contenant l'échantillon est soulevé par un gaz comprimé porteur pour éliminer les frottements (bearing), puis la rotation est assurée par un flux au niveau de la turbine (drive). Les rotors sont des cylindres creux de différents diamètres extérieurs allant de 7 mm à 0,5 mm, montés avec un capuchon de turbine. Les rotors sont généralement fabriqués en oxyde de zirconium. Les capuchons amovibles qui ferment les extrémités du tube peuvent être fabriqués en différents matériaux tels que le Kel-F, Vespel, ou zircone et nitrure de bore selon les conditions expérimentales.

Grâce à ce système de flux d'air, le rotor tourne rapidement autour de son axe à l'angle magique à des fréquences de rotation comprises entre plusieurs kHz pour les rotors les plus larges et jusqu'à plus de 100 kHz pour les rotors de diamètre 0.7mm et inférieur.

À des vitesses de rotation supérieures à 50kHz, les couplages dipolaires sont suffisamment réduits pour réaliser des expériences en détection proton<sup>29,4</sup>.

## **Polarisation croisée**

La polarisation croisée (CP : Cross Polarization) est une technique utilisée en spectroscopie RMN à l'état solide pour renforcer l'intensité du signal des noyaux à faible  $\gamma$  (tels que le  $^{13}\text{C}$ , le  $^{15}\text{N}$  et le  $^{31}\text{P}$ ) en leur transférant la polarisation d'un noyau à fort  $\gamma$  tel que le  $^1\text{H}$ . Cette technique exploite le couplage dipolaire entre les deux types de noyaux.

En pratique, l'échantillon est d'abord soumis à une impulsion de  $90^\circ$  sur les protons. L'échantillon est ensuite soumis à une deuxième impulsion de radiofréquence qui permet aux noyaux  $^1\text{H}$  d'entrer en résonance avec le noyau à plus faible  $\gamma$  auquel on souhaite transférer l'aimantation dans le référentiel tournant. Au cours de cette deuxième impulsion, les noyaux  $^1\text{H}$  transfèrent leur polarisation au noyau à faible  $\gamma$  par couplage dipolaire.

La CP est particulièrement utile pour l'étude d'échantillons biologiques à l'état solide où les noyaux à faible  $\gamma$  et aux temps de relaxation plus long présentent des signaux faibles. En utilisant la CP, il est possible de renforcer les signaux de ces noyaux et d'obtenir des informations structurales et dynamiques précieuses sur l'échantillon<sup>87</sup>.

Cette technique est la technique fondamentale sur laquelle vont reposer l'ensemble des expériences réalisées au cours de cette étude.

La condition de Hartmann-Hahn est un principe fondamental de la spectroscopie RMN à l'état solide qui décrit le transfert efficace de l'aimantation entre deux types de noyaux différents par couplage dipolaire.

La condition Hartmann-Hahn stipule que pour qu'une polarisation croisée efficace se produise entre deux noyaux, la fréquence de l'impulsion radiofréquence appliquée à un noyau doit correspondre à la fréquence de Larmor de l'autre noyau dans le référentiel tournant. En d'autres termes, la condition de résonance doit être satisfaite.

La condition de Hartmann-Hahn pour un transfert optimal d'aimantation entre deux noyaux  $S$  et  $I$  peut être exprimée ainsi :

$$\gamma_S B_1^S = \gamma_I B_1^I$$

où :

- $\gamma_S$  et  $\gamma_I$  sont les rapports gyromagnétiques des noyaux  $S$  et  $I$ .
- $B_1^S$  et  $B_1^I$  sont les amplitudes des champs RF appliqués.

En satisfaisant la condition de Hartmann-Hahn, la polarisation du spin d'un noyau peut être efficacement transférée à l'autre noyau, ce qui permet d'améliorer les signaux RMN. Ceci est particulièrement utile dans les expériences de RMN à l'état solide où la sensibilité de certains noyaux est faible<sup>87</sup>.

Dans les expériences traditionnelles de polarisation croisée, la condition de Hartmann-Hahn est satisfaite par l'application d'une simple impulsion radiofréquence pour transférer l'aimantation. Cependant, dans certains cas, l'utilisation d'impulsions adiabatiques peut améliorer l'efficacité du transfert de polarisation.

La réalisation d'un passage adiabatique à travers la condition de Hartmann-Hahn ou APHH (Adiabatic Passage through the Hartmann-Hahn Condition) est une technique utilisée pour obtenir une polarisation croisée efficace entre les noyaux grâce à des impulsions adiabatiques. Cette technique consiste à faire varier l'intensité de l'impulsion pendant la durée de celle-ci, couvrant ainsi toute la fenêtre des conditions Hartmann-Hahn. Cette impulsion adiabatique garantit que la condition de résonance est satisfaite à tout moment pendant l'impulsion, ce qui permet une polarisation croisée efficace et à large bande<sup>39</sup>.

## Nutation

L'ajustement correct des fréquences d'impulsion radiofréquence et des intensités de champ est crucial pour remplir la condition de Hartmann-Hahn et obtenir une polarisation croisée efficace.

Dans le contexte de la spectroscopie RMN, la nutation désigne la précession du vecteur d'aimantation du spin nucléaire autour du champ magnétique de l'impulsion. Elle décrit le mouvement de l'aimantation lorsqu'elle subit l'effet d'une impulsion radiofréquence.

Lorsqu'une impulsion RF est appliquée à un échantillon, elle crée un champ magnétique oscillant à une fréquence spécifique. Ce champ RF est généralement appliqué perpendiculairement au champ magnétique statique, ce qui entraîne la précession des spins nucléaires autour du champ magnétique effectif. Pendant la nutation, les spins nucléaires tournent ou "nutent" autour du champ effectif à la même fréquence que l'impulsion RF.

Ce phénomène permet alors de déterminer le champ effectif obtenu pour une impulsion radiofréquence délivrée à une puissance connue en Watts. Connaître les champs effectifs précisément pour chaque noyau nous permet ainsi de remplir la condition de Hartmann-Hahn et ainsi avoir des CP avec un transfert d'aimantation optimal.

### 3.3.2 La RMN du solide pour l'étude d'échantillons protéiques

Dans les échantillons biologiques, la RMN du solide est utilisée pour étudier la structure moléculaire et la dynamique des protéines, des membranes et d'autres macromolécules biologiques dans leur état natif<sup>118</sup>. Il est possible d'obtenir des informations sur leur structure tridimensionnelle, leurs changements de conformation et leurs interactions avec d'autres molécules.

La RMN du solide peut être utilisée pour étudier un large éventail de systèmes biologiques tels que des protéines microcristallines<sup>51</sup>, les protéines dans les membranes<sup>50</sup>, les fibrilles amyloïdes associées aux maladies neurodégénératives<sup>62</sup>, ou des protéines sédimentées<sup>32</sup> et des acides nucléiques<sup>15</sup>.

L'un des avantages de la RMN du solide par rapport à d'autres techniques est qu'elle peut fournir des informations sur la structure et la dynamique des molécules biologiques dans des conditions naturelles, sans qu'il soit nécessaire de les cristalliser ou de les soumettre à d'autres conditions artificielles susceptibles d'en modifier les propriétés.

En RMN, à mesure que la taille moléculaire de l'échantillon augmente, le signal RMN diminue et finit par disparaître. En effet, lorsque la taille moléculaire augmente, la vitesse de rotation de la molécule diminue. Ce ralentissement entraîne une augmentation du temps de corrélation rotationnelle ( $\tau_c$ ) qui influence l'élargissement des raies observé dans les spectres RMN. Une rotation plus rapide ( $\tau_c$  plus petit) conduit à des pics plus étroits, tandis qu'une rotation plus lente ( $\tau_c$  plus grand) conduit à des pics plus larges.

De plus, plus la taille d'une protéine est élevée, plus le nombre de résonances observées dans un spectre va être élevé. Dans ce cas, si la dispersion des pics peut ne pas être suffisante, le recouvrement des pics rendant impossible l'attribution des résonances.

Ainsi, les protéines de plus de 50 kDa sont difficiles voire impossible à étudier via des expériences RMN conventionnelles, l'utilisation de spectromètres RMN à haut champ associée à la deutération de l'échantillon protéique afin de réduire le nombre de signaux protons permet d'étudier des échantillons de poids moléculaire plus élevé, mais avec une difficulté accrue dans l'interprétation des données.

En RMN à l'état solide, l'utilisation de la technique MAS permet de compenser le peu de mouvements moléculaires. Il n'y a donc pas de limite théorique de la taille de l'échantillon comme c'est le cas en RMN en solution, ce qui permet de travailler sur des complexes de

plus grande taille.

## La détection hétéronucléaire

Classiquement en RMN du solide, les protéines sont étudiées par détection hétéronucléaire où le noyau détecté est différent de l'élément principal dans un échantillon. Dans un échantillon biologique, cela revient à détecter des noyaux tels que le  $^{13}\text{C}$  ou le  $^{15}\text{N}$ . Ces noyaux ont des  $\gamma$  plus faibles que les noyaux  $^1\text{H}$ . En conséquence, leurs signaux RMN sont souvent plus faibles.

Cependant, les hétéronoyaux ont une gamme de déplacements chimiques plus grande que celle des protons. Cela permet une meilleure dispersion des pics dans les spectres RMN, ce qui facilite l'attribution précise des groupes fonctionnels dans une molécule. Des expériences tirant parti de cette propriété peuvent ainsi fournir des informations structurales spécifiques à certaines régions de la molécule<sup>86</sup>.

Le désavantage de cette technique est que les expériences sont longues à réaliser. En effet, les noyaux  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  ont une abondance naturelle très faible et sont peu sensibles ( $\gamma$  faible) et nécessitent donc de réaliser de nombreux scans. L'utilisation de protéines marquées isotopiquement  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  est utilisée pour pallier ce problème<sup>104</sup>.

## La détection proton

Le développement de la détection proton en RMN à l'état solide permet désormais d'effectuer des expériences ayant des temps d'acquisition beaucoup plus courts car le proton est un noyau bien plus sensible que le  $^{13}\text{C}$  ou le  $^{15}\text{N}$ <sup>429</sup>.

Cependant, la détection proton nécessite d'atteindre de hautes fréquences de rotation afin d'affiner suffisamment les raies obtenues sur les spectres. Afin d'obtenir de hautes fréquences de rotation, le rotor doit être de petite taille (1.3mm ou inférieure) ce qui implique une baisse de la quantité d'échantillon qui peut être mise dans le rotor et donc un signal plus faible.

Mais cet effet est en grande partie compensé par la meilleure sensibilité des petites bobines des sondes MAS, ainsi que la possibilité de détecter le proton qui est un noyau plus sensible que le  $^{13}\text{C}$  ou le  $^{15}\text{N}$ . De plus, le découplage hétéronucléaire est efficace à plus faible puissance que pour des basses fréquences de rotation, ce qui limite l'échauffement des échantillons sensibles tels que les protéines.

Afin de réaliser l'attribution séquentielle des résonances d'une protéine, il est nécessaire de réaliser différentes expériences complémentaires qui permettent de relier un même atome au résidu  $i$  auquel il appartient, ainsi qu'à un autre résidu  $i_{+1}$  ou  $i_{-1}$ .

L'attribution des résonances est l'étape primordiale des études de biologie structurale par RMN, elle consiste à obtenir le déplacement chimique de chaque atome de la protéine. Elle permettra par la suite de réaliser des structures 3D de la protéine grâce à l'acquisition des contraintes de distances. L'attribution est également la base des études d'interactions de la protéine : on peut en effet comparer les déplacements chimiques de la protéine à l'état natif et à ceux de la protéine en interaction avec un autre composé.

L'utilisation de la détection proton pour les échantillons protéiques pose différents problèmes. En effet, les fortes interactions dipolaires proton-proton et la forte abondance naturelle du noyau causent un élargissement des signaux. Plusieurs solutions permettent de pallier à cela, la rotation à l'angle magique à haute vitesse<sup>13</sup> et le découplage homonucléaire<sup>113</sup> qui ont pour effet d'affiner les raies proton. Une autre solution est de réduire la densité de protons dans les protéines afin de réduire la quantité de signal proton. La méthode la plus couramment utilisée pour cela consiste à produire une protéine perdeutérée pour ensuite re-échanger les protons labiles (-NH, -OH) de la protéine dans un tampon contenant un mélange de  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{D}_2\text{O}$ , pour lequel la teneur en  $\text{H}_2\text{O}$  détermine le degré de reprotonation. Cela signifie que les seuls protons détectés sont ceux associés aux protons échangeables dans le squelette peptidique et les chaînes latérales<sup>113</sup>.

## 3.4 Etude des fibrilles de Vectofusin-1 par RMN du solide

### 3.4.1 Stratégie expérimentale pour la caractérisation d'interactions peptide-solvant

Comme détaillé dans la section 3.1.3, les fibrilles de Vectofusin-1 se forment à un pH de 7,5, une condition où les histidines sont déprotonées tandis que les lysines sont protonées. Un élément clé de ce processus est la présence de groupements phosphates, indispensables à la formation de ces fibrilles. Ces groupements jouent un rôle essentiel dans la fibrillation en stabilisant l'assemblage moléculaire. Par ailleurs, les noyaux de phosphore présents dans les groupements phosphates possèdent un spin nucléaire de  $1/2$ , ce qui les rend exploitables pour des études par RMN. Dans cette optique, nous cherchons à observer et caractériser un couplage entre le phosphore des groupements phosphates et les peptides de Vectofusin-1, afin de mieux comprendre les interactions moléculaires qui régissent la formation des fibrilles.

La première étape à réaliser est une expérience de nutation pour chaque noyau utilisé  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$ , afin de déterminer les champs effectifs obtenus pour chaque noyau dans l'échantillon. Connaître les champs effectifs précisément pour chaque noyau nous permet ainsi de remplir la condition de Hartmann-Hahn et ainsi avoir des CP avec un transfert d'aimantation optimal.

L'expérience de spectroscopie de corrélation hétéronucléaire (HETCOR) est une technique de RMN bidimensionnelle utilisée pour corréler les résonances de deux types de noyaux différents dans une molécule. L'HETCOR est une expérience utile pour l'étude des molécules complexes, telles que les protéines et les acides nucléiques, car elle fournit des informations sur la connectivité entre les différents atomes de la molécule. L'expérience HETCOR est une expérience 2D de polarisation croisée entre les protons de l'échantillon et un hétéronoyau détecté. Il en résulte un pic croisé dans le spectre 2D, qui correspond à la résonance du second type de noyau corrélée à la résonance d'un ou plusieurs protons proches dans l'espace. Cette expérience est particulièrement utile dans l'étude des molécules biologiques car elle permet de déterminer les connexions entre les atomes de la molécule, ce qui est important pour comprendre la structure 3D et la fonction de la molécule<sup>24,54</sup>.

Durant les expériences HETCOR, nous appliquons un découplage FSLG (Frequency-Switched Lee-Goldburg). Le découplage FSLG est basé sur le découplage Lee-Goldburg (LG), qui est une méthode permettant d'obtenir un découplage homonucléaire en appliquant un champ RF off-résonance de manière à réduire efficacement l'interaction entre les protons. Le découplage FSLG renforce encore cet effet en modulant l'impulsion RF en faisant alterner deux fréquences rapprochées à un rythme suffisamment rapide pour annuler les couplages dipolaires résiduels. Cette alternation de fréquence élargit le champ RF effectif auquel sont soumis les protons, ce qui rend plus difficile le recouplage proton-proton. Ainsi, mesurer précisément le champ  $^1\text{H}$  par nutation est important pour le découplage FSLG. En effet, s'il est mal connu, l'offset utilisé pour l'impulsion RF (condition Lee-Goldburg) sera mauvais et le découplage sera impacté<sup>54,99</sup>.

Notre objectif dans le cadre de l'étude des fibrilles de Vectofusin-1 est d'utiliser une expérience 2D  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HETCOR pour déterminer les déplacements chimiques des carbones et des protons du peptide et identifier les couples carbone proton liés. Dans un deuxième temps, l'utilisation d'une expérience 2D  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -HETCOR nous permettra de déterminer quels protons du peptide précédemment attribués sont proches du noyau  $^{31}\text{P}$  du groupement phosphate indispensable à l'assemblage des peptides. Le couplage de ces deux expériences nous permettra ainsi par triangulation de déterminer les résidus impliqués dans l'interaction entre le peptide et les groupements phosphates présents dans le tampon de fibrillation<sup>44</sup>.

Les transferts d'aimantation impliqués dans les expériences 2D  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HETCOR et 2D  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -HETCOR sont présentés respectivement dans les figures 52 et 53.

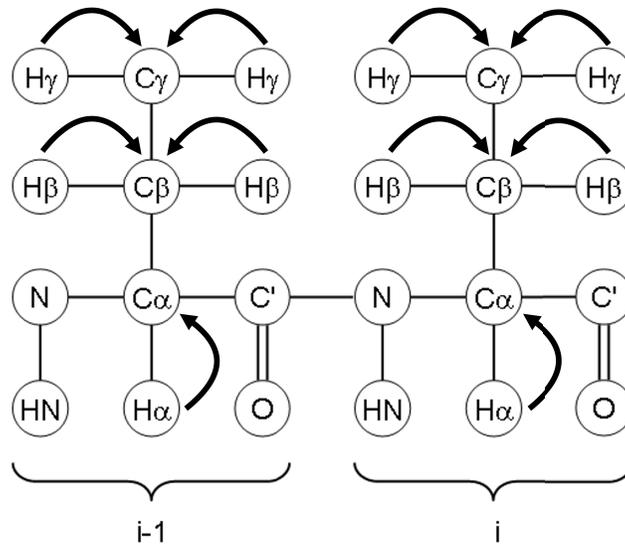


Figure 52 – Transfert d'aimantation attendus lors d'une expérience  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HETCOR dans un échantillon protéique

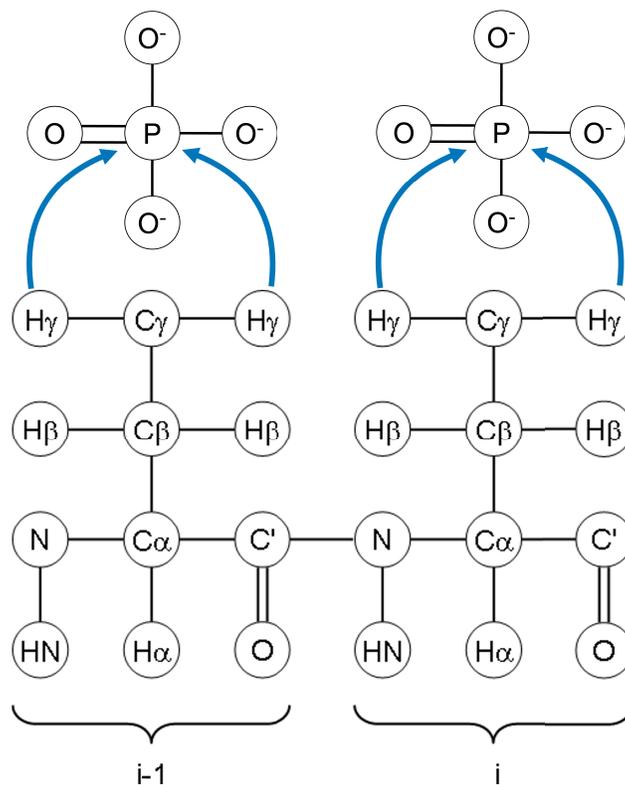


Figure 53 – Transfert d'aimantation attendus lors d'une expérience  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -HETCOR dans un échantillon protéique en présence de groupements phosphates à proximité des chaînes latérales.

## 3.4.2 Matériel et méthode

### Préparation de l'échantillon

20mg de peptide Vectofusin-1 lyophilisé ont été solubilisés dans un microtube à une concentration finale de 10mM dans 50% éthanol. L'échantillon a ensuite été mis au bain de sonication durant 5 minutes avant d'être dilué à une concentration de 0,5mM dans un tampon de fibrillation 10mM de phosphate pH 7,5 ce qui débute le processus d'auto-assemblage. Les échantillons ont ensuite été incubés durant 48h à une température de 21°C dans un agitateur Eppendorf Mixer 5432. Les fibrilles ainsi formées ont été centrifugées durant 10 minutes à 10 000g avant d'être lavées avec le tampon de fibrillation afin de retirer de l'échantillon tout peptide n'ayant pas fibrillé.

Le culot de fibrilles a été inséré dans un cône de micropipette de 200 $\mu$ L pour être ensuite transférés dans un rotor de 3.2mm de diamètre en oxide de zirconium par centrifugation à 10 000g durant 10 minutes.

### Expériences RMN

Les expériences ont été réalisées à l'aide d'une sonde 3.2mm triple HCN sur un spectromètre BRUKER 500 MHz wide bore avec une console AVANCE III (Bruker Biospin, Fällandren, Suisse) à une vitesse de rotation de 22.5 KHz. La température a été réglée à 263°K en utilisant une BCU-Xtreme (Bruker Biospin, Fällandren, Suisse).

Les déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des spectres ont été calibrés en utilisant le DSS (Acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique) comme référence<sup>84</sup>.

Les paramètres qui ont été utilisés durant les expériences sont présentés dans le tableau 3.2

Tableau 3.2 –

Noyau	Champs B1	Durée d'impulsion	APHH
<b>P90</b>			
$^1\text{H}$	86,5 kHz	2,89 $\mu\text{s}$	
<b><math>^1\text{H}</math>-<math>^{31}\text{P}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	96 kHz	3 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{31}\text{P}$	73,5 kHz		
<b><math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	81 kHz	50 $\mu\text{s}$	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{13}\text{C}$	58,5 kHz		
<b>Découplages</b>			
$^1\text{H}$ hétéronucléaire	100 kHz		
$^1\text{H}$ FSLG	122,5 kHz		

### 3.4.3 Résultats et discussions

Des expériences de nutation pour chaque noyau utilisé  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  et  $^{31}\text{P}$  ont été réalisées. Un spectre d'une nutation  $^{13}\text{C}$  est présenté sur la figure 54 comme exemple.

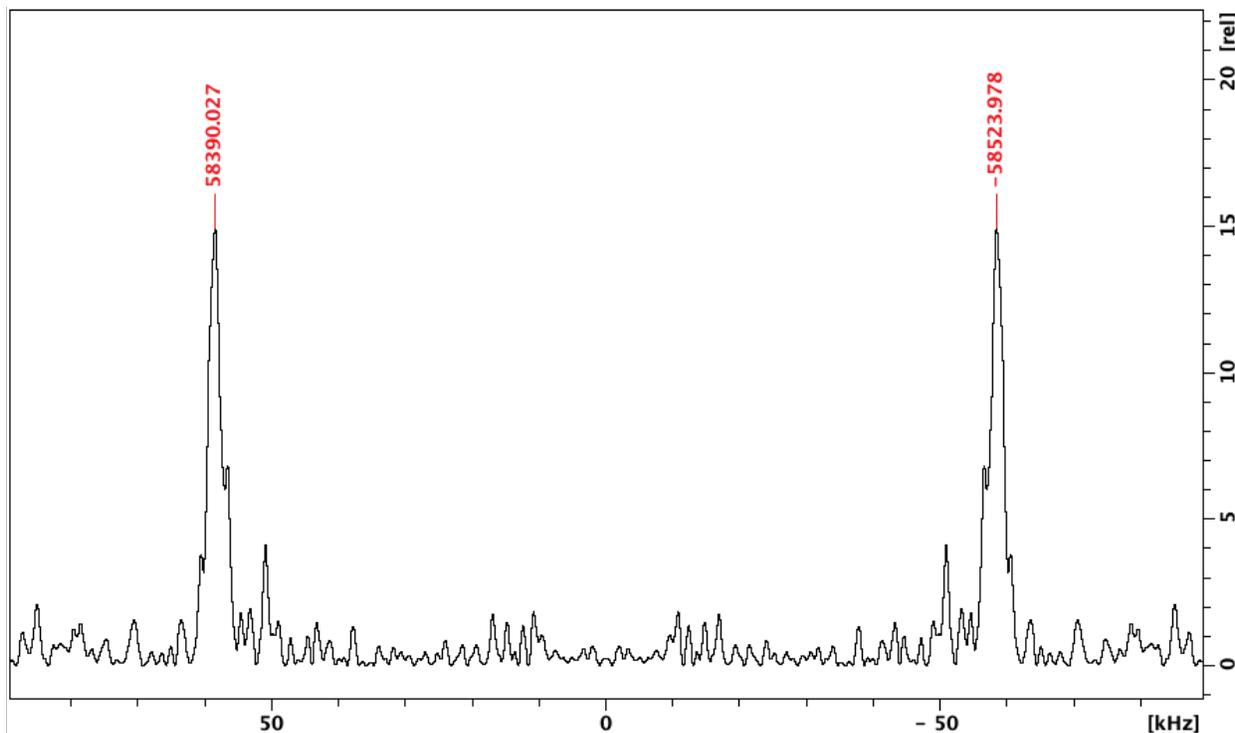


Figure 54 – Spectre de nutation  $^{13}\text{C}$  pour une impulsion de 135W. Le champ effectif obtenu à cette puissance est la moyenne de la valeur des deux pics observés. Pour une impulsion de 135W, on obtient un champ effectif  $^{13}\text{C}$  de 58,5kHz.

