

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION BIOPHYSIQUE ET RÔLES BIOLOGIQUES DES
INTERACTIONS HORMONE PEPTIDIQUE - GLYCOSAMINOGLYCANE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR

ARMELLE TCHOUMI NERÉE

MARS 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Professeur Steve Bourgault pour la délicate attention qu'il a eu à mon égard en m'acceptant au sein de son équipe de recherche pour un stage et une maîtrise par la suite. Je le remercie particulièrement pour la confiance dont il m'a accordée tout au long de cette maîtrise et pour le soutien financier.

Je remercie tous les membres de l'équipe de recherche, à savoir Carole Anne De Carufel, Trang Phuong Nguyen et Mathieu Wolwertz Laporte pour leur aide dans mes travaux.

Je tiens également à remercier le Professeur Borhane Annabi, pour l'accès à son laboratoire et l'utilisation du cytomètre en flux ainsi que le Professeur Marc Lussier pour sa disponibilité et l'amplification des différents plasmides codant pour les récepteurs PAC I, VPAC I et VPAC II. J'aimerais profiter pour dire merci au Dr Duc N. Doan, le Professeur David Chatenet pour leurs conseils et le Pr Alain Fournier pour les aliquotes de PACAP38 biotynilé et les anticorps anti-PAC I.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES, ACRONYMES ET UNITÉS	ix
RÉSUMÉ	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	1
1.1.1 Structure et classification	1
1.1.2 Ligands et mécanismes d'activation	4
1.2 Ligands peptidiques des RCPGs de la classe 2	6
1.2.1 Sécrétine.....	7
1.2.2 Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide (PACAP).....	9
1.2.3 Modèle de la catalyse membranaire.....	11
1.3 Glycosaminoglycanes.....	14
1.3.1 Structure et classification.....	15
1.3.2 Fonctions biologiques	17
1.3.3 Interaction GAG – protéine.....	20
1.4 Peptides à pénétration cellulaire (PPC)	21
1.4.1 Classification.....	21
1.4.2 Mécanisme de pénétration cellulaire.....	23
1.4.3 Rôle des GAGs dans l'internalisation des PPCs cationiques.....	26
1.4.4 Le PACAP : un nouveau PPC.....	27
CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE	29
2.1 Problématique.....	29

2.2	Hypothèse de travail	30
2.3	Objectifs de recherche	30
CHAPITRE III		
SECONDARY CONFORMATIONAL CONVERSION IS INVOLVED IN GLYCOSAMINOGLYCANS-MEDIATED CELLULAR UPTAKE OF CATIONIC CELL-PENETRATING PEPTIDE PACAP		
		32
	RÉSUMÉ	33
AVANT-PROPOS		
	CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	34
3.1	Abstract.....	36
3.2	Introduction	37
3.3	Materials and methods.....	39
	3.3.1 Peptide synthesis, purification and characterization	39
	3.3.2 Peptide uptake	39
	3.3.3 Membrane binding	40
	3.3.4 Characterization of PACAP - sulfated – GAGs - interaction	40
3.4	Results	40
	3.4.1 Cell surface glycosaminoglycans promote cellular uptake and membrane binding of PACAP	40
	3.4.2 Conformational conversion of PACAP upon binding to heparin	43
	3.4.3 Role of conformational conversion in PACAP cellular uptake	44
	REFERENCES	52
SUPPLEMENTARY MATERIALS		
	REFERENCES	63
CHAPITRE IV		
GLYCOSAMINOGLYCAN MEDIATE PLASMA MEMBRANE ADSORPTION OF PEPTIDES OF THE SECRETIN/GLUCAGON/GHRH SUPERFAMILY		
		64
	RESUME	65
AVANT PROPOS		
	CONTRIBUTION DES AUTEURS.....	66
4.1	Abstract.....	68
4.2	Introduction	69
4.3	Materials and methods.....	72