Nous avons ainsi pu déterminer les champs effectifs obtenus pour chaque noyau dans l'échantillon. L'organisation des données de champs effectifs obtenus en fonction de l'intensité d'impulsion utilisé en diagramme de dispersion (figure 55) a permis d'établir des courbes de champs effectifs qui ont été utilisées pour définir les champs utilisés lors des expériences de CP.

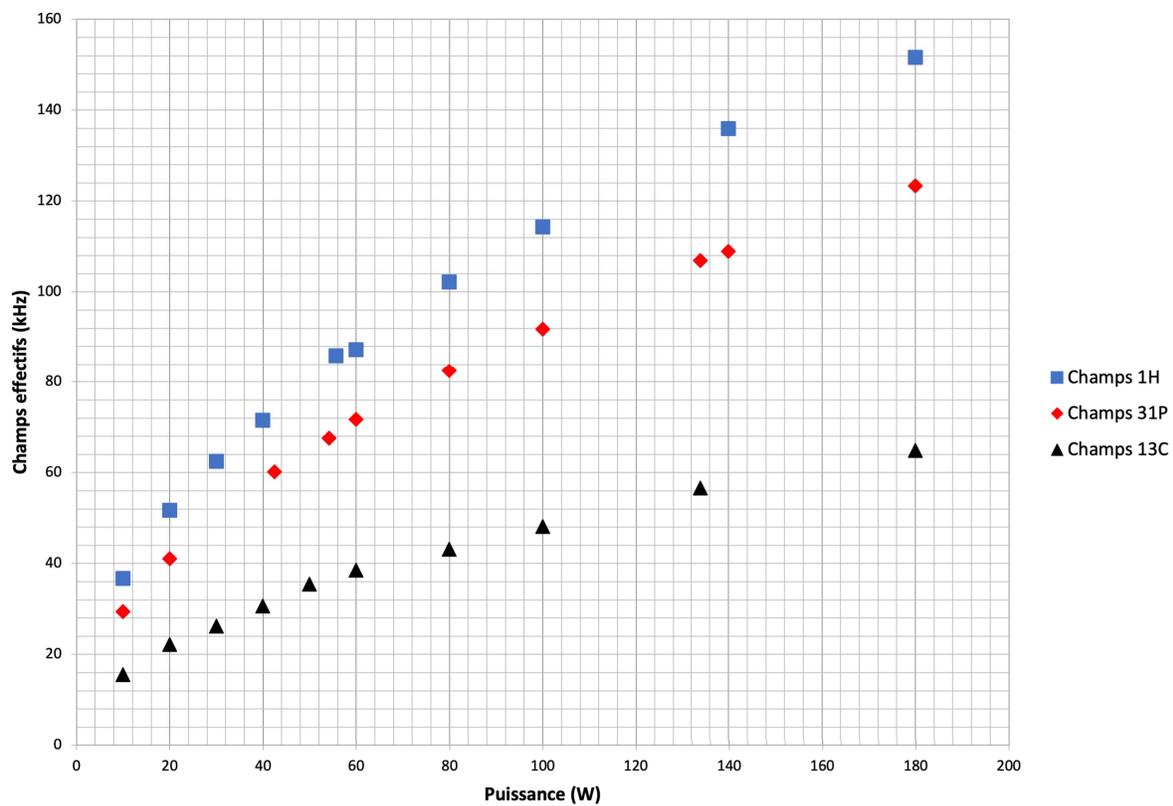


Figure 55 – Courbes des champs effectifs pour les noyaux  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{31}\text{P}$

Les CP  $^1\text{H}^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}^{31}\text{P}$  ont alors été optimisées, les spectres obtenus sont présentés sur les figures 56 et 58.

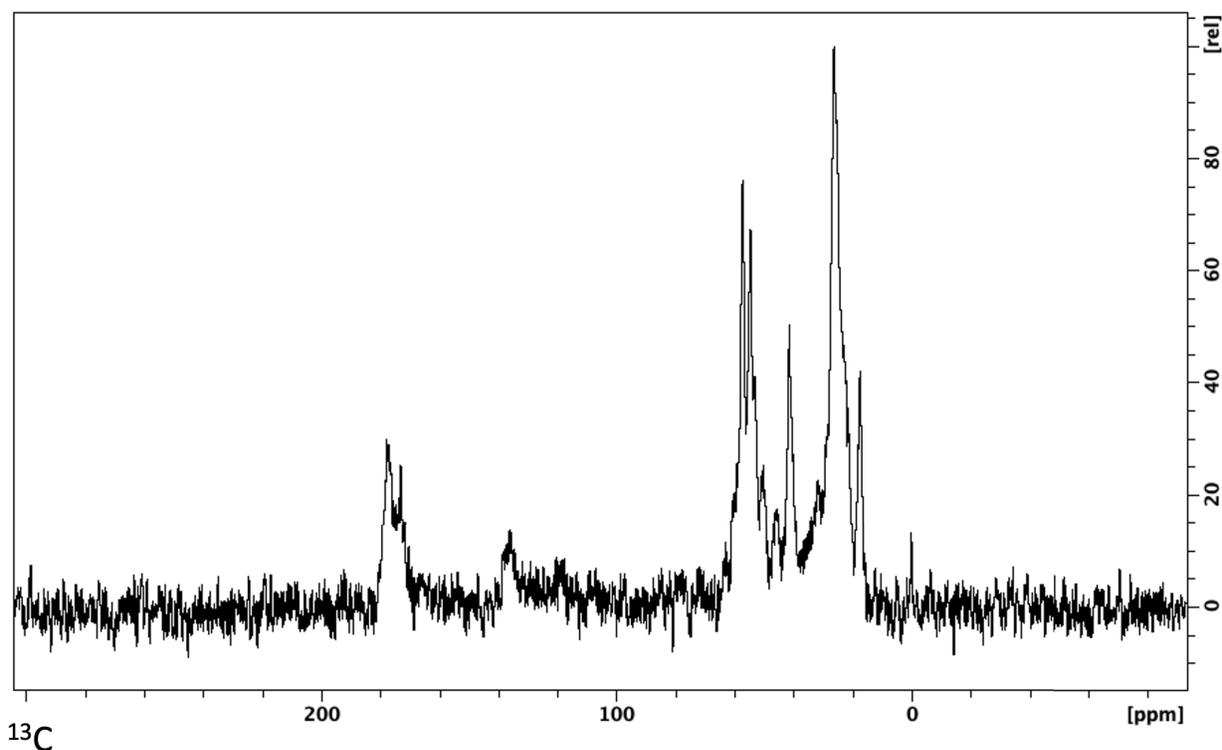


Figure 56 – Spectre de l’expérience 1D  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -CP. (768 scans, temps de recyclage : 2s, durée d’acquisition en dimension directe : 40ms)

Le spectre de l’expérience 2D  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HETCOR est présenté par la figure 57. Due à la faible diversité de résidus au sein de la séquence, une forte superposition des pics est observable. Ainsi les largeurs de raies obtenues permettent d’identifier les couples carbone-proton tels que CA/HA ou CB/HB mais ne permettent pas de séparer suffisamment les différents couples d’un même type. On peut ainsi désigner des zones de regroupement des résonances d’une couple carbone-proton pour un type de résidu mais il n’est pas toujours possible de distinguer l’ensemble des pics individuels. Ce phénomène est observable dans la figure 57. Les déplacements chimiques qui ont été observés sont référencés dans le tableau 3.3.

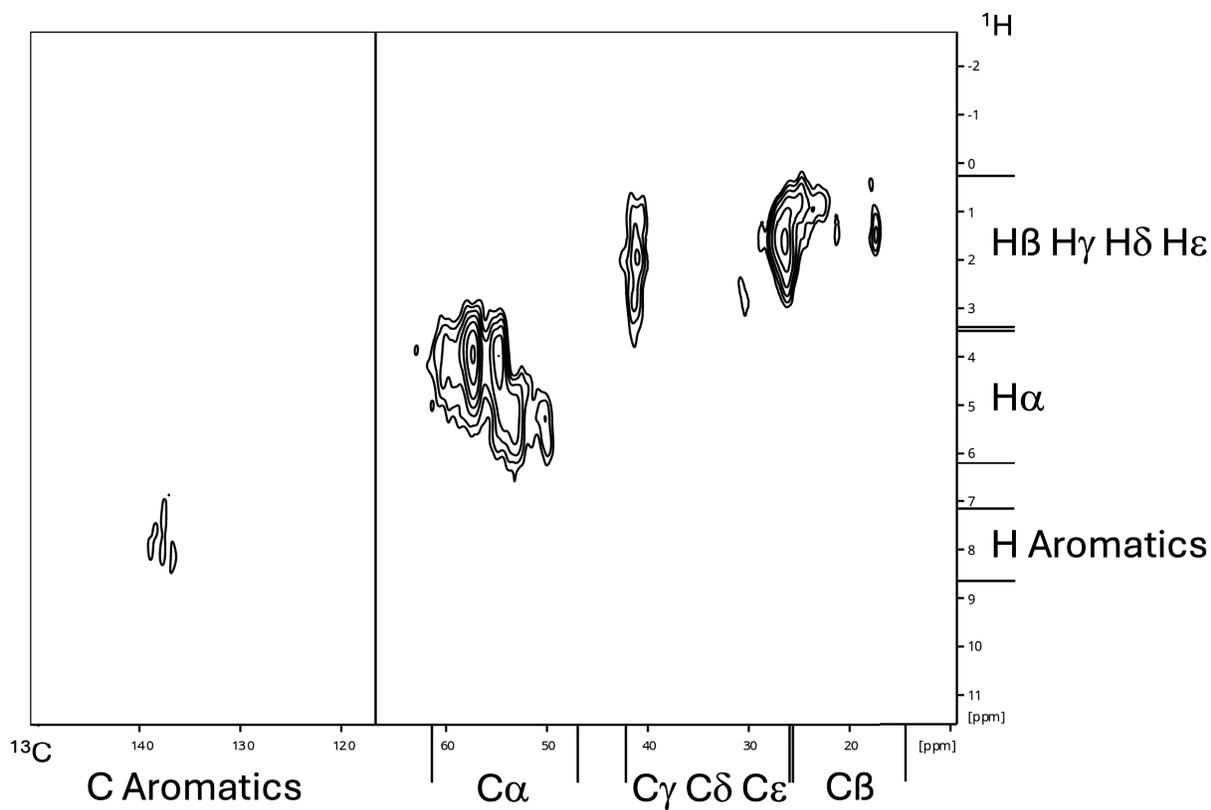


Figure 57 – Spectre de l'expérience 2D  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HETCOR. (768 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 80ms)

Tableau 3.3 – Déplacements chimiques observés dans l'expérience 2D  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HETCOR

Residue	Atom	Shift (ppm)
LYS	CA	57.20885
LYS	CE	41.05144
LYS	HB	1.86047
LYS	HA	4.043441
LYS	HE	1.912516
LYS	HG	1.05548
LYS	HD1	1.567726
LYS	CB	31.18664
ALA	HA	5.215998
ALA	CA	53.52926
ALA	CB	17.38771
ALA	HB	1.500331
LEU	HB	1.722259
LEU	CA	54.65065
LEU	CB	45.74404
LEU	CD	21.23336
LEU	CG	26.40453
LEU	HA	4.025674
LEU	HDx	1.475394
LEU	HG	1.654089
PRO	CA	59.70033
PRO	CD	50.16763
PRO	HA	4.091916
PRO	HDx	5.324984
PRO	HG	8.090077
HIS	HE2	8.090077
HIS	HG	8.012932
HIS	CE1	137.5765
HIS	HE1	7.348598

La figure 58 présente la superposition d'une expérience 1D  $^{31}\text{P}$  en acquisition directe et d'une expérience  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -CP.

Deux populations de phosphore sont observables dans cet échantillon, une population à un déplacement chimique de 2,5 ppm et une population à un déplacement chimique de 1 ppm. On peut voir qu'en détection directe  $^{31}\text{P}$ , la population à 2,5ppm est plus importante que la population à 1 ppm. En utilisant un transfert  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -CP, le signal de la population à 2,5 ppm perd en intensité par rapport à la population à 1 ppm.

Ce phénomène pourrait indiquer qu'il y a une plus grande distance entre les  $^{31}\text{P}$  de la population à 2,5 ppm et les protons. Cela indiquerait alors que cette population correspond au  $^{31}\text{P}$  lié au peptide et la population à 1 ppm correspond au  $^{31}\text{P}$  en interaction avec les protons plus proches et plus nombreux de l'eau.

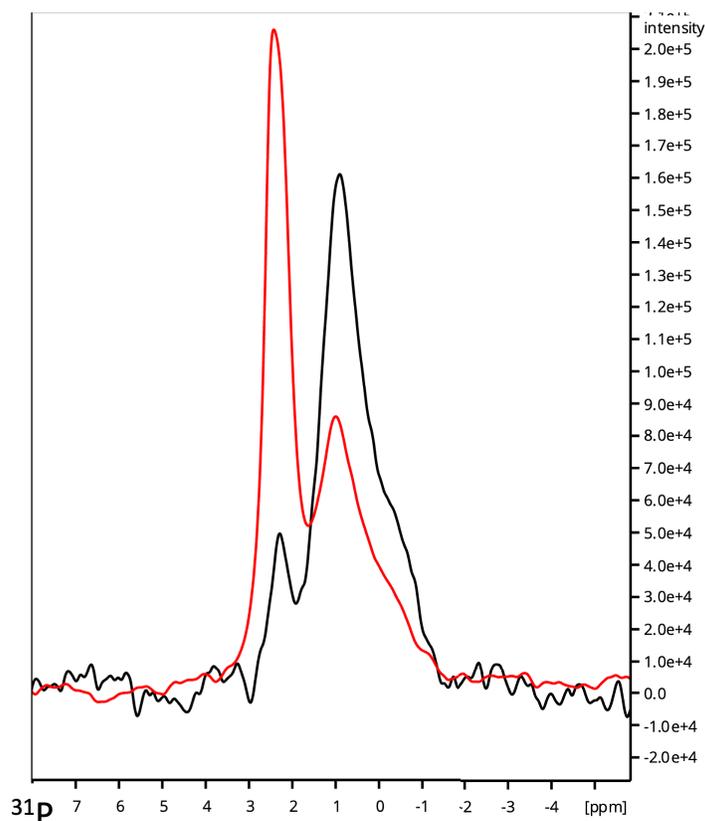


Figure 58 – Superposition de l'expérience 1D  $^{31}\text{P}$  en acquisition directe (spectre rouge : 16 scans, temps de recyclage : 60s, durée d'acquisition en dimension directe : 13ms) et de l'expérience  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -CP (spectre noir : 32 scans, temps de recyclage : 3s, durée d'acquisition en dimension directe : 45ms)

Le spectre de l'expérience 2D  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -HETCOR présenté dans la figure 59 confirme cette hypothèse. En effet, on peut observer que la population  $^{31}\text{P}$  à un déplacement chimique de 1 ppm présente des pics de corrélation aux valeurs  $^1\text{H}$  de 1,5 ppm et 6 ppm correspondant respectivement aux formes  $\text{OH}^-$  et  $\text{H}_2\text{O}$  de l'eau présente dans le tampon phosphate comme décrit par Mathew *et al.*<sup>70</sup>.

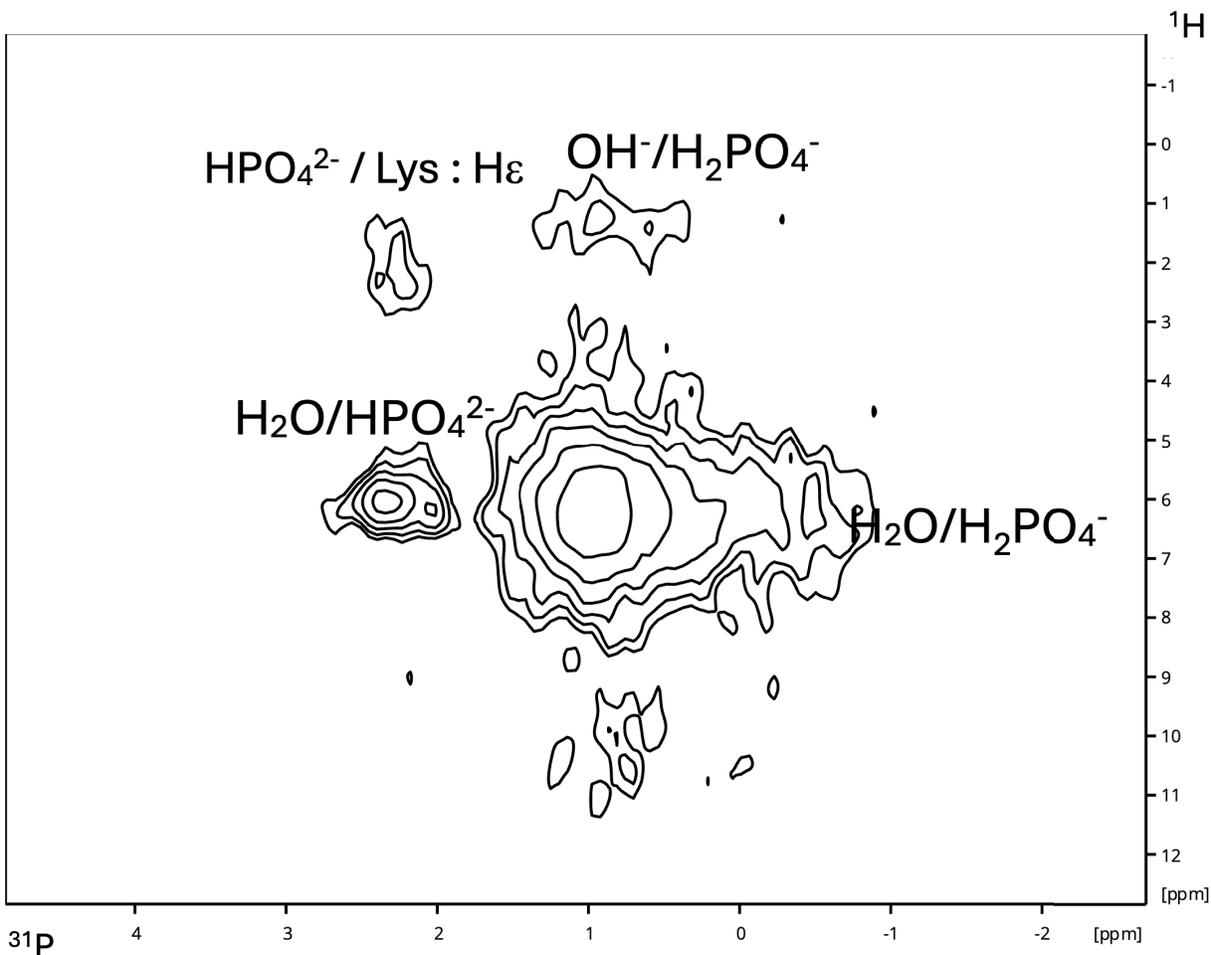


Figure 59 – Spectre de l'expérience 2D  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -HETCOR. (208 scans, temps de recyclage : 3s, durée d'acquisition en dimension directe : 45ms)

Comme le montre la figure 60, on peut observer en A. sur le spectre de l'expérience 2D  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -HETCOR, une corrélation entre un proton du peptide et le phosphore des groupes phosphates. Cette corrélation se situe à une valeur située entre 2 ppm et 3ppm pour le proton. En comparant cette valeur avec le spectre 2D  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HETCOR en B., nous observons que ce déplacement chimique coïncide avec celui du proton  $\epsilon$  corrélé avec carbone  $\epsilon$  de la

lysine à 41 ppm. Cette identification est appuyée par le fait que le déplacement chimique du proton associé à ce carbone est caractéristique et ne peut être attribué à un autre proton. De plus, ce résultat est cohérent avec la structure de la lysine, puisque le C $\epsilon$  se trouve à l'extrémité de la chaîne latérale, ce qui en fait un candidat logique pour l'interaction observée avec le phosphore.

En conclusion, les résultats obtenus apportent un soutien supplémentaire à l'hypothèse formulée dans la section 3.1.4 d'une interaction spécifique entre le groupement phosphate et le groupement NH $_3^+$  de la chaîne latérale de la lysine. Cette interaction semble jouer un rôle clé non seulement dans la structuration, mais également dans la stabilisation des fibrilles, confirmant ainsi son importance dans l'assemblage supramoléculaire.

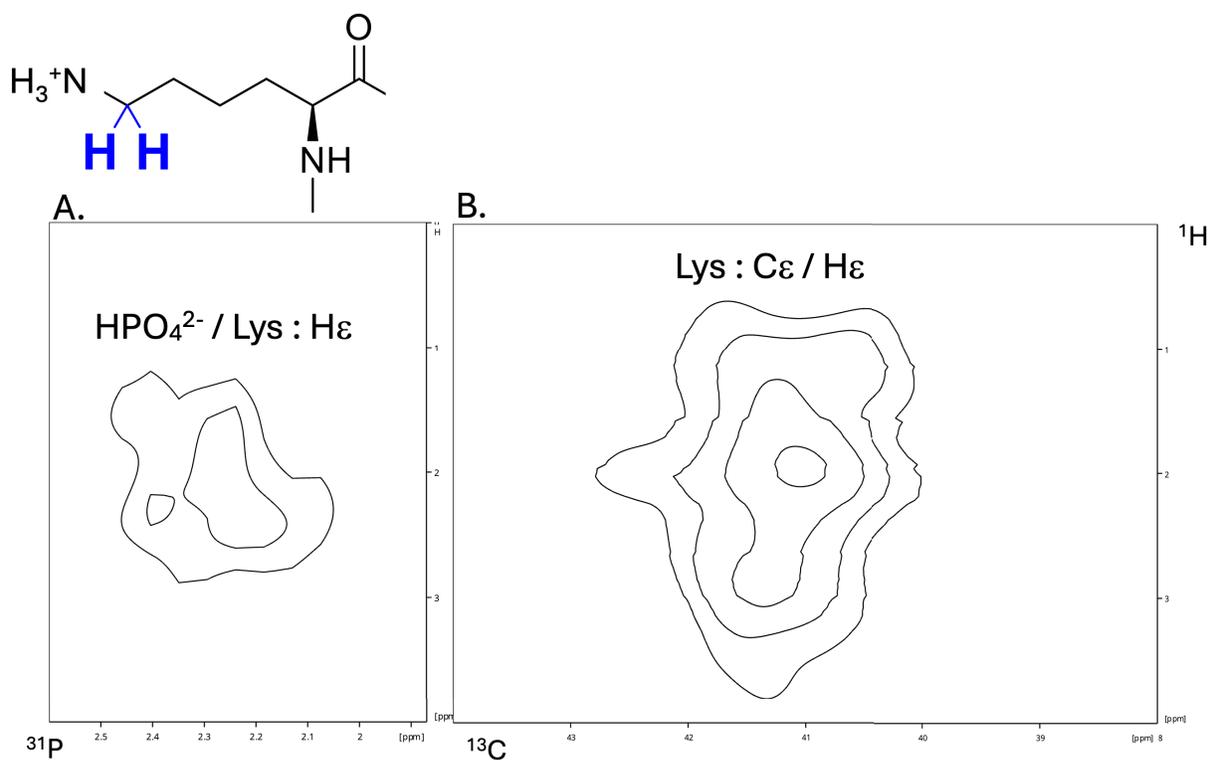


Figure 60 – Alignement des spectres des expériences HETCOR A. 2D  $^1\text{H}^{31}\text{P}$ -HETCOR B. 2D  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HETCOR. La formule du résidu lysine est représentée avec le C $\epsilon$  et les H $\epsilon$  en bleu.

### 3.4.4 Stratégie expérimentale pour l'étude des fibrilles de Vectofusin-1 par RMN du solide en détection proton

Le développement de sondes et de rotors permettant d'atteindre des fréquences de rotation supérieures à 50 kHz a rendu possible l'utilisation d'expériences avec détection  $^1\text{H}$ , très similaires à celles utilisées en RMN en solution<sup>4,29</sup>.

Ces expériences présentent plusieurs avantages significatifs pour l'analyse structurale et la caractérisation des biomolécules et des composés chimiques. Les expériences 3D permettent de répartir les signaux RMN dans trois dimensions (une dimension par noyau observé), ce qui permet de réduire considérablement le chevauchement des pics dans les spectres. Cela conduit à une meilleure résolution spectrale, facilitant l'attribution précise des signaux.

Les expériences 3D avec détection proton sont utilisées pour déterminer la structure tridimensionnelle de molécules, en particulier les biomolécules telles que les protéines. Les données 3D permettent de mesurer les distances entre les noyaux, d'obtenir des angles de torsion et d'autres paramètres structurels cruciaux.

Les expériences 3D facilitent ainsi l'étude des interactions mises en jeu dans les complexes moléculaires et des changements conformationnels. Elles sont essentielles pour comprendre les mécanismes moléculaires dans les systèmes biologiques. Dans notre cas, l'utilisation de telles expériences pourrait nous permettre d'élucider les interactions entre deux monomères de peptides au sein des fibrilles.

En RMN du solide à détection proton, pour réaliser l'attribution séquentielle de protéines, les expériences décrites sur la Figure 61 peuvent être utilisées.

Dans les titres des expériences, les lettres majuscules indiquent les atomes détectés et les lettres minuscules indiquent les transferts d'aimantation sans détection.

L'expérience 3D-hCANH (a) permet d'observer une cohérence entre le  $\text{C}_{\alpha i}$ , le  $\text{N}_i$  et le  $\text{H}_i$  d'un résidu  $i$ .

L'expérience 3D-hcoCAcoNH (b) permet d'observer une cohérence entre le  $\text{C}_{\alpha i-1}$ , le  $\text{N}_i$  et le  $\text{H}_i$  d'un résidu  $i$ .

L'expérience 3D-hCOcaNH (c) permet d'observer une cohérence entre le  $\text{CO}_i$ , le  $\text{N}_i$  et le  $\text{H}_i$  d'un résidu  $i$ . Enfin, L'expérience 3D-hCONH (d) permet d'observer une cohérence entre le  $\text{CO}_{i-1}$ , le  $\text{N}_i$  et le  $\text{H}_i$  d'un résidu  $i$ .

En utilisant la redondance d'informations obtenues par ces expériences, il est possible de déterminer pour un résidu le déplacement chimique de son NH, CA et CO ainsi que les déplacements chimiques des CA et CO du résidu précédent.

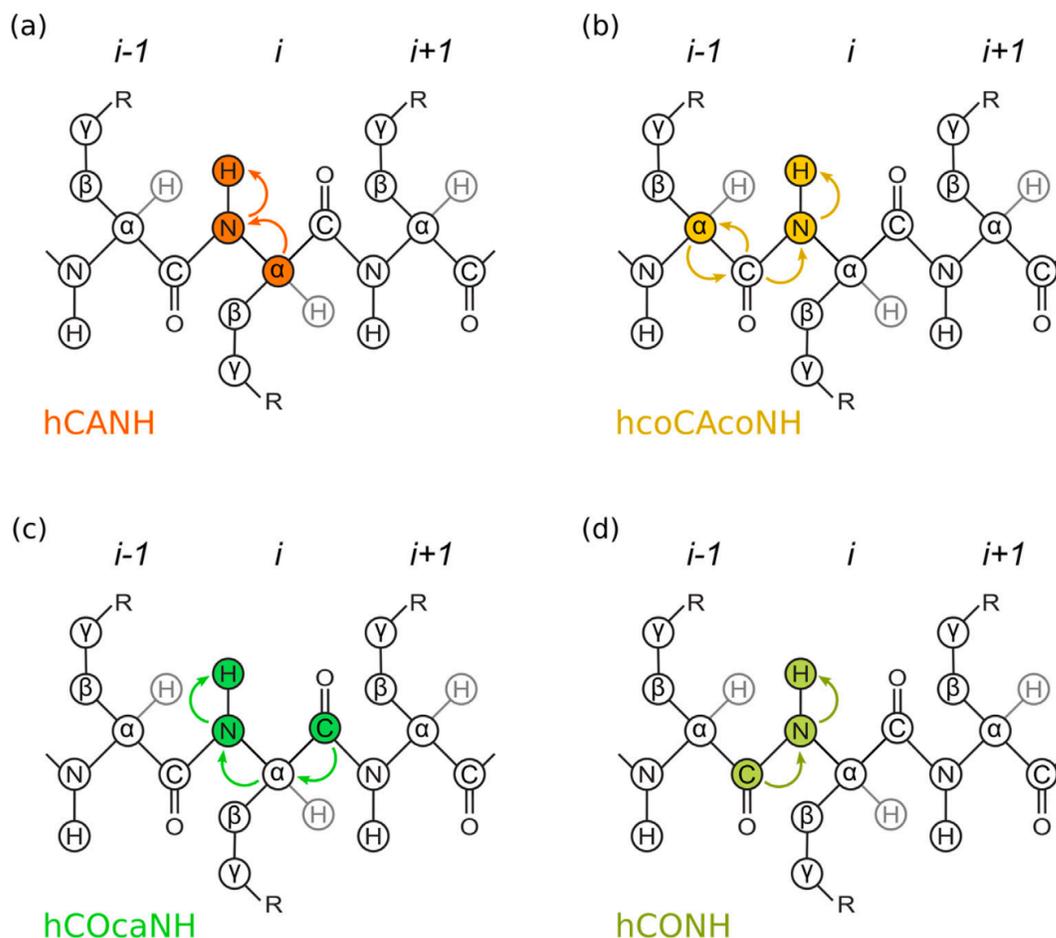


Figure 61 – Expériences de RMN du solide MAS en détection proton. Figure adaptée de<sup>41</sup>

L'obtention des déplacements chimiques des atomes composant les chaînes latérales des résidus peut être réalisée en utilisant différentes expériences. Parmi elles, l'expérience 3D-hCCH décrite par la figure 62 permet d'obtenir les déplacements chimiques des carbones de la chaîne latérale ainsi que des protons qui leur sont liés. L'utilisation de cette expérience en conjonction avec les expériences décrites précédemment dans la figure 61 permet alors d'obtenir l'ensemble des déplacements chimiques des résidus composant le peptides.

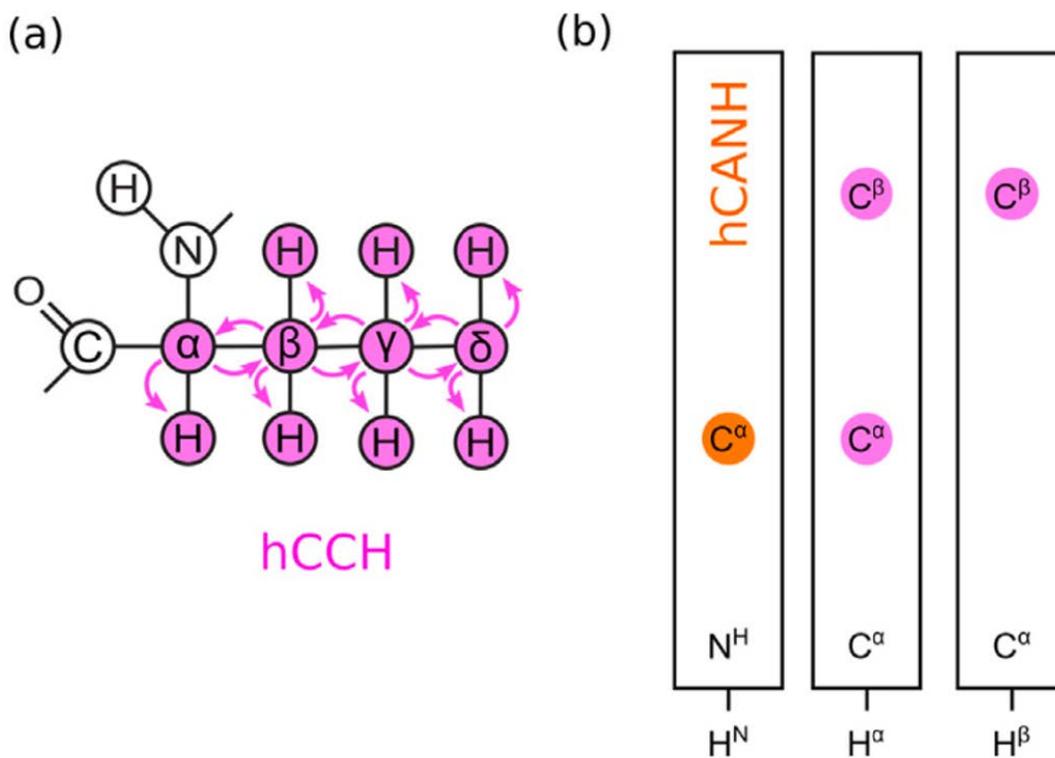


Figure 62 – (a) Expériences de RMN du solide MAS en détection proton 3D hCCH qui permet d’observer une cohérence entre les Carbones et les protons qui leurs sont attachés au sein d’un résidu. (b) Parmi les corrélations attendues sur le spectre hCCH (rose) se trouve la corrélation entre CA-i et HA-i qui peut être superposée en dimension  $^{13}\text{C}$  avec la corrélation entre CA-i et H retrouvée sur le spectre 3D hCANH (orange). Figure adaptée de<sup>41</sup>.

Ces expériences n’étant pas installées sur notre spectromètre, nous avons dû installer les séquences d’impulsions correspondant à ces expériences puis valider la méthode sur un échantillon de référence avant de les utiliser sur un échantillon de fibrilles de Vectofusin-1. Nous avons pour cela choisi d’utiliser le tripeptide  $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Formylmethionine-leucyl-phenylalanine (fMLF).

### 3.4.5 Matériel et méthode

#### Préparation des échantillons

Le peptide  $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -fMLF sous forme poudreuse a été inséré dans un rotor 0,7mm en utilisant les outils 0.7mm MAS Rotor Tools Bruker BioSpin.

Les fibrilles de peptide  $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 ont été transférées dans un rotor de 0.7mm en oxide de zirconium par centrifugation en utilisant un prototype d'adaptateur pour centrifugeuse fourni par Bruker Biospin (Ettlingen, Allemagne). Les fibrilles ont été formées selon le protocole décrit dans la section 3.1.3. Le culot de fibrilles a été inséré dans un cône de micropipette fourni avec le prototype puis inséré dans le tube à centrifuger. L'échantillon a ensuite été centrifugé à 4500g durant 30 minutes. Les fibrilles de peptide  $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 ont aussi été transférées par centrifugation dans les rotors 1.3 et 3.2mm par centrifugation en utilisant un assemblage de cônes de micropipettes.

Les déplacements chimiques  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  des spectres ont été calibrés en utilisant le DSS comme référence<sup>84</sup>.

#### Séquences d'impulsions

Les expériences en détection proton ont été réalisées à l'aide d'une sonde 0.7mm triple HCN (100kHz MAS) et d'une sonde 1.3mm triple HCN (60kHz MAS) sur un spectromètre 750 MHz wide bore shield avec une console Avance III. La température a été réglée à 263°K en utilisant une BCU-Xtreme (Bruker Biospin, Fällanden, Suisse).

Les séquences d'impulsions utilisées sont présentées dans les figures 63, 64, 65 et 66.

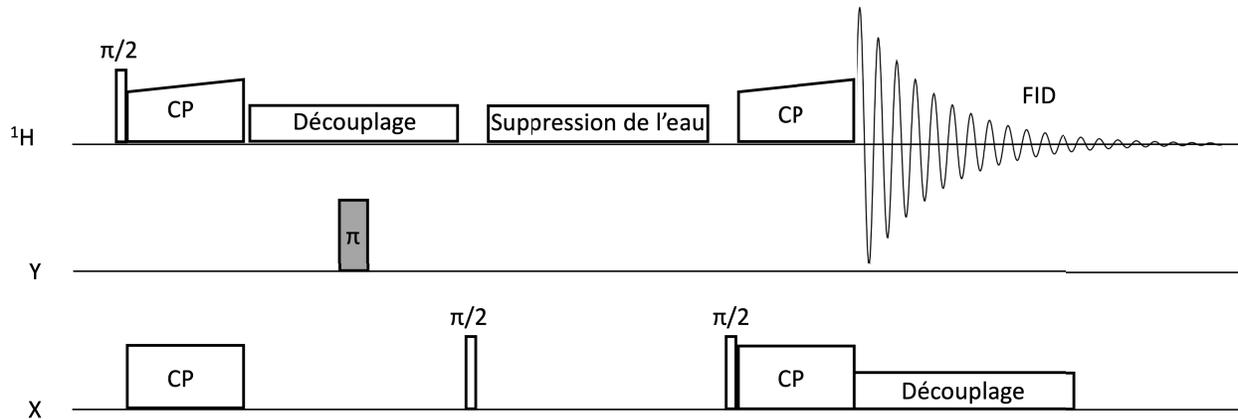


Figure 63 – Séquence d’impulsion pour les expériences 2D hXH. Les transferts d’aimantation de  $^1\text{H}$  à X sont réalisés par CP. La sélectivité de l’expérience est obtenue grâce à l’offset appliqué aux impulsions RF

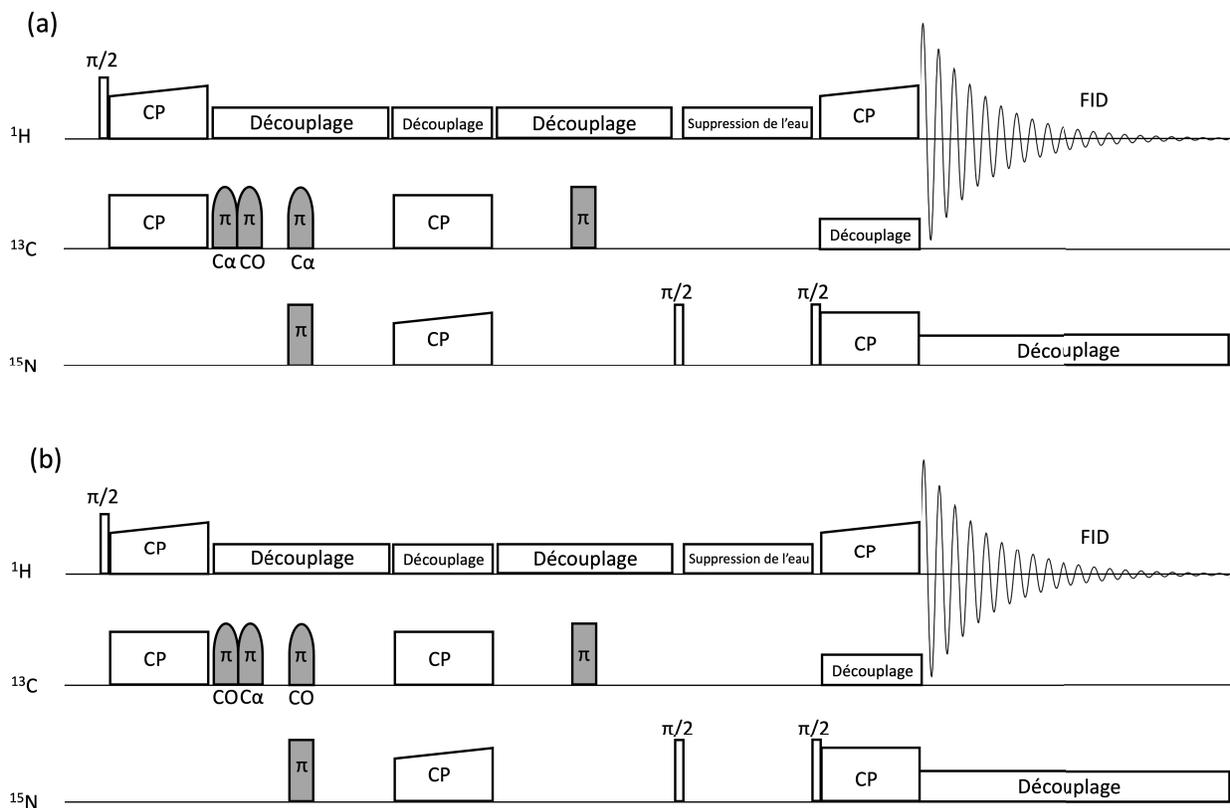


Figure 64 – Séquence d'impulsion pour les expériences 3D hCANH et hCONH. Les transferts hC, CN et NH sont réalisés par CP. La sélectivité de l'expérience est obtenue grâce aux impulsions avec forme REBURP et ISNOB2 réalisées durant l'évolution carbone (a) Séquence d'impulsion pour une expérience hCONH (b) Séquence d'impulsion pour une expérience hCANH

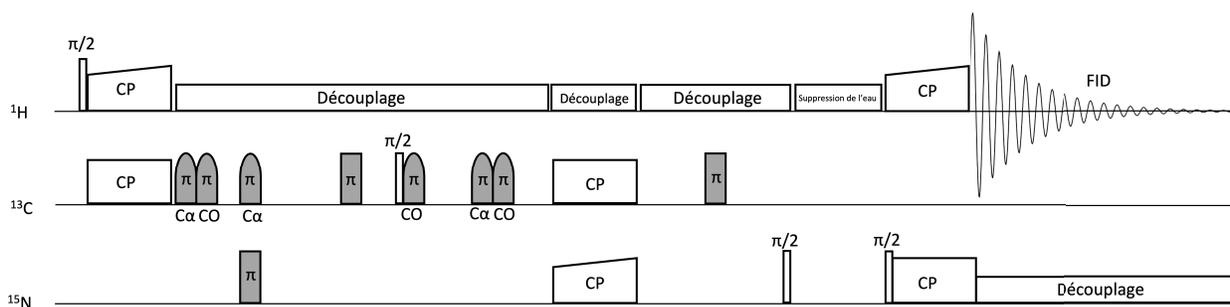


Figure 65 – Séquence d'impulsion pour l'expérience 3D hCOcaNH. Les transferts hC, CN et NH sont réalisés par CP. Le transfert sélectif entre CO et ca est obtenu grâce aux impulsions avec forme REBURP et ISNOB2 réalisées durant l'évolution carbone

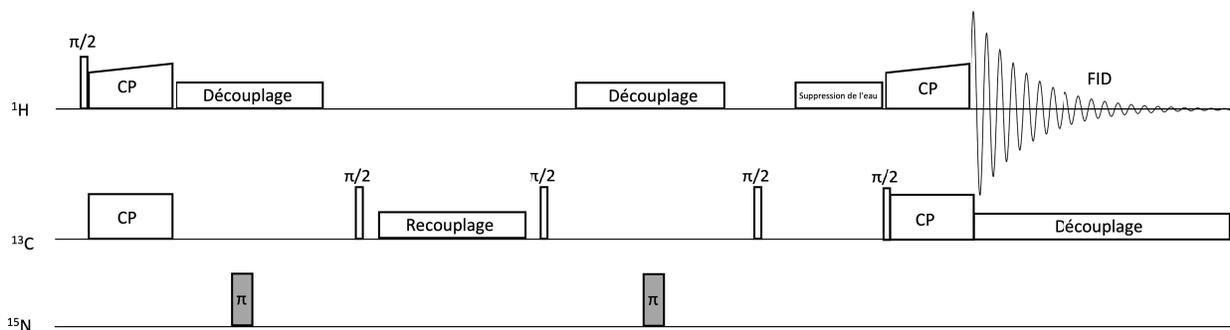


Figure 66 – Séquence d’impulsion pour l’expérience 3D hCCH. Les transferts HC et CH sont effectués par CP. Les transferts entre les carbones sont obtenus grâce a une séquence DIPSI-2 réalisée durant l’évolution carbone

Les paramètres utilisés durant les expériences réalisées sur la sonde 0.7mm sont présentés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 –

Noyau	Champs B1	Durée d'impulsion	APHH
<b>P90</b>			
$^1\text{H}$	212 kHz	1,18 $\mu\text{s}$	
$^{13}\text{C}$	43 kHz	5,69 $\mu\text{s}$	
$^{15}\text{N}$	40 kHz	8,89 $\mu\text{s}$	
<b><math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	60 kHz	1 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{13}\text{C}$	40 kHz		
<b><math>^1\text{H}</math>-<math>^{15}\text{N}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	60 kHz	1 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{15}\text{N}$	40 kHz		
<b><math>^{13}\text{C}</math>-<math>^{15}\text{N}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	25 kHz		
$^{13}\text{C}$	65 kHz	3 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{15}\text{N}$	35 kHz		
<b>Découplages</b>			
$^1\text{H}$ hétéronucléaire	25 kHz		
$^1\text{H}$ homonucléaire	15 kHz		

Les paramètres utilisés durant les expériences réalisées sur la sonde 1.3mm sont présentés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 –

Noyau	Champs B1	Durée d'impulsion	APHH
<b>P90</b>			
$^1\text{H}$	86,5 kHz	2,89 $\mu\text{s}$	
$^{13}\text{C}$	62 kHz	4,02 $\mu\text{s}$	
$^{15}\text{N}$	34 kHz	6,96 $\mu\text{s}$	
<b><math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	105 kHz	1 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{13}\text{C}$	45 kHz		
<b><math>^1\text{H}</math>-<math>^{15}\text{N}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	96,5 kHz	1 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{15}\text{N}$	37,5 kHz		
<b><math>^{13}\text{C}</math>-<math>^{15}\text{N}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	10 kHz		
$^{13}\text{C}$	85 kHz	3 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{15}\text{N}$	25 kHz		
<b>Découplages</b>			
$^1\text{H}$ hétéronucléaire	10 kHz		
$^1\text{H}$ homonucléaire	15 kHz		

### 3.4.6 Résultats et discussion

#### Validation de la méthode sur la sonde 0.7mm

Après avoir installé les séquences d'impulsions correspondant aux expériences en détection proton, nous avons validé la méthode sur l'échantillon de référence  $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -fMLF sur la sonde triple 0.7mm à 100kHz MAS.

Nous avons choisi d'utiliser une combinaison de 3 expériences, 3D-hCOcaNH, 3D-hCONH et 3D-hCANH. En effet, cette combinaison permet d'obtenir une redondance sur le CO de chaque résidu tout en limitant le nombre de transfert d'aimantation effectué dans chaque expérience, nous permettant ainsi d'obtenir un meilleur rapport signal/bruit.

Nous avons réalisé des expériences de nutations sur les noyaux  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  puis nous avons optimisé les CP grâce aux informations de champs obtenues.

Nous avons ensuite réalisé les expériences 3D citées précédemment et, comme le montre la figure 67, pour un résidu  $i$  on retrouve un pic de corrélation  $\text{N}_i\text{H}_i\text{CO}_i$  sur le spectre de l'expérience hCOcaNH. Pour la même valeur de déplacement chimique carbone, on trouve le pic correspondant au  $\text{N}_{i+1}\text{H}_{i+1}\text{CO}_i$  sur le spectre de l'expérience hCONH. On peut alors répéter ce cheminement pour réaliser l'attribution séquentielle du peptide. L'expérience hCANH peut alors être utilisée pour déterminer le  $\text{N}_i\text{H}_i\text{C}\alpha_i$  de chaque résidu.

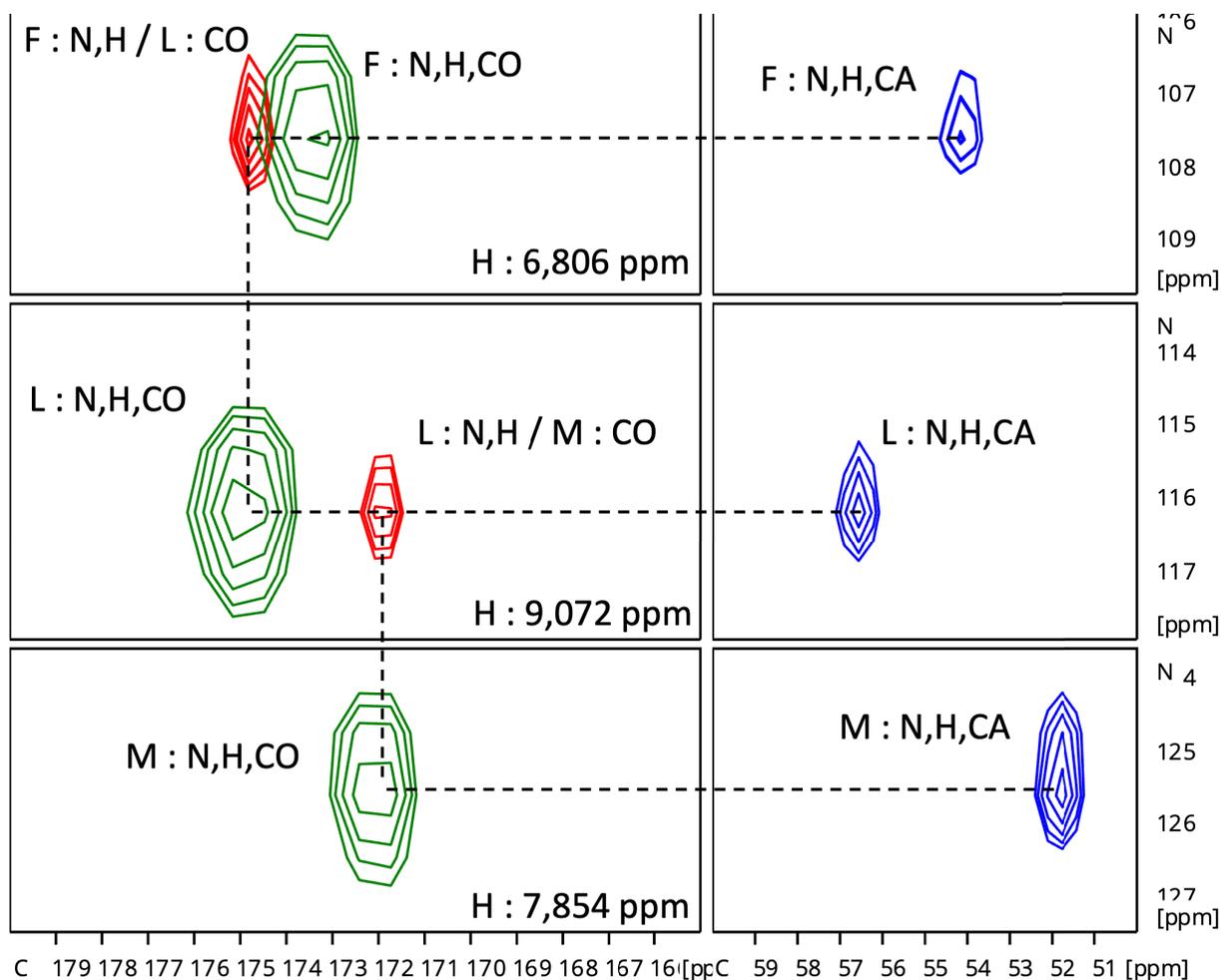


Figure 67 – Attribution séquentielle du peptide fMLF. Le spectre vert est celui de l'expérience 3D-hCOcaNH (32 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 40ms), le spectre rouge est celui de l'expérience 3D-hCONH (8 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 40ms) et le spectre bleu est celui de l'expérience 3D-hCANH(8 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 40ms).