4.3.1 Peptide synthesis	72
4.3.2 Cell culture	72
4.3.3 Peptide membrane adsorption.....	73
4.3.4 Confocal microscopy	73
4.3.5 Affinity chromatography.....	74
4.3.6 Circular dichroisme spectroscopy	74
4.3.7 Isothermal titration calorimetry	74
4.4 Results and discussion.....	75
4.4.1 Cell surface glycosaminoglycans promote cellular adsorption of cationic peptides of the secretin/glucagon/GHRH superfamily	75
4.4.2 Affinity for sulfate glycosaminoglycans	79
4.4.3 Thermodynamics of peptide – sulfated GAGs binding	81
4.4.4 Conformational conversion of PACAP38 upon binding to heparin	84
4.4.5 Role of secretin secondary structure for GAGs-mediated cell surface adsorption.....	85
4.5 Conclusion.....	89
REFERENCES	90
CHAPITRE V	
ANALYSE.....	93
5.1 Synthèse, purification et caractérisation des peptides de la superfamille secretin/glucagon/GHRH	93
5.2 Rôle des GAGs dans l’internalisation du PACAP	95
5.3 Rôle de la transition conformationnelle du PACAP.....	95
5.4 Rôle des GAGs dans l’attachement cellulaire des hormones peptidiques.....	98
5.5 Importance de la fonction « <i>heparin binding domain</i> »	101
5.6 Catalyse membranaire revisitée.....	103
CHAPITRE VI	
CONCLUSION.....	106
APPENDICE	
EXEMPLE DE CALCUL DE RENDEMENT ET DE PURETÉ DES PEPTIDES : CAS DE LA SÉCRÉTINE.....	108
RÉFÉRENCES	111

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G 2
1.2	Représentation schématique de la structure cristalline de la rhodopsine bovine. 3
1.3	Schéma représentatif et simplifié de l'activation de la protéine G..... 5
1.4	Représentation en ruban de la structure 3D de la sécrétine. 8
1.5	Représentation en ruban de la structure du PACAP38 humain..... 10
1.6	Illustration de l'hypothèse de la catalyse membranaire..... 12
1.7	Modèle de la mosaïque fluide..... 14
1.8	Biosynthèse des GAGs. 17
1.9	Rôle de co-récepteur des GAGs. 18
1.10	Rôle de l'héparane sulphate 19
1.11	Différentes voies d'internalisation des PPCs..... 25
1.12	Mécanisme d'internalisation des PPCs..... 27
2.1	Représentation schématique de nos hypothèses de travail 31
3.1	Sequence and structure of PACAP..... 38
3.2	Role of cell surface glycosaminoglycans in PACAP cellular uptake..... 42
3.3	Role of Cell surface glycosaminoglycans in PACAP binding to the cell surface..... 43
3.4	conformational conversion of PACAP upon binding to heparin..... 44
3.5	Inhibition of heparin-induced conformational transition of PACAP with double-D susbtitutions 45

3.6	Role of PACAP conformational conversion in GAGs-mediated cellular uptake.....	47
3.7	Light scattering showing heparin clustering by PACAP and its D,D-derivatives.....	48
4.1	Cell surface GAGs mediate plasma membrane adsorption.	78
4.2	Soluble heparin inhibits membrane adsorption of secretin.....	79
4.3	Heparin affinity chromatography of cationic peptide hormones.....	81
4.4	Titration of heparin into secretin	83
4.5	Binding to heparin induces the formation of α -helix	85
4.6	Destabilization of secretin α -helix inhibits binding to sulfated GAGs.	87
4.7	Role of secretin secondary helical structure in membrane adsorption.	88
5.1	Affinité relative de la sécrétine pour l'héparine comparée à celle des chémokines	103
A.1	Spectre de masse ESI – MS TOF de la sécrétine.....	110
A.2	Chromatogramme de la sécrétine	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Classification des récepteurs couplés aux protéines G.....	3
1.2	Séquence primaire des hormones peptidiques appartenant à la superfamille glucagon/sécrétine/GHRH chez l'humain	7
1.3	Évolution phylogénique de la sécrétine.....	8
1.4	Exemples de fonctions biologiques de la sécrétine	9
1.5	Évolution phylogénique du PACAP	10
1.6	Fonctions physiologiques du PACAP	11
1.7	Récapitulatif des différentes classes de glycosaminoglycanes	16
1.8	Classification des PPCs selon leur origine et leurs propriétés physico-chimiques.....	23
4.1	Sequence of peptide hormone used in this study.....	77
4.2	Thermodynamic parameters for heparin binding to peptide hormones.....	83
5.1	Rendement des peptides d'intérêt	94

LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES, ACRONYMES ET UNITÉS

Acides aminés

Alanine	Ala	A
Cystéine	Cys	C
Asparagine	Asp	D
Glutamate	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M
Asparagine	Asp	N
Proline	Pro	R
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tyrosine	Tyr	Y
Tryptophane	Trp	W

Lignées cellulaires

CHO	Chinese Hamster Ovary cell
HEK	Human Embryonic Kidney
HeLa	Human Cervical Carcinoma Cell Line

Hormones peptidiques

GHRH	Growth-hormone-releasing hormone
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
VIP	Vasoactive intestinal peptide