L'expérience 3D-hCCH nous a ensuite permis d'obtenir les déplacements chimiques des atomes composants la chaîne latérale des résidus en se basant sur les déplacements chimiques du  $C_{\alpha i}$  et  $CO_i$  obtenus par les expériences décrites précédemment. Un exemple de ce procédé d'attribution est montré dans la figure 68.

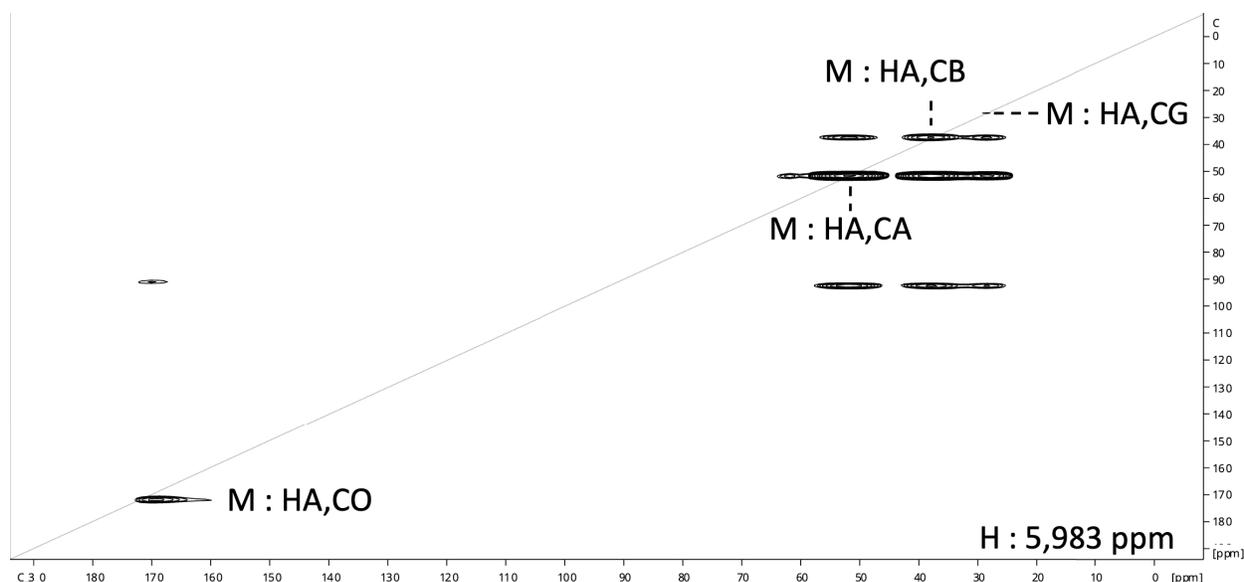


Figure 68 – Spectre de l’expérience 3D-hCCH (8 scans, temps de recyclage : 2s, durée d’acquisition en dimension directe : 18ms) montrant l’attribution des Carbones de la chaîne latérale du résidu méthionine du peptide fMLF. Le déplacement chimique des atomes CB, CG et CO sont observables lorsque l’on se place à la valeur de déplacement chimique  $^{13}\text{C}$  CA précédemment obtenue via l’expérience 3D-hCANH.

La majeure partie des résonances des chaînes latérales du peptide  $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -fMLF ont ainsi été attribuées. Les résonances qui ne sont pas visible dans cette expérience, telle que le  $\text{C}_\epsilon$  de la Methionine qui est séparée du reste de la chaîne latérale, ont pu être attribuées en utilisant une expérience 2D-hCH.

Nous avons ainsi validé cette méthode d’attribution sur notre équipement et tenté de réaliser ces expériences sur les auto-assemblages de  $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1.

### Expériences réalisées sur les fibrilles de Vectofusin-1 sur la sonde 0.7mm

Les CP  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (figure 69),  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (figure 70) et  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  ont été optimisées (champs RF et temps de contact optimaux). Les rapports signal/bruit des CP  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  sont plutôt faible par rapport à celui obtenu pour la CP  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Cet effet s’explique par la plus faible sensibilité du noyau  $^{15}\text{N}$  ayant un  $\gamma$  plus faible que le proton et le  $^{13}\text{C}$  et la quantité moindre de noyaux  $^{15}\text{N}$  dans l’échantillon.

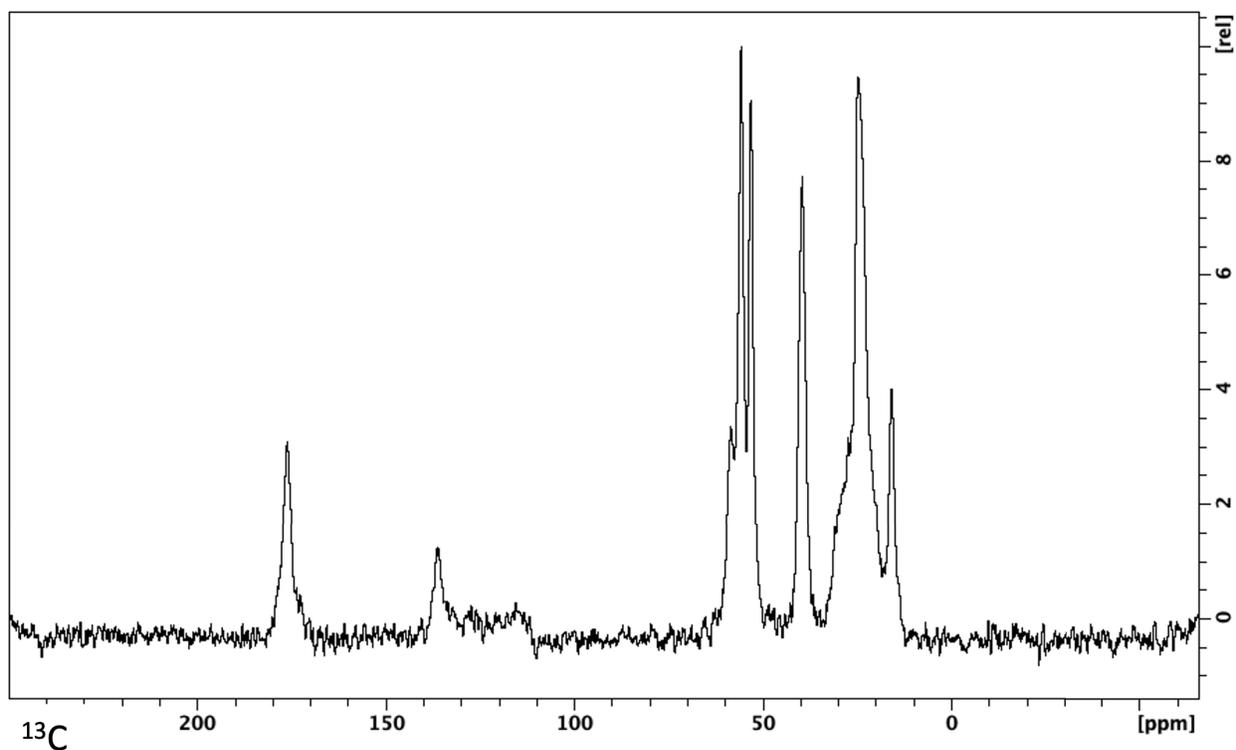


Figure 69 – Spectre 1D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -CP des fibrilles de Vectofusin-1 (64 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 30ms).

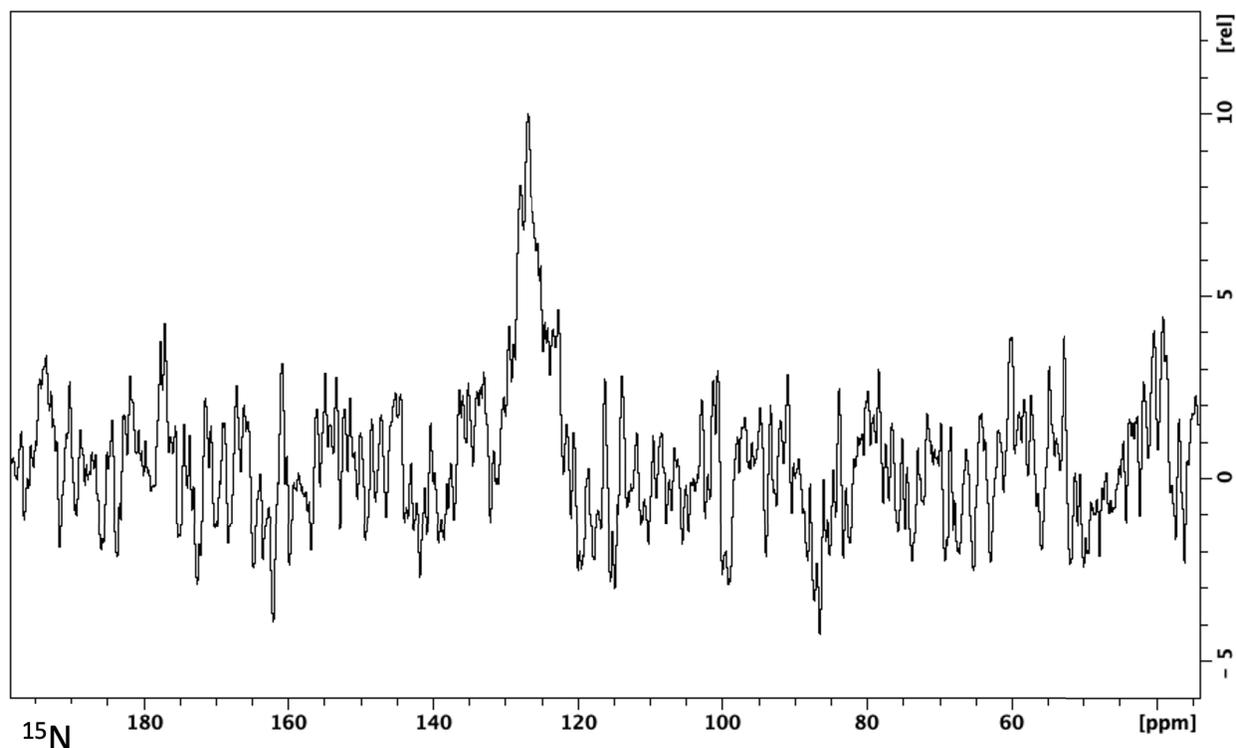


Figure 70 – Spectre 1D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -CP des fibrilles de Vectofusin-1 à (128 scans, temps de recyclage : 2s, durée d’acquisition en dimension directe : 30ms).

Les expériences 2D-hCH (figure 71) et 2D-hNh (figure 72) ont été réalisées en utilisant les CP optimisées. La 2D-hCH est présentée sur la figure 71 et la 2D-hNH est présentée sur la figure 72. Comme pour les expériences 2D-HETCOR présentées dans la section précédente, avec seulement deux dimensions, la superposition des pics due à la faible diversité de résidus au sein de la séquence, permet de distinguer des zones de regroupement des résonances d’une couple carbone-proton ou azote-proton pour un type de résidu mais il n’est pas possible de distinguer l’ensemble des pics individuels.

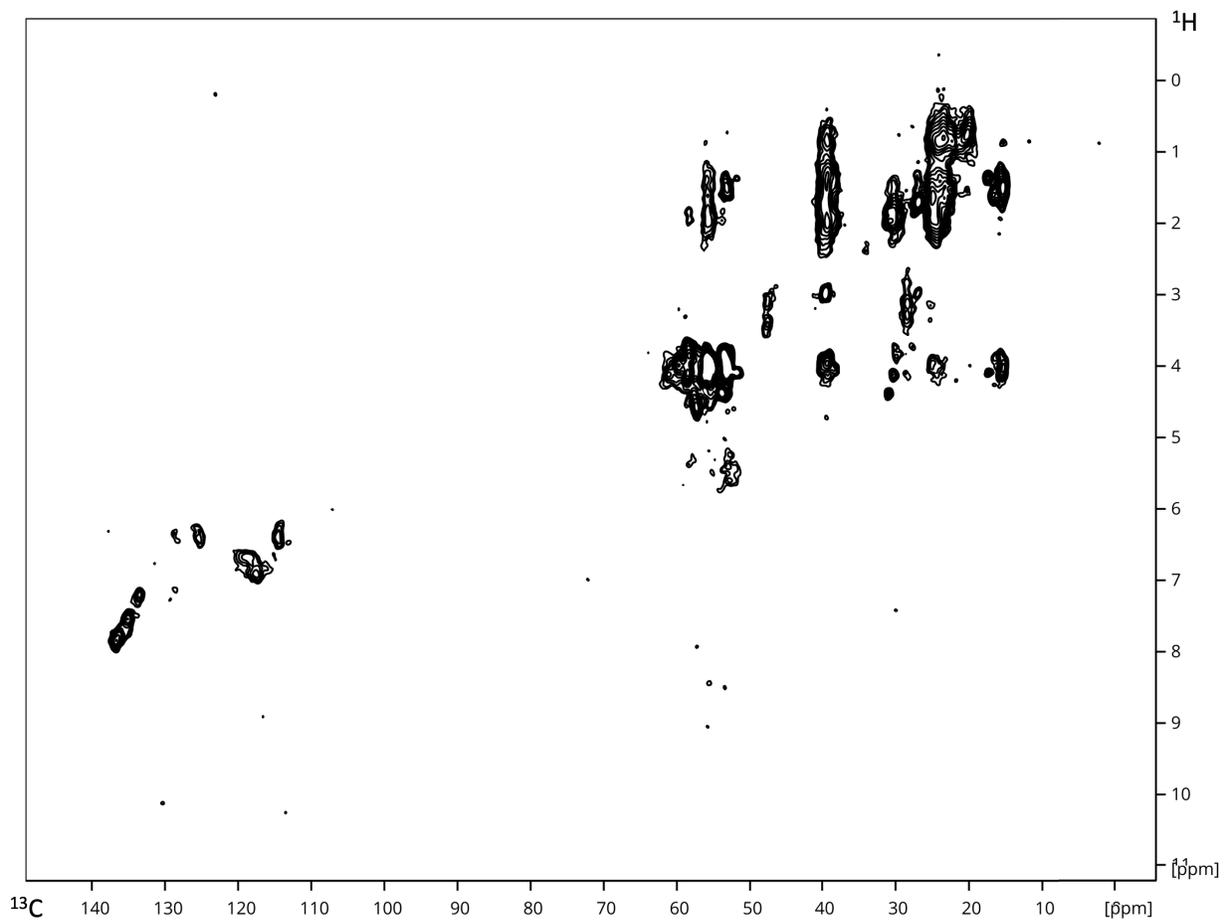


Figure 71 – Spectre de l'expérience 2D-hCH des fibrilles de  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 (64 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 40ms).

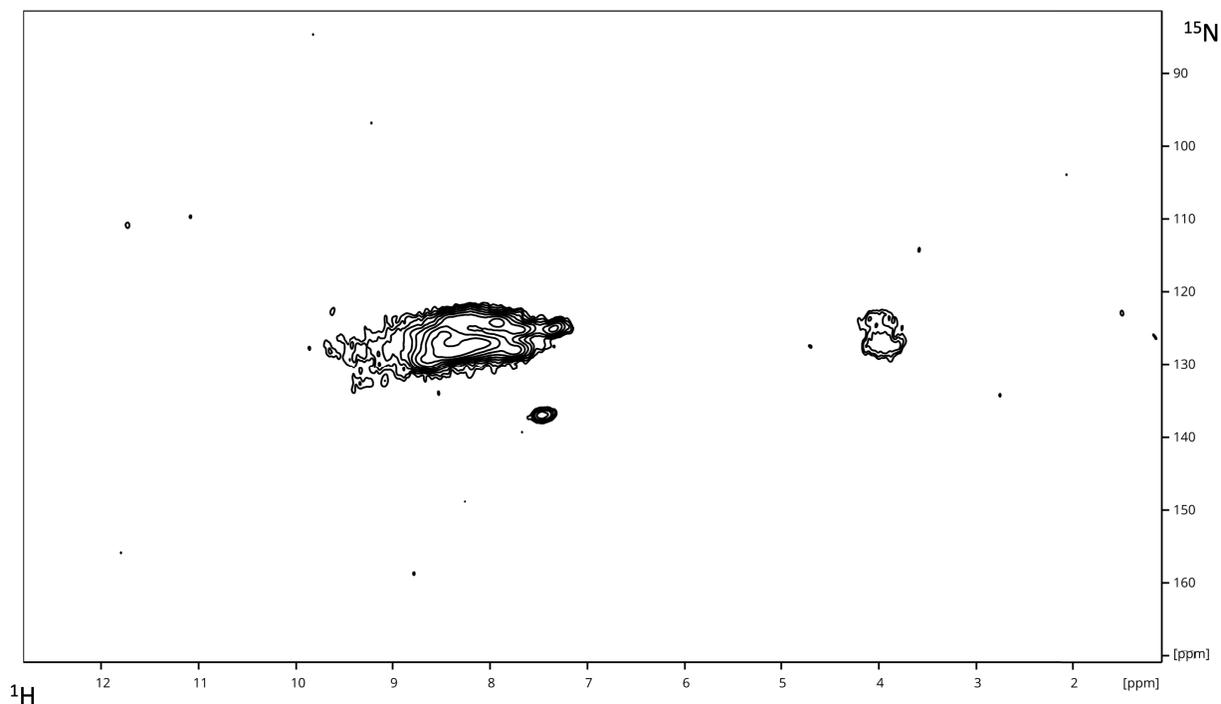


Figure 72 – Spectre de l’expérience 2D-hNH des fibrilles de  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 (258 scans, temps de recyclage : 2s, durée d’acquisition en dimension directe : 40ms).

Les transferts et découplages utilisés dans les expériences 3D ont ensuite été optimisés et l’expérience 3D-hCaNH a été réalisée. Le spectre de l’expérience 3D-hCaNH est détaillé sur la figure 73. A nouveau, on observe une superposition des pics et l’ajout d’une troisième dimension à l’expérience ne suffit pas à séparer suffisamment les pics.

Bien que les expériences aient été réalisées à très haute vitesse de rotation, la résolution proton de 0,7ppm obtenue en 3D reste insuffisante pour attribuer les résonances avec certitude.

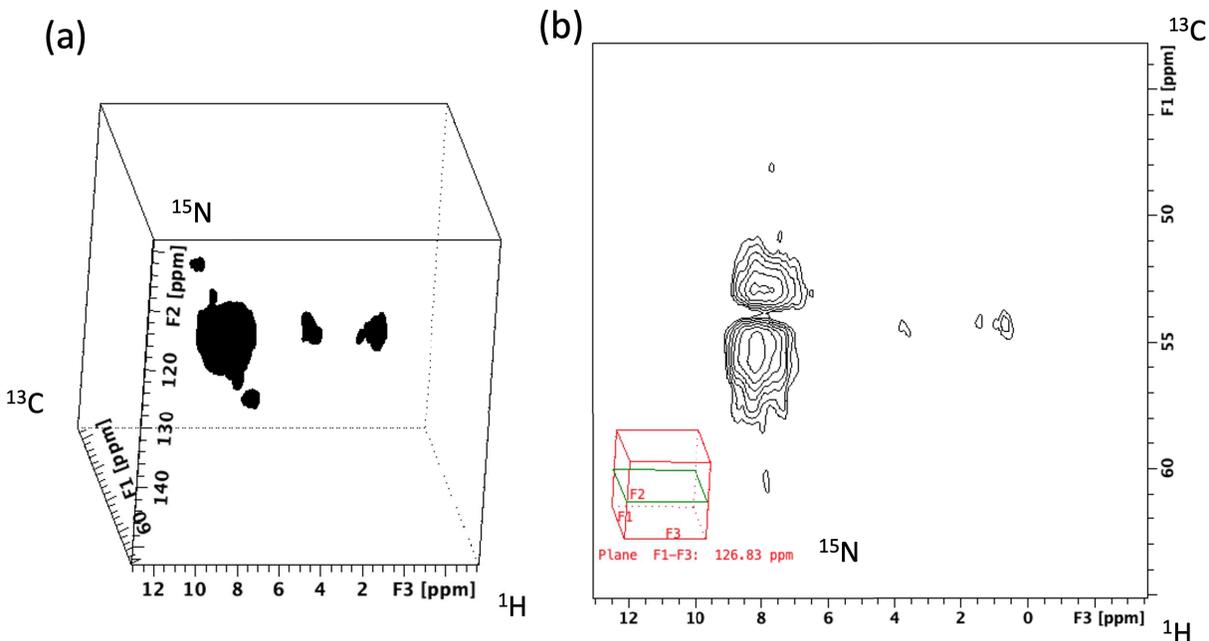


Figure 73 – Spectre de l’expérience 3D-hCaNH des fibrilles de  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 (512 scans, temps de recyclage : 2s, durée d’acquisition en dimension directe : 40ms). Le spectre complet est présenté en (a) et une coupe 2D est présentée en (b)

### Perspectives d’amélioration

Le manque de résolution proton observé à 100kHz est certainement dû à la dynamique de l’échantillon interne des fibrilles dans l’échantillon. En effet, on peut observer sur la figure 74 que l’échantillon un fois hydraté, et donc avec des fibrilles certainement plus mobiles, présente un signal mieux résolu mais deux fois moins intense (car moins de peptide dans le rotor) que le signal d’un échantillon déshydraté.

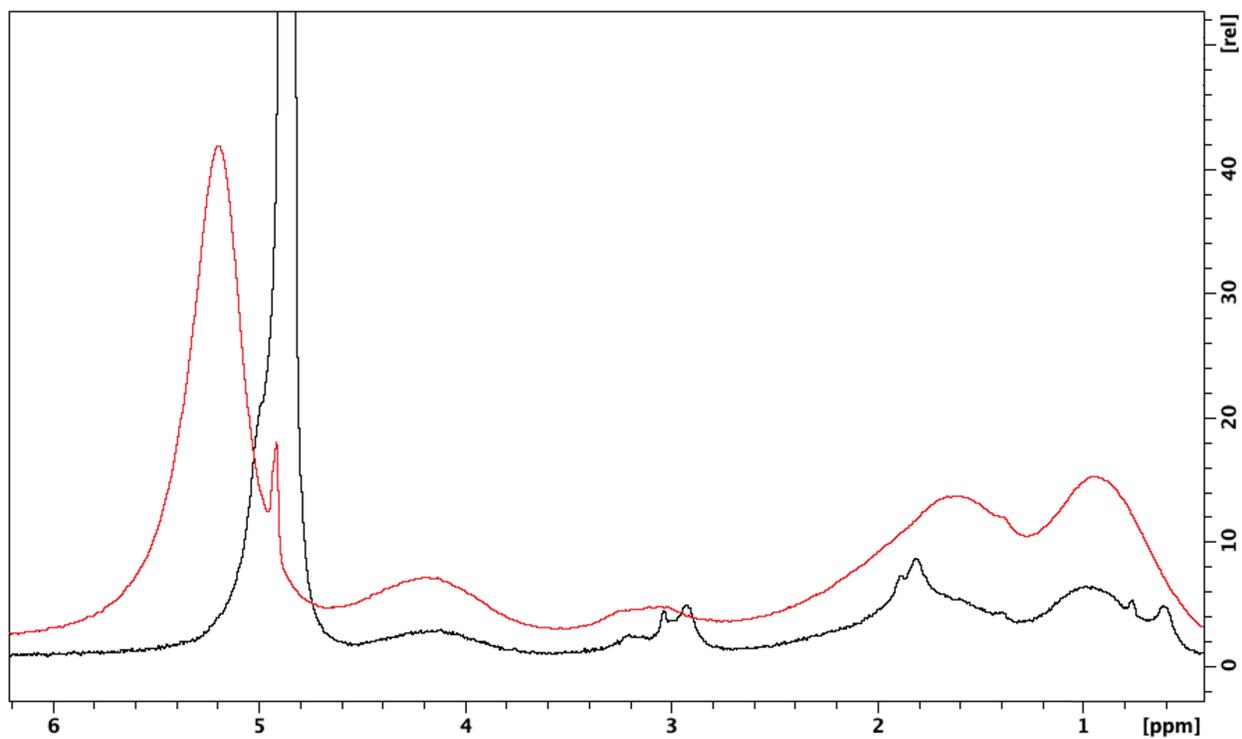


Figure 74 – Spectre 1D  $^1\text{H}$  des fibrilles de  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 à différentes taux d'hydratation (4 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 100ms). Echantillon déshydraté : rouge ; échantillon hydraté : noir

Nous avons aussi observé (figure 75) que la perte de résolution engendrée par l'abaissement de la rotation de 100kHz à 60kHz est minimale.

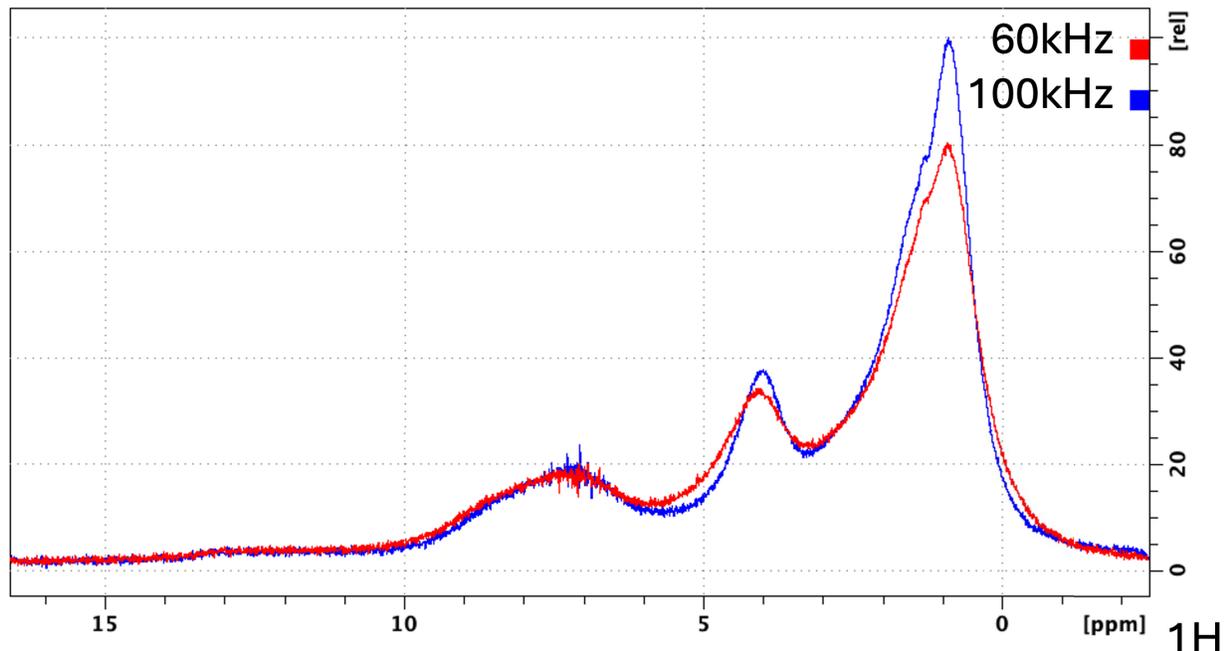


Figure 75 – Spectre 1D  $^1\text{H}$  des fibrilles de  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 à différentes vitesses de rotation (4 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 100ms).

Les rotors de 1.3mm ont une contenance de  $2,5\mu\text{L}$ , qui est quatre fois supérieure à celle d'un rotor de 0.7mm dont la contenance est de  $0,59\mu\text{L}$ <sup>90</sup> permettant ainsi d'obtenir un meilleur rapport signal/bruit puisque nous aurons ainsi la possibilité de mettre une plus grande quantité d'échantillon dans un rotor de 1.3mm.

Nous avons tenté d'optimiser les expériences 3D sur la sonde 1.3mm à 60kHz, mais les transferts  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  se sont révélés moins efficaces à cette vitesse de rotation rendant impossible l'acquisition de spectres 3D.

### 3.4.7 Expériences en détection hétéronoyaux

La résolution des spectres obtenus à très haute vitesse de rotation n'étant pas satisfaisante pour réaliser l'attribution séquentielle des fibrilles de Vectofusin-1, Nous avons choisi de changer de stratégie. La stratégie que nous avons choisi ensuite d'adopter est l'utilisation d'expériences plus classiques en détection hétéronoyaux ( $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ )<sup>94,28</sup>. En effet, la détection hétéronoyaux, par rapport à la détection proton, est particulièrement avantageuse en RMN du solide pour éviter les larges couplages dipolaires directs et améliorer la résolution qui est le facteur limitant sur nos échantillons<sup>86,104</sup>. L'utilisation de ces expériences a été rendue possible par l'utilisation d'une cryo-sonde 3.2mm dans le laboratoire d'application de Bruker sur le site de Fällanden en Suisse grâce à une collaboration entre notre équipe et la Dr Barbara Peronne<sup>37</sup>.

En détection hétéronoyaux, la stratégie globale d'attribution est la même qu'en détection proton, c'est à dire d'utiliser des expériences multidimensionnelles, pour établir des connexions entre les acides aminés adjacents. Cette stratégie repose sur 3 expériences principales, les expériences 3D-NCOCX et 3D-NCACX<sup>94</sup> ainsi que l'expérience 4D-CANCOX<sup>28</sup>.

Les transferts impliqués dans les expériences 3D NCOCX et NCACX sont détaillés sur les figures 76 et 77. Dans ces expériences, l'aimantation est transférée du Hi au Ni par CP, puis sélectivement au COi ou Cai par polarisation croisée spécifique. Une étape PDSO ou DARR est ensuite utilisée pour transférer l'aimantation à tout autre noyau  $^{13}\text{C}$  à proximité. L'évolution est faite sur les noyaux  $^{15}\text{N}$  et  $^{13}\text{C}$ , puis détecté sur le  $^{13}\text{C}$ , ce qui donne un spectre 3D. L'expérience NCOCX relie un Ni au COi-1 et à d'autres atomes de carbone du résidu i et l'expérience NCACX relie Ni à Cai ainsi qu'à d'autres atomes de carbone du résidu i. Ces expériences permettent donc d'établir des liens séquentiels sans ambiguïté entre les résidus.

Les corrélations observées sont dues aux couplages dipolaires (à travers l'espace) c'est pourquoi, en utilisant des temps de mélange longs (200 à 500ms) lors de l'étape de transfert CX, il est possible d'observer des corrélations avec d'autres atomes de carbone plus éloignés (Flèches grises sur les figures 76 et 77).

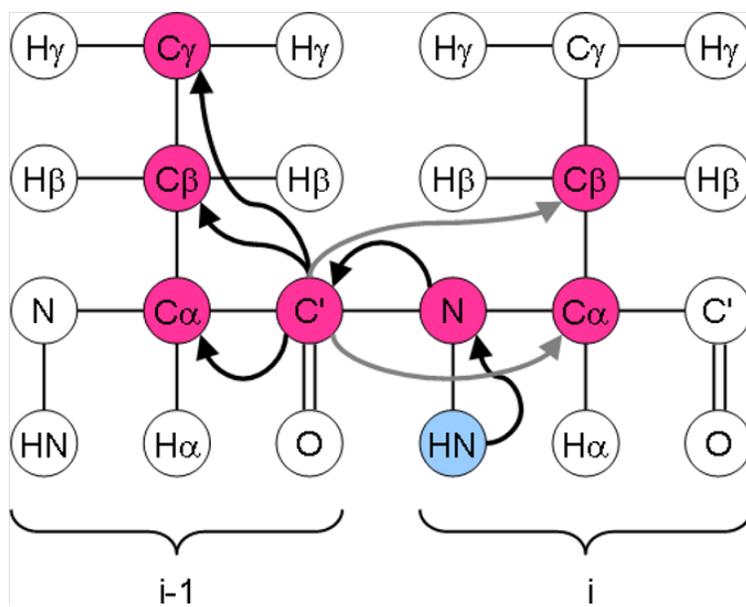


Figure 76 – Expériences de RMN du solide 3D-NCOX (image tirée de<sup>40</sup>)

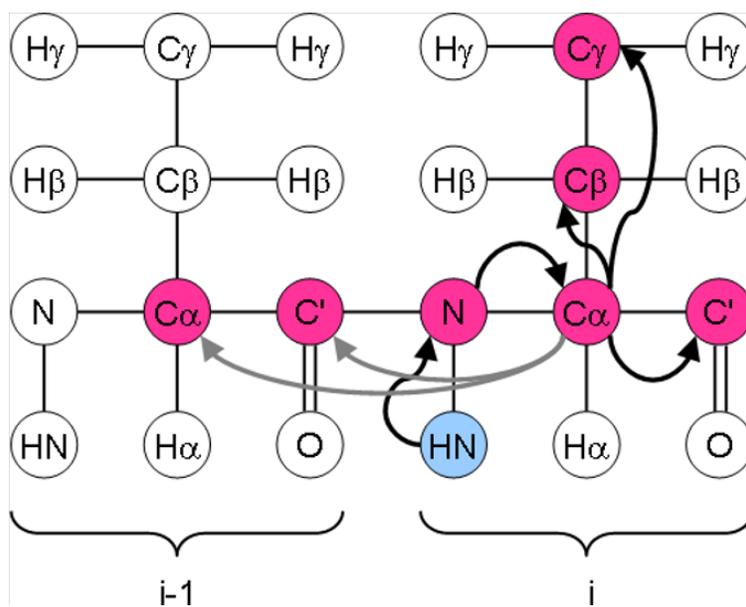


Figure 77 – Expériences de RMN du solide 3D-NCACX (image tirée de<sup>40</sup>)

Les transferts impliqués dans l'expérience 4D-CANCOX sont détaillés sur la figure 78. Dans cette expérience, l'aimantation est transférée du  $H_i$  au  $C_{\alpha i}$  par CP, puis sélectivement au  $N_i$  par CP spécifique. Une autre étape de CP spécifique est utilisée pour transférer l'aimantation sur le  $CO_{i-1}$ . Enfin, une étape PDSO est utilisée pour transférer l'aimantation à tout autre noyau  $^{13}C$  à proximité. Le déplacement chimique est évolué sur les noyaux  $^{13}C_{\alpha}$ ,  $^{15}N$  et  $^{13}CO$ , puis détecté sur le  $^{13}C$ . Cette expérience est souvent exécutée en 3D en éliminant une période d'évolution (typiquement l'évolution  $^{13}CO$ ).

Cette expérience est extrêmement utile car elle fournit des corrélations similaires à celles obtenues dans les expériences utilisant des transferts à travers les liaisons entre deux résidus séquentiels avec un schéma  $C_{\alpha i}, N_i, CO_{i-1}, C_{\alpha i-1}$ , et diminue les problèmes de chevauchement du fait qu'il s'agit d'une expérience 4D. Le principal problème de cette expérience est son faible rapport signal/bruit du fait de ses nombreux transferts d'aimantation. Les trois transferts CP ont tendance à avoir une efficacité de transfert assez faible. Sur un échantillon qui souffre d'un faible rapport signal/bruit, telles que les fibrilles de Vectofusin-1, il se peut qu'il ne reste pas assez de signal à détecter à la fin de cette expérience.

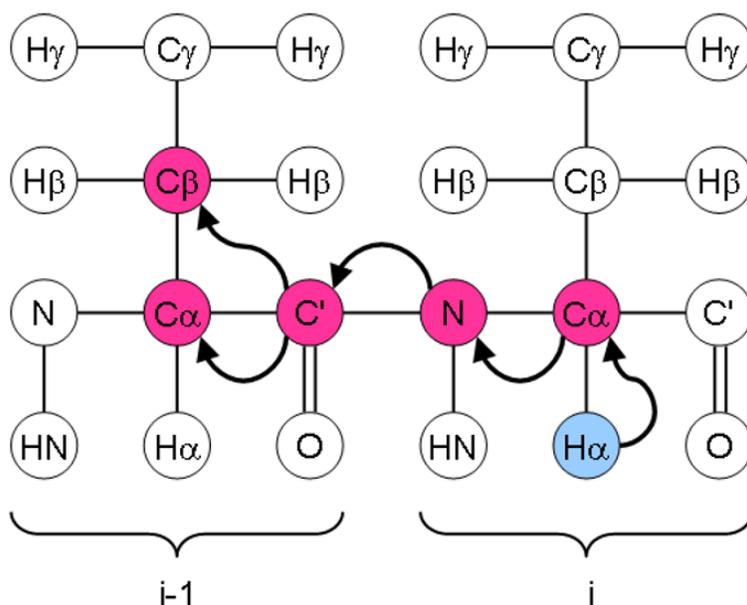


Figure 78 – Expériences de RMN du solide 4D-CANCOX (image tirée de<sup>40</sup>)

### 3.4.8 Matériel et méthode

Les fibrilles de peptide  $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Vectofusin-1 ont été transférées dans un rotor de 3.2mm spécifique pour l'usage en cryo-sonde par centrifugation en utilisant un assemblage de cônes de micropipettes.

Les expériences ont été réalisées à l'aide d'une cryo-sonde 3.2mm triple HCN(12,5kHz MAS) sur un spectromètre 600 MHz standard bore avec une console Avance Neo. La température a été réglée à 283°K en utilisant une BCU-Xtreme. (Bruker Biospin, Fällanden, Suisse).

Les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  des spectres ont été calibrés en utilisant l'adamantane comme référence secondaire<sup>84</sup>.

### 3.4.9 Résultats

La CP  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a été optimisée, le spectre est présenté sur la figure 79. Le rapport signal/bruit obtenu sur ce transfert est le plus haut et avec la meilleure résolution que nous ayons observé sur ce type d'échantillons jusqu'alors.

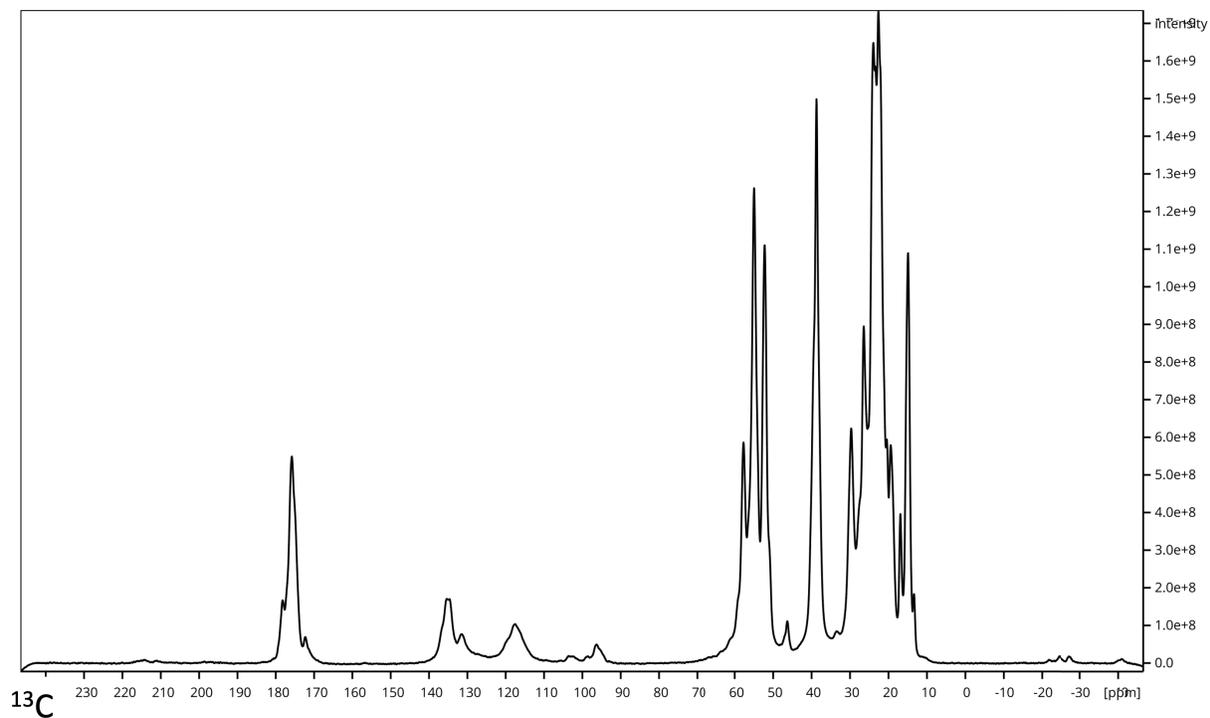


Figure 79 – Spectre de l'expérience  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -CP des fibrilles de Vectofusin-1. (16 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 23ms)

Le transfert C-C a ensuite été optimisé via une expérience 2D-DARR. La figure 80 présente le spectre de cette expérience dans son ensemble et la figure 81 présente un zoom sur la région des résonances des chaînes latérales. Les résonances observées ont une résolution assez fine de 0.6ppm  $^{13}\text{C}$ .

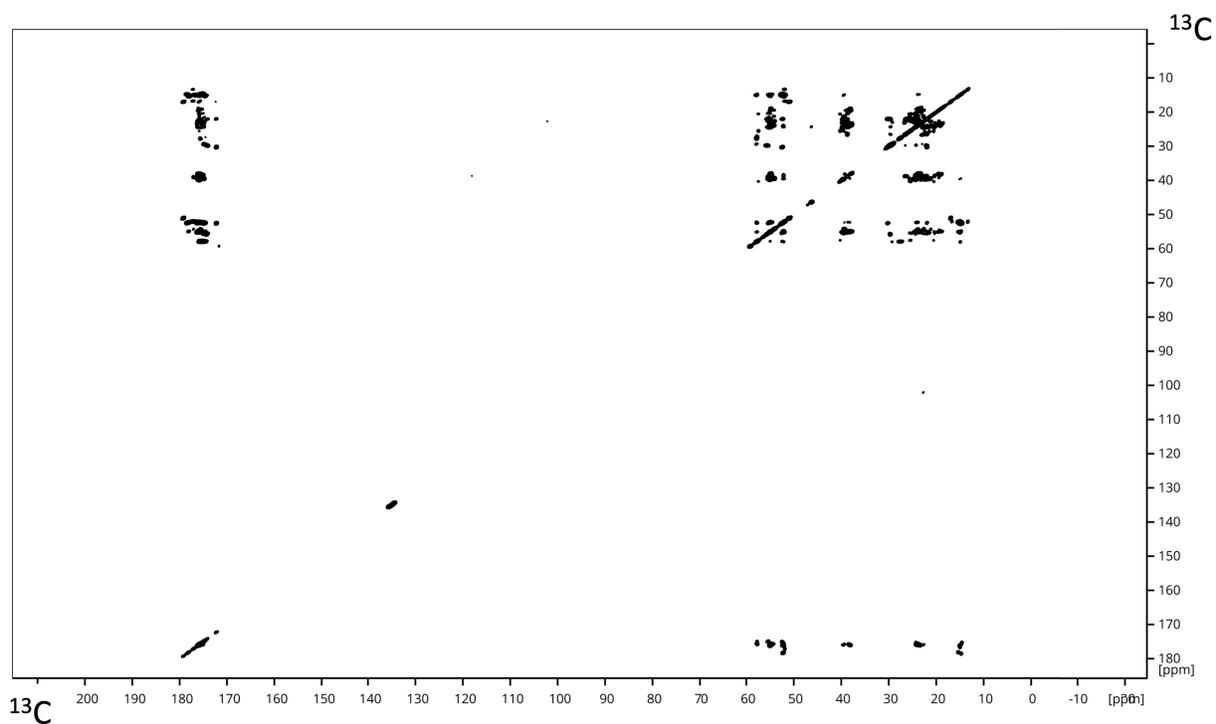


Figure 80 – Spectre de l'expérience 2D-DARR des fibrilles de Vectofusin-1. (4 scans, temps de recyclage : 2s, temps de mélange : 10ms, durée d'acquisition en dimension directe : 33ms)

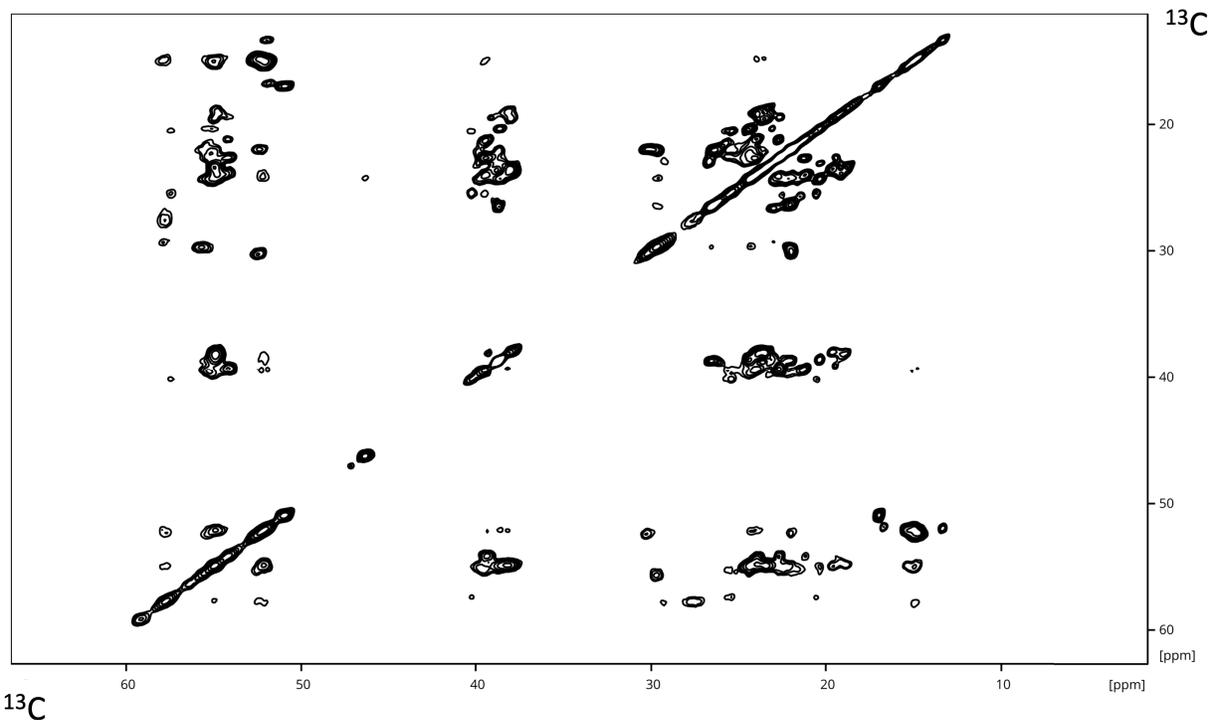


Figure 81 – région des chaînes latérales sur le spectre de l'expérience 2D-DARR des fibrilles de Vectofusin-1. (16 scans, temps de recyclage : 2s, temps de mélange : 10ms, durée d'acquisition en dimension directe : 22ms)

Le transfert  $^{15}\text{N}$ - $^{13}\text{C}$  a été optimisé via une expérience 1D-hNC dont le spectre est présenté sur la figure 82 avec un rapport signal/bruit satisfaisant pour l'utilisation dans les expériences 3D.

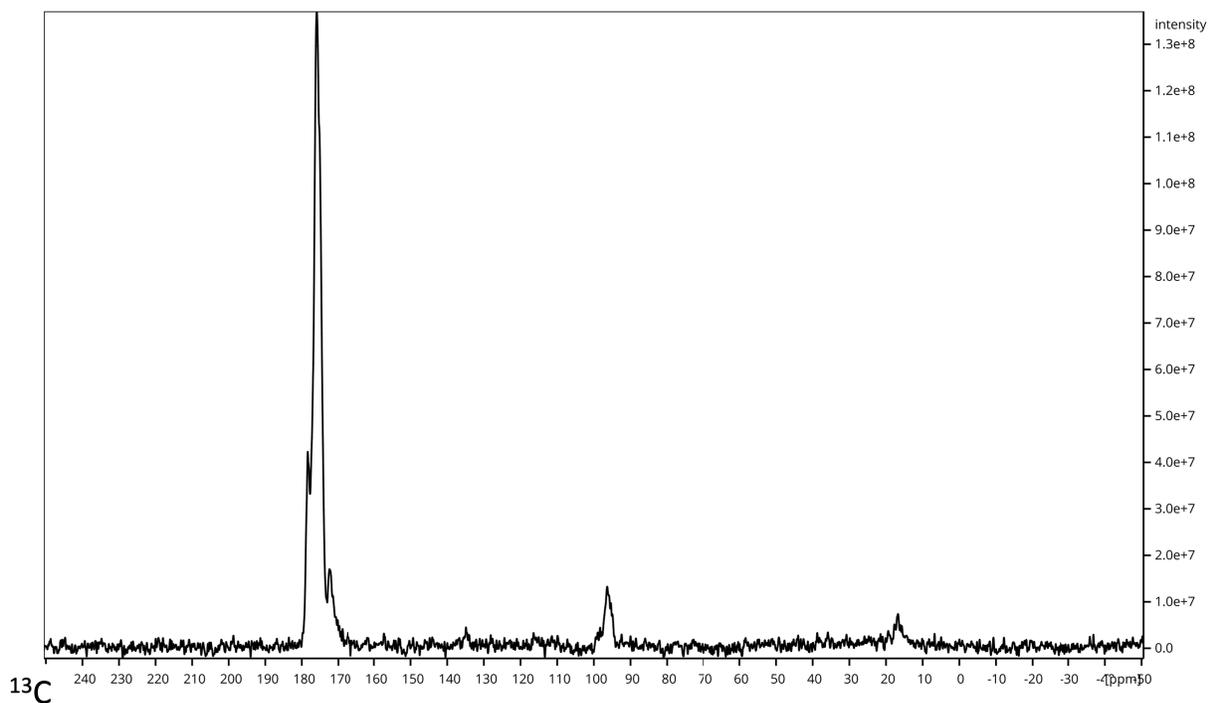


Figure 82 – Spectre de l'expérience 1D-hNC des fibrilles de Vectofusin-1. (4 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 33ms)

L'attribution des résonances sur les spectres des expériences 3D-NCOCX, 3D-NCACX et 4D-CANCOX présentés respectivement sur les figures 83, 84 est encore en cours. La résolution observée sur les spectres 3D est de 0,7ppm  $^{13}\text{C}$ , qui est une résolution suffisante pour la séparation des pics.