Méthodes d'analyse

CD	Dichroïsme circulaire
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
FACS	Tri des cellules activées par fluorescence
FPLC	Chromatographie en phase liquide des protéines
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
ITC	Titration isotherme calorimétrie
MS	Spectromètre de masse
SPR	Résonance plasmonique de surface
WinMDI	Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry

Produits chimiques et solvants

ACN	Acétonitrile
-----	--------------

DCM	Dichlorométhane
DIEA	N,N-diisoéthylamine
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylsulfoxyde
FBS	Foetal bovin serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fmoc	9-Fluorénylméthoxy-carbonyl
HCTU	<i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uroniumhexafluorophosphate
MeOH	Méthanol
NaCl	Chlorure of sodium
NaF	Fluorure de sodium
NH ₄ ⁺	Ion ammonium
PBS	Phosphate buffer saline
Pip	Pipéridine
TFA	Acide trifluoroacétique

Acronymes

AH	Acide hyaluronique
CD4	Cluster de différenciation 4
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CS	Chondroïtine sulfate
DNA	Acide désoxyribose nucléique
DS	Dermatan sulfate
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
ECL	Boucle extracellulaire
FSH	Hormone folliculaire
GABA	L'acide γ -aminobutyrique
GAGs	Glycosaminoglycanes sulfatés
GTP	Guanidine tri-phosphate

HS	Heparane sulfate
hLF	Lactoferrine humaine
ICL	Boucle intracellulaire
KS	Kératane sulfate
LH	Hormone lutéine
M β CD	Methyl- β -cyclodextrine
PTD	Protein transduction domain
pVEC	Vascularendothelial-cadherinprotein
RCPG	Récepteur couplé à la protéine G
SCTR	Récepteur de la sécrétine
Tat	Trans-acting activator of transcription
TM	Transmembranaire
UDP	Uridine di-phosphate
VIH-1	Human immunodeficiency virus type 1

Unités

°C	Degré Celsius
g	Gramme
h	Heure
M	Molaire
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
μ L	Microlitre
mmol	Millimole
s	Seconde
KDa	KiloDalton

RÉSUMÉ

Les peptides de la superfamille sécrétine/GHRH/glucagon sont principalement des (neuro)hormones affichant des fonctions physiologiques importantes et multiples. Ces hormones représentent majoritairement les ligands endogènes des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) de classe B. Le modèle général d'activation des RCPGs par des ligands peptidiques stipule que la conformation bioactive du peptide est induite suite à la fixation du peptide à la membrane plasmique. De nombreuses études ont caractérisé d'un point de vue structural et biophysique les interactions entre les peptides de la famille sécrétine/GHRH/glucagon et les membranes lipidiques modèles. Toutefois, la membrane plasmique constitue un environnement excessivement complexe et la surface des cellules eucaryotes est tapissée de larges polysaccharides polysulfatés, nommés glycosaminoglycane (GAG). Considérant le caractère cationique de ces peptides, les GAGs pourraient jouer un rôle dans l'adsorption initiale des peptides à la surface membranaire, modulant ainsi leur(s) fonction(s) biologique(s). Au cours de ce projet, notre principal objectif consistait premièrement à caractériser et à déterminer le rôle biologique des interactions hormone peptidique – GAG. Des études spectroscopiques ont révélé que le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide), un peptide cationique appartenant à la famille sécrétine/GHRH/glucagon possédait une forte affinité pour les GAGs. Cette interaction concourait à une conversion du PACAP en sa conformation bioactive. Des analyses de cytométrie en flux ont permis d'établir un lien entre la conversion structurale du PACAP et son internalisation par des cellules ovariennes d'Hamster chinois (CHO). L'étude des interactions entre des peptides cationiques appartenant à la même famille que le PACAP, présentant des motifs antigéniques ou «*heparin binding domain*» dans leur séquence ou structure bioactive a révélé que ces peptides possèdent une forte affinité pour les GAGs; comparable à celle observée en présence de cytokines. Des analyses de spectroscopies et de cytométrie en flux ont montré que la disposition spatiale des résidus basiques qui constituent ces motifs antigéniques était impliquée dans le changement de conformation et l'adsorption membranaire des peptides. En d'autres termes, nos travaux ont permis de mettre à jour dans un premier temps les propriétés de pénétration cellulaire du PACAP et ensuite l'importance de la disposition spatiale des résidus basiques dans l'adsorption membranaire médiée par les GAGs.