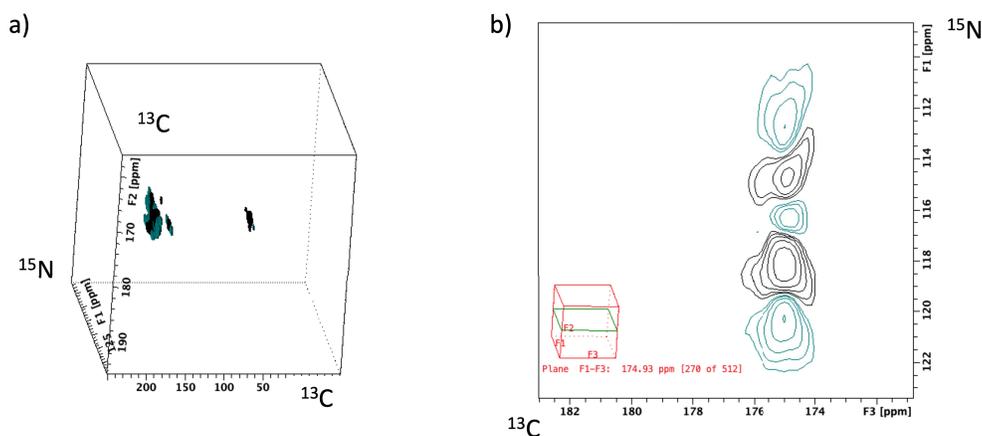


Figure 83 – a) Spectre de l'expérience 3D-NCOCX des fibrilles de Vectofusin-1. b) coupe 2D du spectre(8 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 22ms)

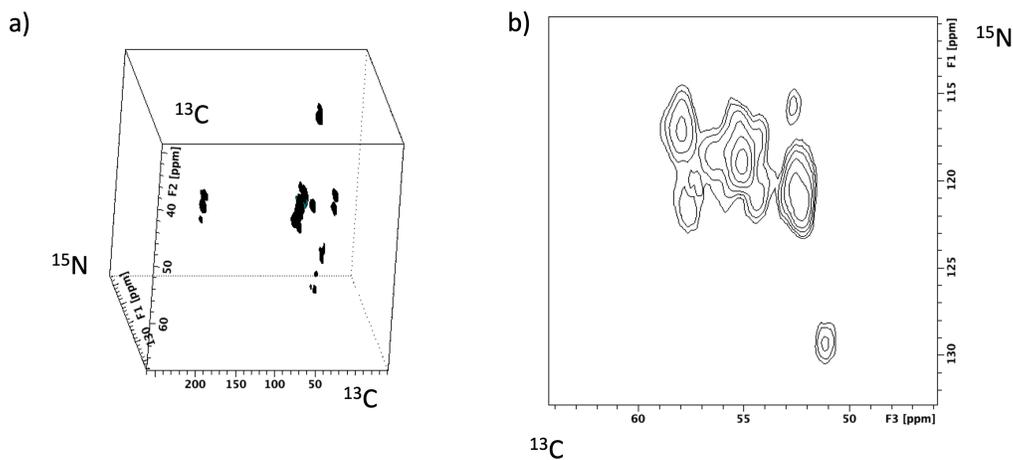


Figure 84 – a) Spectre de l'expérience 3D-NCACX des fibrilles de Vectofusin-1. b) coupe 2D du spectre (16 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 33ms)

### 3.4.10 Stratégie expérimentale pour la caractérisation d'interactions peptide-peptide

Pour étudier les contacts peptide-peptide en utilisant la RMN du solide, plusieurs techniques spécifiques peuvent être utilisées. Dans le cas des fibrilles de Vectofusin-1, de précédentes tentatives ont été réalisées par notre équipe<sup>58</sup>. Dans ce cadre, le peptide Vectofusin-1 a été synthétisé en phase solide avec différents marquages spécifiques via l'utilisation d'acides aminés isotopiquement marqués  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ . Les différents schémas de marquages sont détaillés dans la figure 85.

1	KKALL HAALA HLLAL AHHLL ALLKK A
2	KKALL HAALA HLLAL AHHLL ALLKK A
3	KKALL HAALA HLLAL AHHLL ALLKK A
4	KKALL HAALA HLLAL AHHLL ALLKK A

Figure 85 – Peptides Vectofusin-1 synthétisés avec marquage spécifique $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$ . Les parties de la séquence en rouge sont marquées isotopiquement

La stratégie qui avait été mise en place pour caractériser les zones d'interactions était de réaliser des échantillons de fibrilles formées en utilisant un mélange 50/50 de deux marquages différents. Des expériences 2D-DARR avec un temps de mélange de 400ms ont été réalisées sur ces échantillons sur une sonde 2.5mm à une vitesse de rotation de 25kHz à un champ de 500MHz. Aucune corrélation intermoléculaire entre les différents peptides marqués n'a pu être observée par ces expériences.

Nous avons donc décidé dans ce travail de réutiliser les peptides sélectivement marqués avec une approche différente.

Comme il a été décrit dans la section 3.2, les données obtenues par modélisation moléculaires prédisent un assemblage antiparallèle des peptides Vectofusin-1 avec une distance entre chaque monomère de 10Å. Il serait donc intéressant d'adopter une stratégie prenant en compte cette topologie et utilisant des transferts permettant de couvrir cette distance.

Notre objectif a été d'utiliser une combinaison des marquages 2 et 3 présentés sur la figure 85 pour obtenir un assemblage semblable à celui décrit par le modèle présenté sur la figure 86.

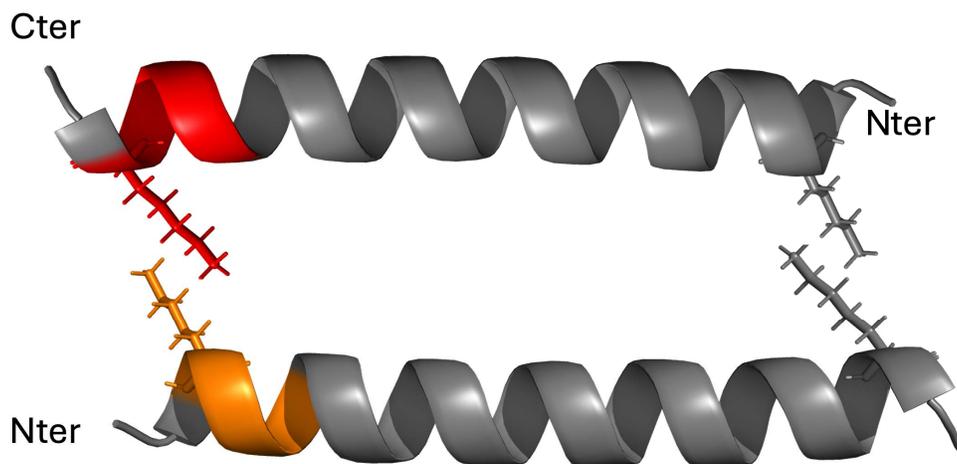


Figure 86 – Modèle de dimère de Vectofusin-1 en conformation antiparallèle avec marquage spécifique  $^{13}\text{C}$   $^{15}\text{N}$ . La partie de la séquence en rouge correspond au marquage 2 et la partie de la séquence en orange correspond au marquage 3

Les expériences RMN que nous avons choisi d'utiliser sont les expériences 2D-NHHC et 2D-CHHC décrites par Lange *et al.*<sup>52</sup>. Ces expériences permettent respectivement d'obtenir des corrélations N-C et C-C entre deux chaînes peptidiques via un transfert longue distance proton-proton.

Les transferts d'aimantation réalisés lors de ces expériences sont décrits par les figures 87 et 88.

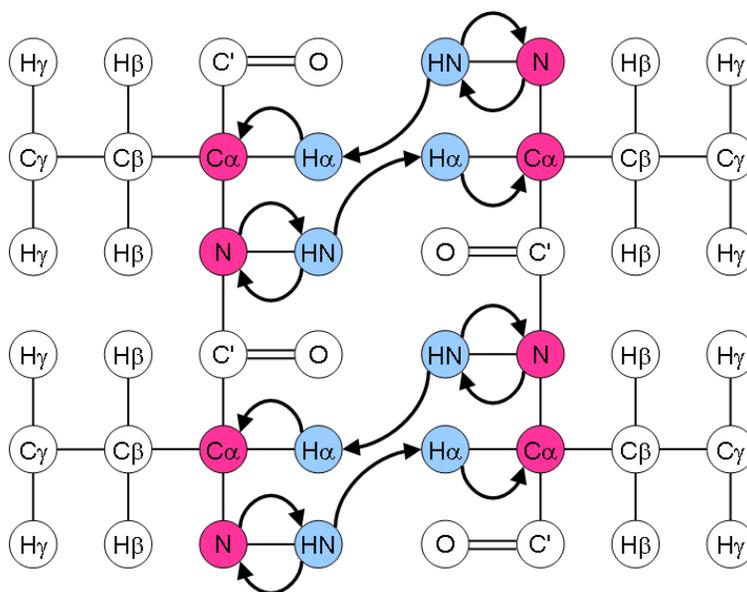


Figure 87 – Expériences de RMN du solide 2D-NHHC (image tirée de<sup>40</sup>). Dans cette expérience, l'aimantation est initialement transférée de  $^1\text{H}$  à  $^{15}\text{N}$  par CP. L'aimantation est ensuite transférée vers le proton adjacent, puis vers d'autres noyaux  $^1\text{H}$  à proximité. L'aimantation est enfin transférée vers le  $^{13}\text{C}$  pour être détectée. Le spectre obtenu est en 2D  $^{15}\text{N}\text{-}^{13}\text{C}$ <sup>52</sup>

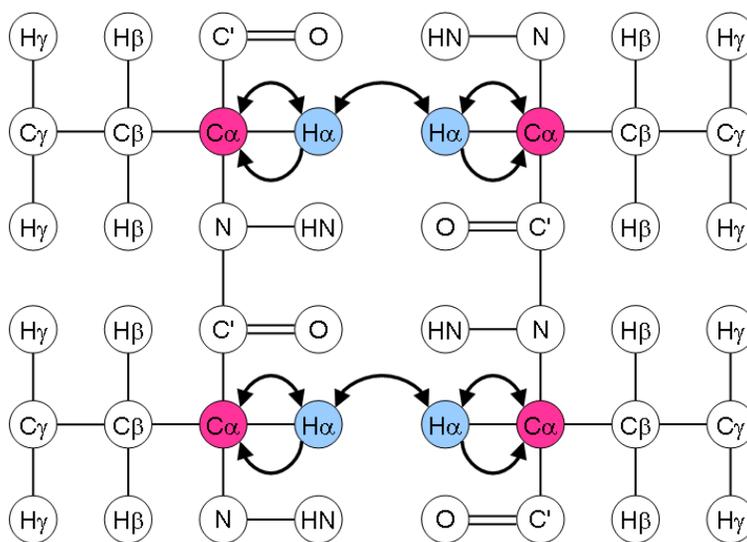


Figure 88 – Expériences de RMN du solide 2D-CHHC (image tirée de<sup>40</sup>). Dans cette expérience, l'aimantation est initialement transférée de  $^1\text{H}$  à  $^{13}\text{C}$  par CP. L'aimantation est ensuite transférée vers le proton adjacent, puis vers d'autres noyaux  $^1\text{H}$  à proximité. L'aimantation est enfin transférée vers le  $^{13}\text{C}$  pour être détectée. Le spectre obtenu est en 2D  $^{13}\text{C}\text{-}^{13}\text{C}$ <sup>52</sup>

Ces expériences contiennent des transferts proton-proton que nous avons optimisés en utilisant une expérience 2D-RFDR.

La technique RFDR (Radio Frequency Driven Recoupling) est une méthode utilisée en RMN du solide pour restaurer les interactions dipolaires entre spins nucléaires qui sont normalement atténuées par la rotation à l'angle magique. Le principe de la RFDR repose sur l'application d'une série d'impulsions RF à  $180^\circ$  ( $\pi$ -pulses) en synchronisation avec la rotation du rotor qui permettent de recoupler les interactions dipolaires entre spins voisins, en particulier entre protons. Ces impulsions ont pour effet d'inverser l'évolution de l'hamiltonien dipolaire, entre deux périodes de l'onde, annulant ainsi les effets de la rotation et recouplant les interactions dipolaires. Grâce à l'application répétée de ces impulsions, les spins voisins sont recouplés, ce qui permet le transfert de polarisation entre eux. Ce transfert est proportionnel à la distance entre les spins et il permet de détecter les contacts interatomiques qui étaient auparavant masqués par la rotation MAS<sup>98</sup>.

Coupler ces expériences avec une expérience 3D-hCCH décrite dans la section précédente nous permettra alors d'identifier tous les contacts intrarésiduels des acides aminés marqués.

## Matériel et méthode

Trois échantillons de fibrilles de peptide Vectofusin-1 sélectivement marqué ont été préparés selon le protocole décrit dans la section 3.1.3 : un échantillon avec le marquage 2, un échantillon avec le marquage 3 et un échantillon avec un ratio 50/50 de chaque marquage.

Les échantillons ont été transférées par centrifugation dans les rotors 1.3mm par centrifugation en utilisant un assemblage de cônes de micropipettes.

Les expériences ont été réalisées à l'aide d'une sonde 1.3mm triple HCN (60kHz MAS) sur un spectromètre 750 MHz wide bore avec une console Avance III. La température a été réglée à 263°K en utilisant une BCU-Xtreme (Bruker Biospin, Fällanden, Suisse).

Les expériences 2D-RFDR ont été réalisées à plusieurs temps de contact : 400 $\mu$ s, 2ms et 10ms.

Les paramètres utilisés durant les expériences réalisées sur la sonde 1.3mm sont présentés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 –

Noyau	Champs B1	Durée d'impulsion	APHH
<b>P90</b>			
$^1\text{H}$	86,5 kHz	2,89 $\mu\text{s}$	
$^{13}\text{C}$	62 kHz	4,02 $\mu\text{s}$	
$^{15}\text{N}$	34 kHz	6,96 $\mu\text{s}$	
<b><math>^1\text{H}</math>-<math>^{13}\text{C}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	105 kHz	1 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{13}\text{C}$	45 kHz		
<b><math>^1\text{H}</math>-<math>^{15}\text{N}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	96,5 kHz	1 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{15}\text{N}$	37,5 kHz		
<b><math>^{13}\text{C}</math>-<math>^{15}\text{N}</math>-CP</b>			
$^1\text{H}$	10 kHz		
$^{13}\text{C}$	85 kHz	3 ms	Tan $\alpha=88^\circ$
$^{15}\text{N}$	25 kHz		
<b>Découplages</b>			
$^1\text{H}$ hétéronucléaire	10 kHz		
$^1\text{H}$ homonucléaire	15 kHz		

## Résultats et discussion

Les CP  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  ont été optimisées (champs RF et temps de contact optimaux), les spectres de ces expériences sont présentés sur les figures 89 et 90. Le rapport signal/bruit de l'expérience  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -CP est très faible et ne permet donc pas la réalisation de l'expérience 2D-NhhC.

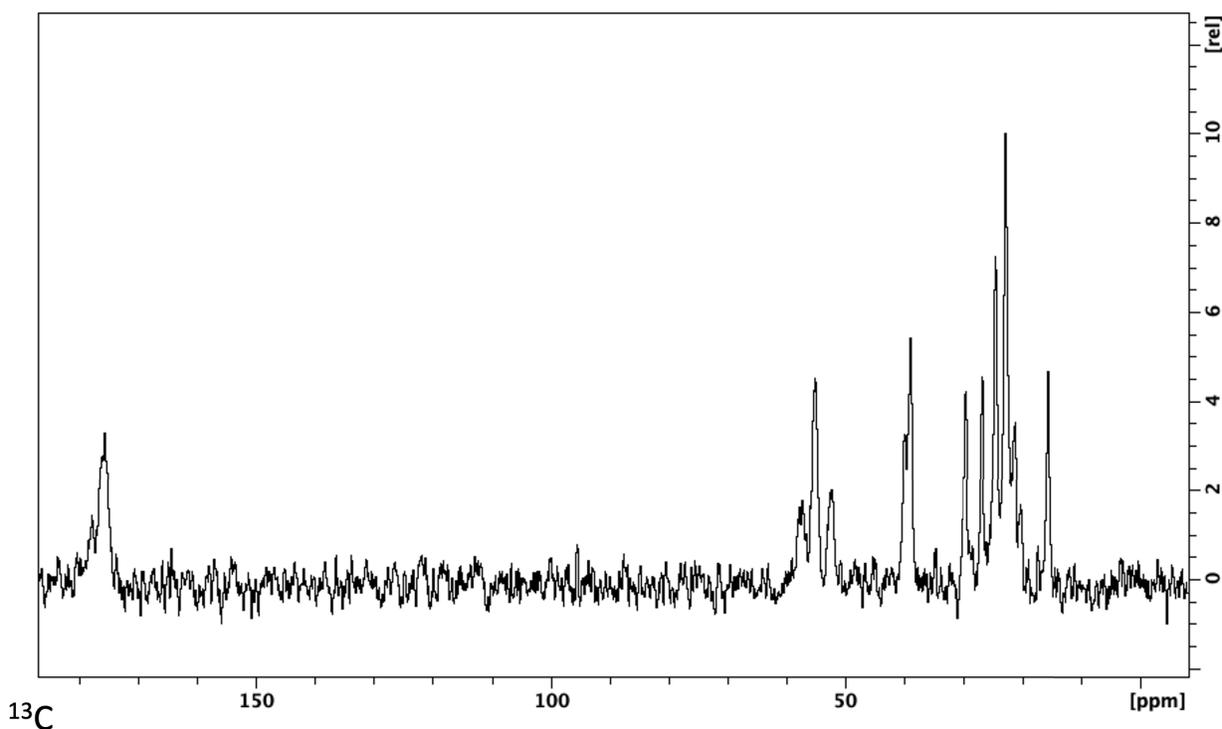


Figure 89 – Spectre de l'expérience  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -CP des fibrilles de Vectofusin-1 avec le marquage 3. (64 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 40ms)

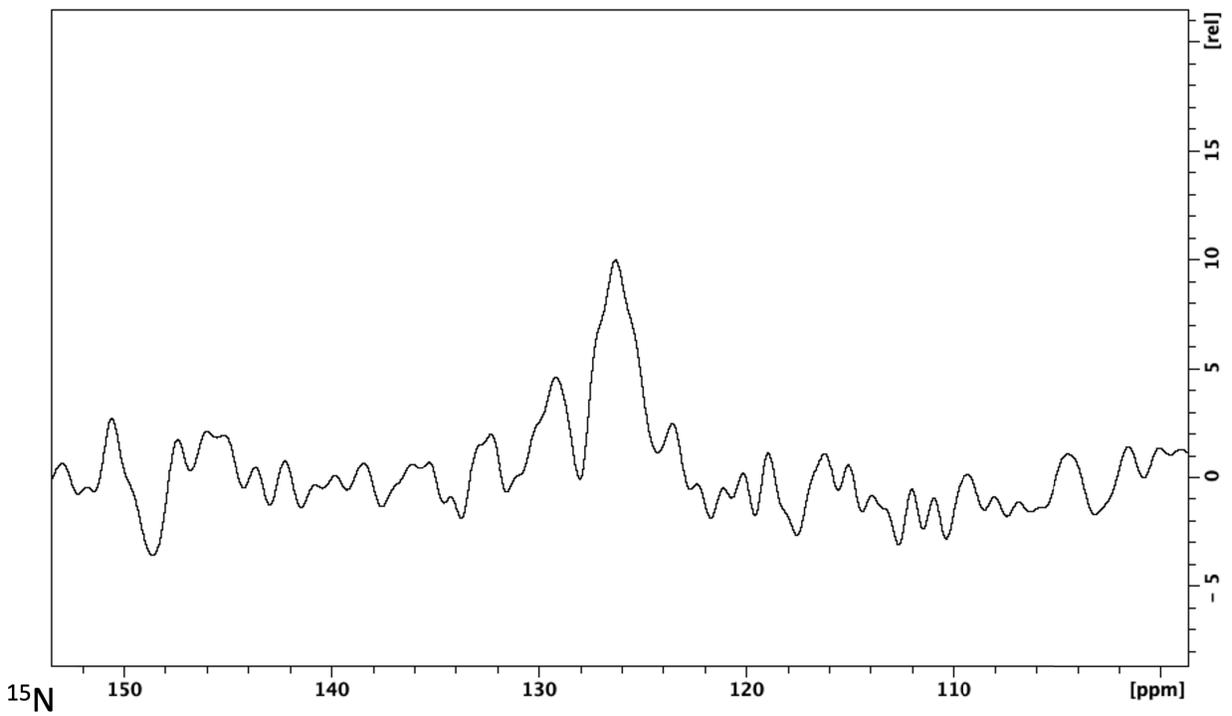


Figure 90 – Spectre de l'expérience  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -CP des fibrilles de Vectofusin-1 avec le marquage 3.(64 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 30ms)

L'expérience 3D-hCCH a été réalisée, le spectre est présenté sur la figure 91. Cette expérience nous a permis d'attribuer les résonances des résidus marqués, l'exemple de l'attribution des résonances de la lysine est présenté sur la figure 92.

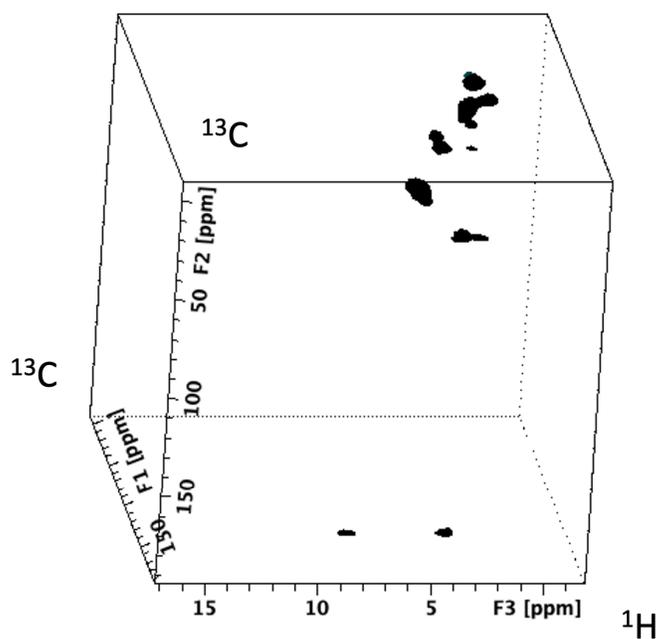


Figure 91 – Spectre de l'expérience 3D-hCCH des fibrilles de Vectofusin-1 avec le marquage 3. (64 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 30ms)

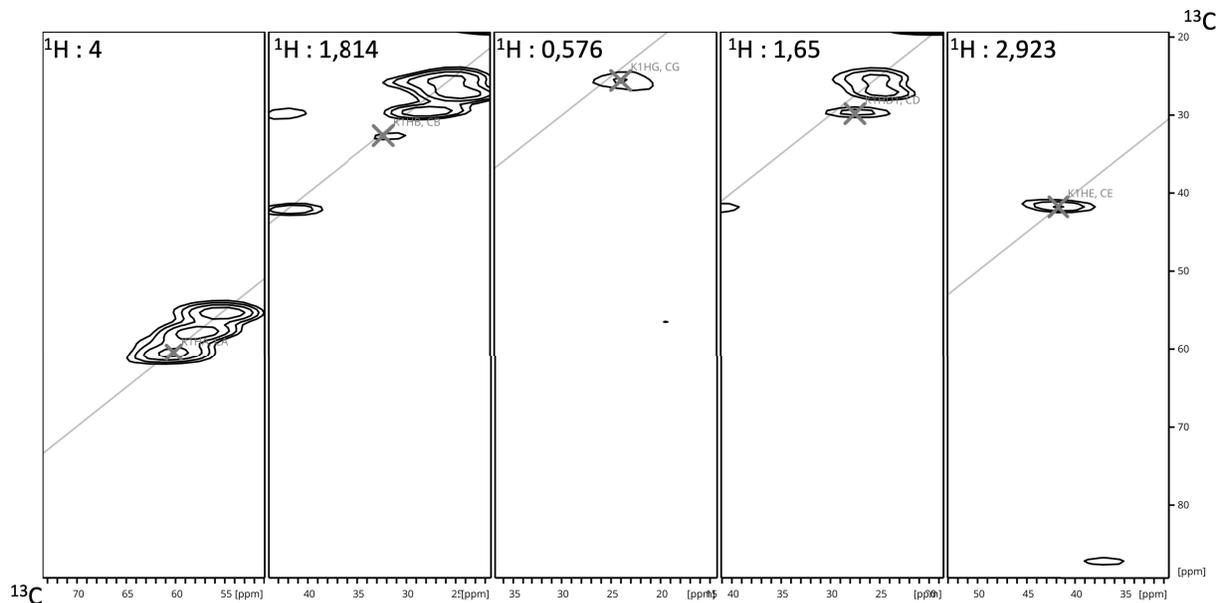


Figure 92 – Résonances observées pour la Lysine du marquage 3

L'ensemble des résonances attribuées est détaillé sur la figure 93.

Résidu	C $\alpha$	C $\beta$	C $\gamma$	C $\delta$	C $\epsilon$	H $\alpha$	H $\beta$	H $\gamma$	H $\delta$	H $\epsilon$
K2	60.5	32.6	25.5	29.5	39.485	4.005	1.814	0.576	1.65	2.923
A3	56.14	18.5				3.802	1.295			
L	58	41.8	29	24.4		4.31	1.722	1.912	0.812	
L	57.9	42	29.5	24.5		4.42	1.93	1.695	0.994	

Figure 93 – Déplacements chimiques attribués pour les fibrilles de Vectofusin-1 avec le marquage 3

Les expériences RFRDR ont été réalisées, un exemple de RFDR à 10ms de temps de contact est détaillé sur la figure 94. On peut remarquer que lorsque l'expérience est réalisée de manière synchrone, certaines corrélations à travers l'espace sont observables telles que celle des protons H $\epsilon$  et H $\gamma$  qui n'est pas observable lorsque l'expérience est asynchrone. Nous obtenons donc bien des corrélations à travers l'espace et ces transferts pourraient être utilisés pour détecter les contacts inter-peptides.

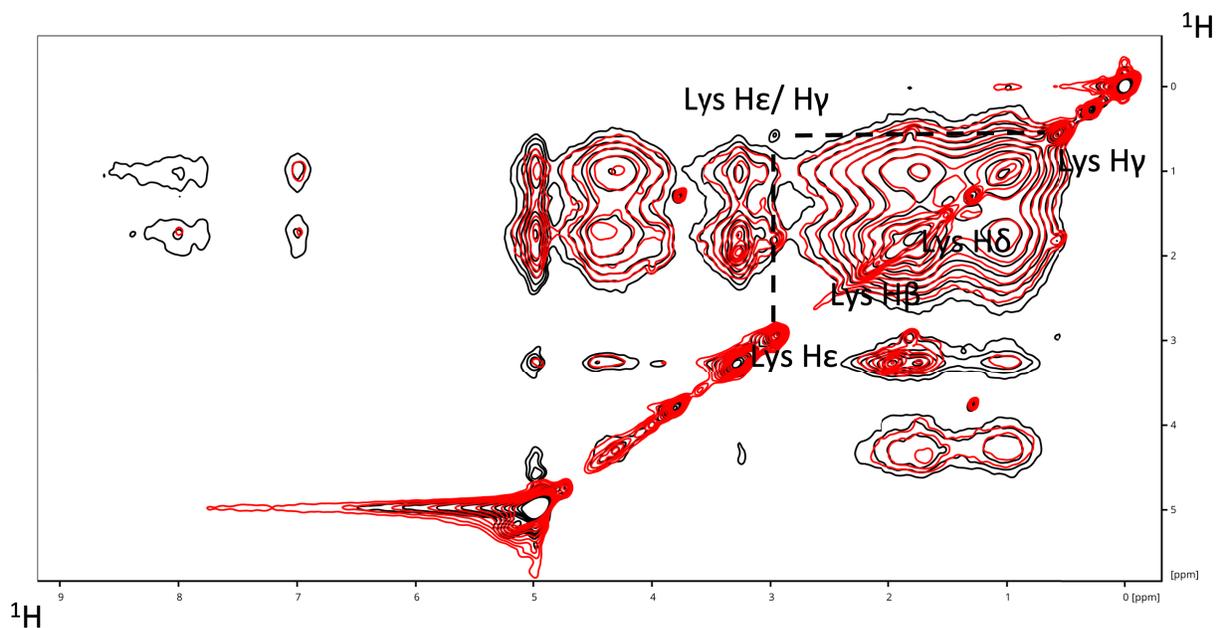


Figure 94 – Spectres d'expériences 2D-RFDR sur les fibrilles de Vectofusin-1 avec le marquage 3 (48 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 200ms). Le spectre noir correspond à une expérience synchrone (transferts réalisés via couplages dipolaires) et le spectre rouge correspond à une expérience asynchrone (transferts réalisés via couplages J ou NOE)

L'expérience ChhC a été optimisée en 1D, on peut observer (figure 95) que ce spectre montre une résonance à 50ppm inobservable dans l'expérience de CP ce qui indique l'efficacité des transferts H-H longue distance.

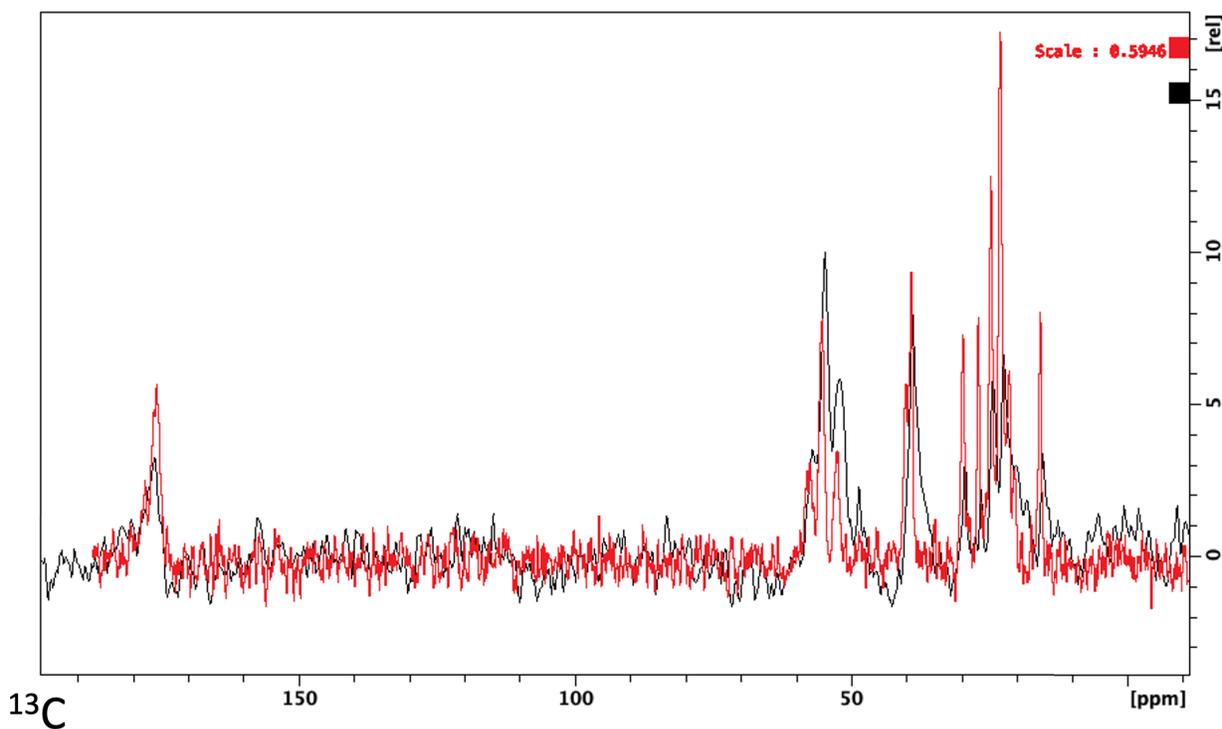


Figure 95 – Superposition des spectres d'expériences sur les fibrilles de Vectofusin-1 avec le marquage 3. 1D-ChhC en noir (1024 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 10ms) et 1D-CP<sup>13</sup>C en rouge (64 scans, temps de recyclage : 2s, durée d'acquisition en dimension directe : 40ms).

Les expériences ont ensuite été réalisées en 2-D sur deux échantillons : un échantillon de fibrilles portant le marquage 3 et un échantillon de fibrilles constitué d'un mélange 50/50 de peptides ayant le marquage 2 et de peptide ayant le marquage 3 (figure 96).

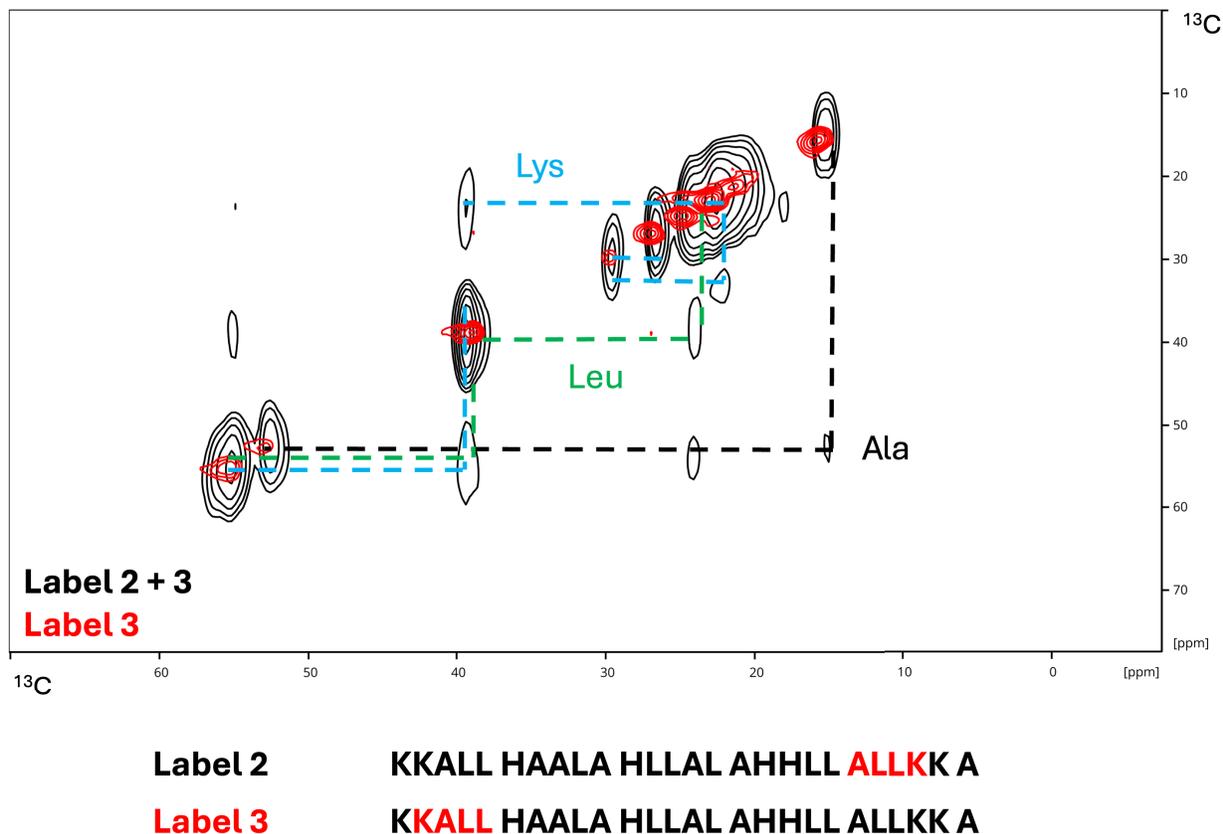


Figure 96 – Superposition des spectres d’expériences 2D-hChhC sur les fibrilles de Vectofusin-1 avec le marquage 3 (spectre rouge) et avec le mélange des marquages 2 et 3 (spectre noir). Les deux expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales (196 scans, temps de recyclage : 2s, durée d’acquisition en dimension directe : 10ms, temps de contact H-H : 500 $\mu$ s).

On peut observer sur la figure 96 que l’expérience réalisée sur les fibrilles constituées uniquement du marquage 3 ne présente aucuns crosspeaks, ce qui indique que dans ces conditions, on ne detecte pas de contacts interpeptidiques. En revanche, on observe des crosspeaks entre les différents résidus des deux marquages sur l’expérience réalisée sur des fibrilles constituées des marquages 2 et 3 ce qui indiquerait la présence de contacts interpeptidiques entre les deux séquences marquées. Ces contacts impliqueraient donc une proximité entre la partie N-terminale (marquage 3) d’une hélice et la partie C-terminale (marquage

2) d'une autre hélice au sein des fibrilles de Vectofusin-1. Une telle organisation serait cohérente avec les structures prédites par le programme AlphaFold décrites dans la partie 3.2 qui décrivent un assemblage en hélices antiparallèles.

Les expériences n'ont pas pu être poursuivies suite à un crash de rotor dans la sonde 1.3mm, la rendant inopérante. les expériences seront reprises lorsqu'elle sera à nouveau opérationnelle.

### **3.4.11 Conclusion**

Nous avons réussi à caractériser par RMN du solide les résidus lysines impliqués dans l'interaction avec les groupements phosphates permettant d'assurer la formation et la stabilisation des fibrilles de Vectofusin-1.

Nous avons ensuite tenté de réaliser l'attribution séquentielle en utilisant la technique Ultra Fast MAS avec un rotor de 0.7 mm en détection proton, mais la résolution obtenue s'est avérée insuffisante pour des attributions précises. Par la suite, nous avons utilisé une cryo-sonde de 3.2 mm, ce qui nous a permis d'obtenir une résolution suffisante et de commencer l'attribution séquentielle, qui est actuellement en cours.

Nous avons également entrepris la caractérisation des interactions peptide-peptide, avec des résultats encourageants. Ces études seront poursuivies dès que la sonde sera réparée, afin de finaliser l'analyse et approfondir la compréhension des mécanismes d'interaction.

# Conclusion générale

Durant ce travail, nous nous sommes intéressés aux peptides de la famille LAH4 et plus particulièrement au dérivé LAH4-A4 breveté sous le nom Vectofusin-1. Durant une première étude fonctionnelle, nous avons cherché à comprendre comment les propriétés d'auto-assemblage de ce peptide en fibrilles  $\alpha$ -hélicales affectent son activité biologique d'augmentation de transduction lentivirale.

Lors cette étude fonctionnelle, le comportement adopté par les peptides Vectofusin-1 lors de la mise en contact avec les milieux de cultures utilisés en thérapie génique a été étudié. Nous avons montré que les peptides sous forme monomérique ajoutés aux milieux ne s'assemblent pas en fibrilles mais en agrégats non organisés. Au contraire, des fibrilles de peptide préformées en tampon phosphate restent eux stables dans ces mêmes milieux. Au cours de notre collaboration avec le laboratoire ART-TG dirigé par la Dr. Anne Galy, nous avons montré que la forme fibrillaire de Vectofusin-1 présente une activité biologique différente de la forme monomérique. Nous avons d'abord montré que les différentes formes du peptide n'ont pas la même capacité de fixation aux vecteurs lentiviraux, les formes fibrillaires ayant une meilleure capacité de fixation et une capacité à relarguer la charge virale au cours du temps. Nous avons ensuite montré que l'activité d'augmentation de la transduction virale est grandement affectée par l'assemblage des peptides et que cette activité est dépendante du type cellulaire traité. En effet, sur les cellules de cancer colorectal humain HTC-116, les peptides Vectofusin-1 présentent une forte amélioration de la transduction virale qui est équivalente pour la forme fibrillaire et monomérique. Au contraire, pour les cellules de lymphocytes leucémiques JURKAT, la forme fibrillaire de Vectofusin-1 présente une bien meilleure activité que la forme monomérique.

Nous avons ensuite réalisé une étude structurale des assemblages de Vectofusin-1 par différentes méthodes. *In silico*, par prédiction de structure en utilisant l'algorithme Alphafold et par deux méthodes biophysiques, la microscopie électronique à transmission et la RMN à l'état solide.

Durant cette étude, nous avons montré par microscopie électronique à transmission que l'assemblage du peptide Vectofusin-1 en structures supramoléculaires est dépendant de plusieurs paramètres tels que la température, le pH, le solvant et d'actions mécaniques comme l'agitation et la sonication. De légères variations dans ces paramètres lors de la fibrillation peuvent affecter l'assemblage de manière dramatique. Nous avons montré que la formation de fibrilles nécessite un environnement où les lysines sont protonées et les histidines déprotonées, en présence de groupements phosphates. De plus, nous avons montré que les fibrilles de Vectofusin-1 peuvent s'assembler en super structures qui prennent la forme de tubules fermés aux extrémités.

Des prédictions de structures avec un haut indice de confiance ont été produites via l'algorithme Alphafold 3. Ces structures prédisent un assemblage antiparallèle des peptides avec une proximité entre les histidines des monomères suggérant une interaction stabilisatrice. De plus, les distances entre les peptides que nous avons pu mesurer dans ces modèles concordent avec les données expérimentales précédemment obtenues par notre équipe.

Pour pouvoir réaliser l'étude des assemblages de Vectofusin-1 par RMN du solide, nous avons au préalable produit un protocole d'expression et de purification reproductible du peptide Vectofusin-1 en système bactérien *E.coli* avec la possibilité de produire le peptide avec un marquage isotopique  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  avec un rendement de 10mg par litre de culture pour l'usage en RMN. Durant l'étude des fibrilles formées par le peptide Vectofusin-1 par RMN du solide, nous avons validé une méthode d'attribution séquentielle de peptide par RMN du solide en détection proton sur nos équipements. La faible résolution proton obtenue sur les fibrilles de Vectofusin-1 a rendu l'attribution séquentielle des fibrilles impossible sur notre équipement due à une superposition excessive des pics observables. Grâce à une collaboration avec la Dr. Barbara Perrone, nous avons pu réaliser les expériences équivalentes en détection hétéronoyaux dans le laboratoire d'application de Bruker à Fällanden en Suisse.

Les spectres de ces expériences sont encore en cours d'attribution mais leur résolution devrait être suffisante pour réaliser une attribution complète.

Nous avons ensuite utilisé une combinaison de marquages spécifiques  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  afin d'étudier les interactions peptide-peptide mises en jeu dans les assemblages via l'utilisation d'expériences reposant sur des transferts dipolaires proton-proton.

Enfin, nous avons pu montrer par RMN du solide via une combinaison d'expériences 2D-HETCOR  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  que les interactions liant le peptide aux groupements phosphates nécessaires à la fibrillation se font via les lysines présentes aux extrémités des peptides, confirmant en partie notre hypothèse émise lors de l'étude par TEM sur les forces mise en jeu lors de l'assemblage des peptides.

## Perspectives de l'étude

L'étude fonctionnelle des assemblages de Vectofusin-1 pourrait être continuée en réalisant une étude plus poussée sur des échantillons issus de prélèvements de patients comme dans de précédents travaux de l'ART-TG<sup>64</sup>.

L'étude réalisée sur les conditions de fibrillation du peptide Vectofusin-1 a montré que les fibrilles de Vectofusin-1 peuvent s'assembler en super structures qui prennent la forme de tubules fermés aux extrémités. Cependant, bien que ces structures puissent être produites de manière reproductible, les conditions exactes menant à la formation de ces structures ne sont pas encore connues. Une étude plus fine des conditions permettant ces assemblages pourrait permettre leur utilisation en tant que biotechnologie.

L'étude des interactions peptide-peptide par RMN du solide pourrait à l'avenir être complétée en réalisant les expériences RMN que nous avons menées sur des fibres formées à partir d'autres combinaisons de 2 peptides marqués. En outre, une stratégie consistant à exprimer des peptides marqués uniformément  $^{13}\text{C}$  et d'autres peptides marqués uniformément  $^{15}\text{N}$  permettrait de réaliser des expériences avec des transferts spécifiques  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  qui faciliteraient l'attribution, notamment au niveau des histidines. De telles expériences pourraient permettre de valider ou infirmer les modèles prédits par Alphafold durant ce travail. De tels marquages rendraient aussi possible l'utilisation d'expériences REDOR qui sont des expériences RMN permettant de mesurer des distances dans les solides, nous donnant ainsi plus d'informations sur la structure des fibrilles.

Enfin, une fois la compréhension des assemblages de Vectofusin-1 suffisamment avancée, il sera alors envisageable d'étudier les interactions entre les peptides et les vecteurs viraux par RMN du solide.

# Bibliographie

- [1] Christopher Aisenbrey, Mariana Amaro, Petr Pospíšil, Martin Hof, and Burkhard Bechinger. Highly synergistic antimicrobial activity of magainin 2 and pglA peptides is rooted in the formation of supramolecular complexes with lipids. *Scientific reports*, 10(1) :11652, 2020.
- [2] Alessandro Aiuti, Luca Biasco, Samantha Scaramuzza, Francesca Ferrua, Maria Pia Cicalese, Cristina Baricordi, Francesca Dionisio, Andrea Calabria, Stefania Giannelli, Maria Carmina Castiello, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with wiskott-aldrich syndrome. *Science*, 341(6148) :1233151, 2013.
- [3] ER Andrew. Magic angle spinning. *International Reviews in Physical Chemistry*, 1(2) :195–224, 1981.
- [4] Emeline Barbet-Massin, Andrew J Pell, Joren S Retel, Loren B Andreas, Kristaps Jaudzems, W Trent Franks, Andrew J Nieuwkoop, Matthias Hiller, Victoria Higman, Paul Guerry, et al. Rapid proton-detected nmr assignment for proteins with fast magic angle spinning. *Journal of the American Chemical Society*, 136(35) :12489–12497, 2014.
- [5] Burkhard Bechinger. Towards membrane protein design : ph-sensitive topology of histidine-containing polypeptides. *Journal of molecular biology*, 263(5) :768–775, 1996.
- [6] Burkhard Bechinger. The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state nmr spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1-2) :157–183, 1999.
- [7] Burkhard Bechinger, Verica Vidovic, Philippe Bertani, and Antoine Kichler. A new family of peptide–nucleic acid nanostructures with potent transfection activities. *Journal of Peptide Science*, 17(2) :88–93, 2011.
- [8] Burkhard Bechinger, Justine Wolf, Ludovicus Vermeer, Arnaud Marquette, Morane Lointier, Jesus Raya, Verica Vidovic, Philippe Bertani, Dennis Juhl, Antoine Kichler,

- et al. Histidine-rich designer peptides with antimicrobial, transfection and transduction activities. *Peptide Science*, page 13, 2018.
- [9] Joseph L Beesley and Derek N Woolfson. The de novo design of  $\alpha$ -helical peptides for supramolecular self-assembly. *Current Opinion in Biotechnology*, 58 :175–182, 2019. Systems Biology Nanobiotechnology.
- [10] Raymond Behrendt, Peter White, and John Offer. Advances in fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, 22(1) :4–27, 2016.
- [11] Zachary D Blount. The unexhausted potential of e. coli. *Elife*, 4 :e05826, 2015.
- [12] AG Bonner, LM Udell, WA Creasey, SR Duly, and RA Laursen. Solid-phase precipitation and extraction, a new separation process applied to the isolation of synthetic peptides : Authors’ affiliations. *The Journal of Peptide Research*, 57(1) :48–58, 2001.
- [13] E Brunner, D Freude, BC Gerstein, and H Pfeifer. Residual linewidths of nmr spectra of spin-12 systems under magic-angle spinning. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 90(1) :90–99, 1990.
- [14] Tauseef R Butt, Suzanne C Edavettal, John P Hall, and Michael R Mattern. Sumo fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein expression and purification*, 43(1) :1–9, 2005.
- [15] Teresa Carlomagno. Present and future of nmr for rna–protein complexes : A perspective of integrated structural biology. *Journal of Magnetic Resonance*, 241 :126–136, 2014.
- [16] Dominic Chow, Michelle L Nunalee, Dong Woo Lim, Andrew J Simnick, and Ashutosh Chilkoti. Peptide-based biopolymers in biomedicine and biotechnology. *Materials Science and Engineering : R : Reports*, 62(4) :125–155, 2008.
- [17] Kenneth Cornetta and W French Anderson. Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer : implications for human gene therapy. *Journal of virological methods*, 23(2) :187–194, 1989.
- [18] Cameron Cox, Jessica Hale, Paulina Molinska, and James Lewis. (supra-) molecular capsules. 2024.
- [19] Guillaume David, Marie-Laure Fogeron, Maarten Schledorn, Roland Montserret, Uta Haselmann, Susanne Penzel, Aurélie Badillo, Lauriane Lecoq, Patrice André, Michael

- Nassal, et al. Structural studies of self-assembled subviral particles : Combining cell-free expression with 110 khz mas nmr spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(17) :4787–4791, 2018.
- [20] Inês Rego de Figueiredo, João Miguel Freire, Luís Flores, Ana Salomé Veiga, and Miguel ARB Castanho. Cell-penetrating peptides : a tool for effective delivery in gene-targeted therapies. *Iubmb Life*, 66(3) :182–194, 2014.
- [21] Roland L Dunbrack Jr. Sequence comparison and protein structure prediction. *Current opinion in structural biology*, 16(3) :374–384, 2006.
- [22] Ruth Duncan. Drug-polymer conjugates : potential for improved chemotherapy. *Anti-cancer drugs*, 3(3) :175–210, 1992.
- [23] Emelía Eiríksdóttir, Karidia Konate, Ülo Langel, Gilles Divita, and Sébastien Deshayes. Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1798(6) :1119–1128, 2010.
- [24] Richard R Ernst, Geoffrey Bodenhausen, and Alexander Wokaun. *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*. Oxford university press, 1990.
- [25] Richard Evans, Michael O'Neill, Alexander Pritzel, Natasha Antropova, Andrew Senior, Tim Green, Augustin Žídek, Russ Bates, Sam Blackwell, Jason Yim, et al. Protein complex prediction with alphafold-multimer. *bioRxiv*, pages 2021–10, 2021.
- [26] David Fenard, Dina Ingrao, Ababacar Seye, Julien Buisset, Sandrine Genries, Samia Martin, Antoine Kichler, and Anne Galy. Vectofusin-1, a New Viral Entry Enhancer, Strongly Promotes Lentiviral Transduction of Human Hematopoietic Stem Cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2 :e90, 2013.
- [27] Max Feughelman. Natural protein fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, 83(3) :489–507, 2002.
- [28] W Trent Franks, Kathryn D Kloepper, Benjamin J Wylie, and Chad M Rienstra. Four-dimensional heteronuclear correlation experiments for chemical shift assignment of solid proteins. *Journal of biomolecular NMR*, 39 :107–131, 2007.
- [29] Pascal Fricke, Veniamin Chevelkov, Maximilian Zinke, Karin Giller, Stefan Becker, and Adam Lange. Backbone assignment of perdeuterated proteins by solid-state nmr using

- proton detection and ultrafast magic-angle spinning. *Nature Protocols*, 12(4) :764–782, 2017.
- [30] Anne Galy, Maria-Grazia Roncarolo, and Adrian J Thrasher. Development of lentiviral gene therapy for wiskott aldrich syndrome. *Expert opinion on biological therapy*, 8(2) :181–190, 2008.
- [31] Anne Galy and Adrian J Thrasher. Gene therapy for the wiskott–aldrich syndrome. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 11(6) :545–550, 2011.
- [32] Carole Gardiennet, Anne K Schütz, Andreas Hunkeler, Britta Kunert, Laurent Terra-dot, Anja Böckmann, and Beat H Meier. A sedimented sample of a 59 kda dodecameric helicase yields high-resolution solid-state nmr spectra. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(31) :7855–7858, 2012.
- [33] Jason Greenwald and Roland Riek. Biology of amyloid : structure, function, and regulation. *Structure*, 18(10) :1244–1260, 2010.
- [34] Neda Habibi, Nazila Kamaly, Adnan Memic, and Hadi Shafiee. Self-assembled peptide-based nanostructures : Smart nanomaterials toward targeted drug delivery. *Nano today*, 11(1) :41–60, 2016.
- [35] Ian W Hamley. Peptide fibrillization. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(43) :8128–8147, 2007.
- [36] Sandra Harper and David W Speicher. Expression and purification of gst fusion proteins. *Current protocols in protein science*, 52(1) :6–6, 2008.
- [37] Alia Hassan, Caitlin M Quinn, Jochem Struppe, Ivan V Sergeyev, Chunting Zhang, Changmiao Guo, Brent Runge, Theint Theint, Hanh H Dao, Christopher P Jaroniec, et al. Sensitivity boosts by the cpmas cryoprobe for challenging biological assemblies. *Journal of Magnetic Resonance*, 311 :106680, 2020.
- [38] MA Eric Hayat. *Basic techniques for transmission electron microscopy*. Elsevier, 2012.
- [39] S Hediger, BH Meier, Narayanan D Kurur, Geoffrey Bodenhausen, and RR Ernst. Nmr cross polarization by adiabatic passage through the hartmannhahn condition (aphh). *Chemical Physics Letters*, 223(4) :283–288, 1994.
- [40] Victoria A. Higman. Protein nmr a practical guide. 2012.

- [41] Victoria A. Higman. Solid-state MAS NMR resonance assignment methods for proteins. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 106-107 :37–65, June 2018.
- [42] Clague P Hodgson and Fauzia Solaiman. Virosomes : cationic liposomes enhance retroviral transduction. *Nature biotechnology*, 14(3) :339–342, 1996.
- [43] Cynthia L Innes, PB Smith, R Langenbach, KR Tindall, and LR Boone. Cationic liposomes (lipofectin) mediate retroviral infection in the absence of specific receptors. *Journal of Virology*, 64(2) :957–961, 1990.
- [44] Jean Joseph, Frank Palmino, Judicaël Jeannoutot, Jésus Raya, Mathilde Berville, Jean Weiss, Jennifer A Wytko, and Frédéric Cherioux. Unravelling the localization of counter-ions in ionic self-assemblies on a hopg surface. In *GDR New Molecular Electronics*, 2023.
- [45] John Jumper, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, Russ Bates, Augustin Žídek, Anna Potapenko, et al. Highly accurate protein structure prediction with alphafold. *nature*, 596(7873) :583–589, 2021.
- [46] Kerstin B Kaufmann, Hildegard Büning, Anne Galy, Axel Schambach, and Manuel Grez. Gene therapy on the move. *EMBO molecular medicine*, 5(11) :1642–1661, 2013.
- [47] Kataoka Kazunori, Yokoyama Masayuki, Okano Teruo, Sakurai Yasuhisa, et al. Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *Journal of controlled release*, 24(1-3) :119–132, 1993.
- [48] James Keeler. *Understanding NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2010.
- [49] Antoine Kichler, Burkhard Bechinger, and Olivier Danos. Des peptides cationiques antibactériens comme vecteurs de transfert de gènes. *médecine/sciences*, 19(11) :1046–1047, 2003.
- [50] Britta Kunert, Carole Gardiennet, Denis Lacabanne, Daniel Calles-Garcia, Pierre Falson, Jean-Michel Jault, Beat H Meier, François Penin, and Anja Böckmann. Efficient and stable reconstitution of the abc transporter bmra for solid-state nmr studies. *Frontiers in molecular biosciences*, 1 :5, 2014.
- [51] Vilius Kurauskas, Sergei A. Izmailov, Olga N. Rogacheva, Audrey Hessel, Isabel Ayala, Joyce Woodhouse, Anastasya Shilova, Yi Xue, Tairan Yuwen, Nicolas Coquelle,

- Jacques-Philippe Colletier, Nikolai R. Skrynnikov, and Paul Schanda. Slow conformational exchange and overall rocking motion in ubiquitin protein crystals. *Nature Communications*, 8(1) :145, July 2017.
- [52] Adam Lange, Sorin Luca, and Marc Baldus. Structural constraints from proton-mediated rare-spin correlation spectroscopy in rotating solids. *Journal of the American Chemical Society*, 124(33) :9704–9705, 2002.
- [53] Ülo Langel et al. *Cell-penetrating peptides*. Springer, 2011.
- [54] Yann Le Brech, Luc Delmotte, Jesus Raya, Nicolas Brosse, Roger Gadiou, and Anthony Dufour. High resolution solid state 2d nmr analysis of biomass and biochar. *Analytical Chemistry*, 87(2) :843–847, 2015.
- [55] Hyun-Joo Lee, Yong-Soo Lee, Hye-Sun Kim, Yu-Kyung Kim, Jae-Hwan Kim, Seong-Ho Jeon, Hyeon-Woo Lee, Sinae Kim, Hiroyuki Miyoshi, Hyung-Min Chung, et al. Retronectin enhances lentivirus-mediated gene delivery into hematopoietic progenitor cells. *Biologicals*, 37(4) :203–209, 2009.
- [56] Malcolm H Levitt. *Spin dynamics : basics of nuclear magnetic resonance*. John Wiley & Sons, 2008.
- [57] Weijun Li, François Nicol, and Francis C Szoka Jr. Gala : a designed synthetic ph-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 56(7) :967–985, 2004.
- [58] Morane Lointier. *Structural and functional investigations of designed histidine-rich peptides with potent antimicrobial, transfection, and lentiviral transduction activities*. PhD thesis, 2020. 2020STRAF025.
- [59] Morane Lointier, Christopher Aisenbrey, Arnaud Marquette, Jia Hao Tan, Antoine Kichler, and Burkhard Bechinger. Membrane pore-formation correlates with the hydrophilic angle of histidine-rich amphipathic peptides with multiple biological activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1862(8) :183212, August 2020.
- [60] Morane Lointier, Candice Dussouillez, Elise Glattard, Antoine Kichler, and Burkhard Bechinger. Different biological activities of histidine-rich peptides are favored by variations in their design. *Toxins*, 13(5) :363, 2021.

- [61] Morane Lointier, Candice Dussouillez, Elise Glattard, Antoine Kichler, and Burkhard Bechinger. Different Biological Activities of Histidine-Rich Peptides Are Favored by Variations in Their Design. *Toxins*, 13(5) :363, May 2021.
- [62] Antoine Loquet, Nadia El Mammeri, Jan Stanek, Mélanie Berbon, Benjamin Bardiaux, Guido Pintacuda, and Birgit Habenstein. 3d structure determination of amyloid fibrils using solid-state nmr spectroscopy. *Methods*, 138 :26–38, 2018.
- [63] Haiqing Ma, Yaojun Zhang, Qijing Wang, Yongqiang Li, Jia He, Hui Wang, Jiancong Sun, Ke Pan, Minshan Chen, and Jian-Chuan Xia. Therapeutic safety and effects of adjuvant autologous retronectin activated killer cell immunotherapy for patients with primary hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Cancer biology & therapy*, 9(11) :903–907, 2010.
- [64] Saliha Majdoul, Ababacar K. Seye, Antoine Kichler, Nathalie Holic, Anne Galy, Burkhard Bechinger, and David Fenard. Molecular Determinants of Vectofusin-1 and Its Derivatives for the Enhancement of Lentivirally Mediated Gene Transfer into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291(5) :2161–2169, January 2016.
- [65] Andreja Majerle, Jurka Kidrič, and Roman Jerala. Production of stable isotope enriched antimicrobial peptides in escherichia coli : an application to the production of a  $^{15}\text{N}$ -enriched fragment of lactoferrin. *Journal of Biomolecular NMR*, 18 :145–151, 2000.
- [66] Xiaobo Mao, Yuanyuan Guo, Yin Luo, Lin Niu, Lei Liu, Xiaojing Ma, Huibin Wang, Yanlian Yang, Guanghong Wei, and Chen Wang. Sequence effects on peptide assembly characteristics observed by using scanning tunneling microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 135(6) :2181–2187, 2013.
- [67] Valerio Mariani, Marco Biasini, Alessandro Barbato, and Torsten Schwede. lddt : a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics*, 29(21) :2722–2728, 2013.
- [68] Debora S Marks, Thomas A Hopf, and Chris Sander. Protein structure prediction from sequence variation. *Nature biotechnology*, 30(11) :1072–1080, 2012.
- [69] Arnaud Marquette, Evgeniy S Salnikov, Elise Glattard, Christopher Aisenbrey, and Burkhard Bechinger. Magainin 2-pgla interactions in membranes-two peptides that

- exhibit synergistic enhancement of antimicrobial activity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(1) :65–75, 2016.
- [70] Renny Mathew, Claudia Turdean-Ionescu, Yang Yu, Baltzar Stevansson, Isabel Izquierdo-Barba, Ana García, Daniel Arcos, María Vallet-Regí, and Mattias Edén. Proton environments in biomimetic calcium phosphates formed from mesoporous bio-active cao–sio2–p2o5 glasses in vitro : Insights from solid-state nmr. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(24) :13223–13238, 2017.
- [71] Beat H Meier, Roland Riek, and Anja Böckmann. Emerging structural understanding of amyloid fibrils by solid-state nmr. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(10) :777–787, 2017.
- [72] Christoph Meier, Tanja Weil, Frank Kirchhoff, and Jan Münch. Peptide nanofibrils as enhancers of retroviral gene transfer. *Wiley Interdisciplinary Reviews : Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 6(5) :438–451, 2014.
- [73] Robert B Merrifield. Solid phase peptide synthesis. i. the synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14) :2149–2154, 1963.
- [74] Otto-Wilhelm Merten, Sabine Charrier, Nicolas Laroudie, Sylvain Fauchille, Céline Dugué, Christine Jenny, Muriel Audit, Maria-Antonietta Zanta-Boussif, Hélène Chautard, Marina Radrizzani, et al. Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. *Human gene therapy*, 22(3) :343–356, 2011.
- [75] Dan E Meyer, Garheng A Kong, Mark W Dewhirst, Michael R Zalutsky, and Ashutosh Chilkoti. Targeting a genetically engineered elastin-like polypeptide to solid tumors by local hyperthermia. *Cancer research*, 61(4) :1548–1554, 2001.
- [76] Łukasz Mielańczyk, Natalia Matysiak, Olesya Klymenko, and Romuald Wojnicz. Transmission electron microscopy of biological samples. *Transm Electron Microscope-Theory Appl*, pages 193–236, 2015.
- [77] Robert Mierendorf, Keith Yeager, Robert Novy, et al. The pet system : your choice for expression. *Innovations*, 1(1) :1–3, 1994.
- [78] Robert C Mierendorf, Barbara B Morris, Beth Hammer, and Robert E Novy. Expression and purification of recombinant proteins using the pet system. *The nucleic acid protocols handbook*, pages 947–977, 2000.

- [79] Jessalyn G Miller, Spencer A Hughes, Charles Modlin, and Vincent P Conticello. Structures of synthetic helical filaments and tubes based on peptide and peptido-mimetic polymers. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 55 :e2, 2022.
- [80] Federico Mingozzi and Katherine A High. Immune responses to aav vectors : overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(1) :23–36, 2013.
- [81] Alan Ribeiro Mol, Mariana S Castro, and Wagner Fontes. Netwheels : A web application to create high quality peptide helical wheel and net projections. *BioRxiv*, page 416347, 2018.
- [82] Won Jae Moon, Dong Kyu Hwang, Eu Jin Park, Yang Mee Kim, and Young Kee Chae. Recombinant expression, isotope labeling, refolding, and purification of an antimicrobial peptide, piscidin. *Protein expression and purification*, 51(2) :141–146, 2007.
- [83] YU Moon, RA Curtis, CO Anderson, HW Blanch, and JM Prausnitz. Protein-protein interactions in aqueous ammonium sulfate solutions. lysozyme and bovine serum albumin (bsa). *Journal of Solution Chemistry*, 29 :699–718, 2000.
- [84] Corey R Morcombe and Kurt W Zilm. Chemical shift referencing in mas solid state nmr. *Journal of Magnetic Resonance*, 162(2) :479–486, 2003.
- [85] Gilles Moulay, Christian Leborgne, A James Mason, Christopher Aisenbrey, Antoine Kichler, and Burkhard Bechinger. Histidine-rich designer peptides of the lah4 family promote cell delivery of a multitude of cargo. *Journal of Peptide Science*, 23(4) :320–328, 2017.
- [86] Luciano Mueller. Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence. *Journal of the American Chemical Society*, 101(16) :4481–4484, 1979.
- [87] Klaus Müller and Marco Geppi. *Solid State NMR : Principles, Methods, and Applications*. John Wiley & Sons, 2021.
- [88] Jan Münch, Elke Rücker, Ludger Ständker, Knut Adermann, Christine Goffinet, Michael Schindler, Steffen Wildum, Raghavan Chinnadurai, Devi Rajan, Anke Specht, et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance hiv infection. *Cell*, 131(6) :1059–1071, 2007.

- [89] Luigi Naldini. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nature Reviews Genetics*, 12(5) :301–315, 2011.
- [90] F. Napoli, J.-Y. Guan, C.-A. Arnaud, P. Macek, H. Fraga, C. Breyton, and P. Schanda. Deuteration of proteins boosted by cell lysates : high-resolution amide and  $\alpha$  magic-angle-spinning (mas) nmr without the reprotonation bottleneck. *Magnetic Resonance*, 5(1) :33–49, 2024.
- [91] Nouri Nayerossadat, Talebi Maedeh, and Palizban Abas Ali. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced biomedical research*, 1, 2012.
- [92] Jiban Jyoti Panda and Virander Singh Chauhan. Short peptide based self-assembled nanostructures : implications in drug delivery and tissue engineering. *Polymer chemistry*, 5(15) :4418–4436, 2014.
- [93] Katia Pane, Lorenzo Durante, Elio Pizzo, Mario Varcamonti, Anna Zanfardino, Valeria Sgambati, Antimo Di Maro, Andrea Carpentieri, Viviana Izzo, Alberto Di Donato, et al. Rational design of a carrier protein for the production of recombinant toxic peptides in escherichia coli. *PloS one*, 11(1) :e0146552, 2016.
- [94] Jutta Pauli, Marc Baldus, Barth van Rossum, Huub de Groot, and Hartmut Oschkinat. Backbone and side-chain  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  signal assignments of the  $\alpha$ -spectrin sh3 domain by magic angle spinning solid-state nmr at 17.6 tesla. *ChemBioChem*, 2(4) :272–281, 2001.
- [95] Marzena Pazgier and Jacek Lubkowski. Expression and purification of recombinant human  $\alpha$ -defensins in escherichia coli. *Protein expression and purification*, 49(1) :1–8, 2006.
- [96] Y Pouliot, SF Gauthier, PE Groleau, et al. Membrane-based fractionation and purification strategies for bioactive peptides. *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*, pages 639–658, 2006.
- [97] Steven E Raper, Narendra Chirmule, Frank S Lee, Nelson A Wivel, Adam Bagg, Guang-ping Gao, James M Wilson, and Mark L Batshaw. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular genetics and metabolism*, 80(1-2) :148–158, 2003.
- [98] Jésus Raya, Alberto Bianco, Julien Furrer, Jean-Paul Briand, Martial Piotto, and Karim Elbayed. Proton dipolar recoupling in resin-bound peptides under high-resolution magic angle spinning. *Journal of Magnetic Resonance*, 157(1) :43–51, 2002.

- [99] Jesus Raya, Jérôme Hirschinger, Sonia Ovarlez, Françoise Giulieri, Anne-Marie Chaze, and François Delamare. Insertion of indigo molecules in the sepiolite structure as evidenced by  $1\text{h}-29\text{si}$  heteronuclear correlation spectroscopy. *Physical chemistry chemical physics*, 12(43) :14508–14514, 2010.
- [100] Burkhard Rost and Chris Sander. Bridging the protein sequence-structure gap by structure predictions. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 25(1) :113–136, 1996.
- [101] Stephen J Russell, Kah-Whye Peng, and John C Bell. Oncolytic virotherapy. *Nature biotechnology*, 30(7) :658–670, 2012.
- [102] David Fenard Saliha MAJDOUL. Compositions and methods for improving viral vector efficiency, June 2022. US Patent US011371061B2.
- [103] Hermann Schägger. Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1) :16–22, June 2006.
- [104] Anne Schuetz, Christian Wasmer, Birgit Habenstein, René Verel, Jason Greenwald, Roland Riek, Anja Böckmann, and Beat H Meier. Protocols for the sequential solid-state nmr spectroscopic assignment of a uniformly labeled 25 kda protein : Het-s (1-227). *ChemBioChem*, 11(11) :1543–1551, 2010.
- [105] Chih-Lung Shen and Regina M Murphy. Solvent effects on self-assembly of beta-amyloid peptide. *Biophysical journal*, 69(2) :640–651, 1995.
- [106] Astrid Strack, Andrea Deinzer, Christian Thirion, Silke Schrödel, Jan Dörrie, Tatjana Sauerer, Alexander Steinkasserer, and Ilka Knippertz. Breaking entry-and species barriers : lentiboost® plus polybrene enhances transduction efficacy of dendritic cells and monocytes by adenovirus 5. *Viruses*, 14(1) :92, 2022.
- [107] Kumao Toyoshima and Peter K Vogt. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology*, 38(3) :414–426, 1969.
- [108] Louic S. Vermeer, Loic Hamon, Alicia Schirer, Michel Schoup, Jérémie Cosette, Saliha Majdoul, David Pastré, Daniel Stockholm, Nathalie Holic, Petra Hellwig, Anne Galy, David Fenard, and Burkhard Bechinger. Vectofusin-1, a potent peptidic enhancer of viral gene transfer forms pH-dependent -helical nanofibrils, concentrating viral particles. *Acta Biomaterialia*, 64 :259–268, December 2017.

- [109] Verica Vidovic. *Production du peptide P-LAH<sub>4</sub> chez E. Coli et études par RMN de ses propriétés antibactérienne et de transfection d'ADN*. PhD thesis, 2011. Thèse de doctorat dirigée par Bechinger, Burkhard Chimie Strasbourg 2011.
- [110] Peter K Vogt. Deae-dextran : enhancement of cellular transformation induced by avian sarcoma viruses. *Virology*, 33(1) :175–177, 1967.
- [111] Titus CB Vogt and Burkhard Bechinger. The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers : the effects of charges and ph. *Journal of Biological Chemistry*, 274(41) :29115–29121, 1999.
- [112] Juan Wang, Kai Liu, Ruirui Xing, and Xuehai Yan. Peptide self-assembly : thermodynamics and kinetics. *Chemical Society Reviews*, 45(20) :5589–5604, 2016.
- [113] John S Waugh, Lee M Huber, and Ulrich Haeberlen. Approach to high-resolution nmr in solids. *Physical Review Letters*, 20(5) :180, 1968.
- [114] Quande Wei, Young Soo Kim, Jeong Hyun Seo, Woong Sik Jang, In Hee Lee, and Hyung Joon Cha. Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in escherichia coli. *Applied and environmental microbiology*, 71(9) :5038–5043, 2005.
- [115] David B Williams, C Barry Carter, David B Williams, and C Barry Carter. *The transmission electron microscope*. Springer, 1996.
- [116] Paul Wingfield. Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current protocols in protein science*, 13(1) :A–3F, 1998.
- [117] Justine Wolf. *Biophysical investigations of the LAH<sub>4</sub> family peptides : enhancer of gene delivery, from peptide-peptide interactions to peptide-membrane interactions*. PhD thesis, 2018. 2018STRAF037.
- [118] K Wüthrich. *Nmr of proteins and nucleic acids*, 1986.
- [119] Maral Yolamanova, Christoph Meier, Alexey K Shaytan, Virag Vas, Carlos W Bertocini, Franziska Arnold, Onofrio Zirafi, Shariq M Usmani, Janis A Müller, Daniel Sauter, et al. Peptide nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses. *Nature nanotechnology*, 8(2) :130–136, 2013.
- [120] Yang Zhang and Jeffrey Skolnick. Automated structure prediction of weakly homologous proteins on a genomic scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20) :7594–7599, 2004.

- [121] Matjaž Zorko and Ülo Langel. Cell-penetrating peptides : mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 57(4) :529–545, 2005.
- [122] Jian Min Zuo and John CH Spence. *Advanced transmission electron microscopy*. Springer, 2017.

## Étude structurale et fonctionnelle des assemblages supramoléculaires du peptide Vectofusin-1

### Résumé

Les peptides de la famille LAH4 sont des peptides cationiques qui se replient en hélices alpha et interagissent avec les membranes phospholipidiques. Ces peptides peuvent s'assembler en nano-fibrilles. Dans cette thèse, nous avons étudié le dérivé LAH4-A4 breveté sous le nom Vectofusin-1. Une étude fonctionnelle a révélé que ses propriétés d'auto-assemblage influencent son activité biologique en tant qu'adjuvant améliorant la transduction lentivirale. Lors d'une collaboration avec le laboratoire ART-TG, nous avons montré que les formes fibrillaires et monomériques de Vectofusin-1 diffèrent en activité biologique, notamment selon le type cellulaire. Un protocole de production et purification du peptide Vectofusin-1 basé sur l'expression en système bactérien avec marquage isotopique a été mis en place. Une étude biophysique, par microscopie électronique, a démontré que la formation de fibrilles dépend de paramètres précis comme le pH, le solvant et la température. Une étude structurale par RMN du solide a permis de caractériser en partie les interactions impliquées dans la formation et la stabilisation des fibrilles.

**Mots clés :** peptides antimicrobiens ; transduction lentivirale ; assemblages supramoléculaires ; nanofibrilles ; expression bactérienne ; marquage isotopique ; RMN du solide ; interaction peptide-peptide.

### Summary

LAH4 peptides are cationic peptides that fold into alpha-helices and interact with phospholipid membranes. These peptides can assemble into nanofibrils.

In this thesis, we studied the LAH4-A4 derivative patented under the name Vectofusin-1. A functional study revealed that its self-assembly properties influence its biological activity as an adjuvant enhancing lentiviral transduction. In collaboration with the ART-TG laboratory, we demonstrated that the fibrillar and monomeric forms of Vectofusin-1 differ in biological activity, particularly depending on the cell type. A protocol for producing and purifying Vectofusin-1 peptide based on isotopically labeled bacterial expression was established.

A biophysical study using electron microscopy showed that fibril formation depends on specific parameters such as pH, solvent, and temperature. A structural study using solid-state NMR partially characterized the interactions involved in the formation and stabilization of fibrils.

**Key words :** antimicrobial peptides ; lentiviral transduction ; supramolecular assemblies ; nanofibrils ; bacterial expression ; isotope labelling ; solid state NMR ; peptide-peptide interaction.