Mots clés: Hormones peptidiques, Superfamille sécrétine/glucagon/GHRH, interaction, glycosaminoglycane, catalyse membranaire.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les RCPGs représentent l'une des plus importantes superfamilles de protéines du génome des mammifères (Lander et al., 2001). Ce sont des protéines pourvues de 7 hélices transmembranaires affichant une masse moléculaire comprise entre 40 et 85 kDa (Katritch et al., 2013). Ils jouent un rôle important dans la reconnaissance des molécules messagères extracellulaires et dans la communication intercellulaire (Bjarnadottir et al., 2005). Ces différents rôles leur confèrent la fonction de médiateur de nombreux processus physiologiques; tels que la sécrétion hormonale, la contraction musculaire, le métabolisme cellulaire, la division cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Gobeil et al., 2006). À cet effet, approximativement 50 % des médicaments nouvellement conçus et utilisés en clinique régulent les fonctions des RCPGs (Jacoby et al., 2006).

1.1.1 Structure et classification

Les RCPGs également connus sous le nom de récepteurs à sept domaines transmembranaires ou de récepteurs serpentins sont constitués de sept segments

hélicoïdaux transmembranaires (TM1 à TM7), de 3 boucles extracellulaires (ECL) et 3 boucles intracellulaires (ICL) (**Figure 1.1**).

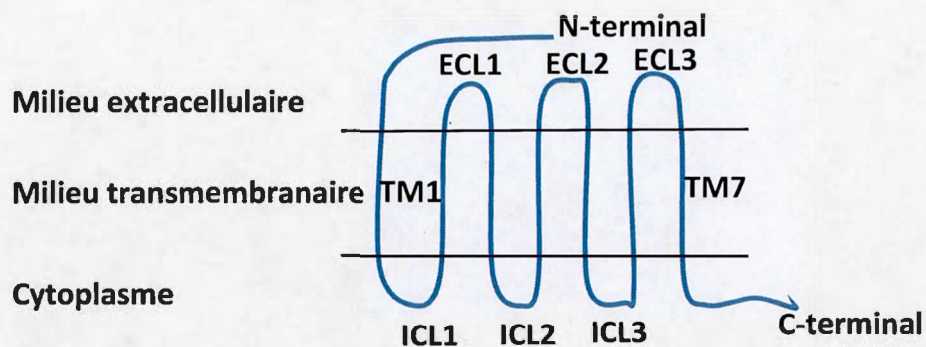
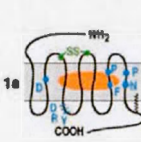
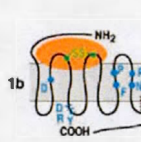
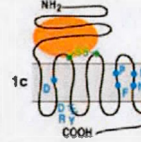
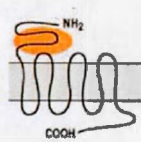
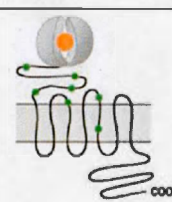


Figure 1.1 Représentation schématique d'un récepteur couplé aux protéines G. On dénombre sept domaines transmembranaires (TM1 à TM7), un domaine N-terminal extracellulaire, un domaine C-terminal intracellulaire, 3 boucles extracellulaires (ECL1 à 3) et 3 boucles intracellulaires (ICL1 à 3) (Palczewski et al., 2000).

Chaque domaine transmembranaire est séparé du côté N-terminal et C-terminal par une ECL et une ICL respectivement. En fonction de la séquence primaire, des caractéristiques biochimiques et structurales, de la nature de leurs ligands endogènes ou de la taille de leur domaine N-terminal, les RCPGs sont regroupés en plusieurs classes, familles et sous-classes. À titre d'exemple, selon l'union internationale de pharmacologie, les RCPGs chez l'humain sont classés en trois principales familles à savoir la famille Rhodopsine (classe 1) qui est la plus représentée, la famille Sécrétine (classe 2) et la famille Glutamate (classe 3) (Foord et al., 2005). Bockaert et Pin (Bockaert and Pin, 1999) ont montré dans leurs travaux que ces 3 classes de RCPGs possèdent des similitudes entre elles et qu'elles se distinguent au niveau de la taille de leur domaine N-terminal et de la nature des ligands. Selon le site de fixation du ligand (indiqué en couleur orange dans le **tableau 1.1**), les RCPGs de la classe 1 sont subdivisés en trois sous-groupes, 1a, 1b et 1c. Les RCPGs de la classe 1 se distinguent de ceux des classes 2 et 3 par leur domaine N-terminal court. Le domaine

N-terminal des RCPGs de la classe 2 est court comparé à celui de la classe 3. Les RCPGs de la classe 3 possèdent un large domaine extracellulaire divisé en 2 lobes. (Tableau 1.1). Comme exemple de RCPG, nous avons la rhodopsine bovine. Elle fût le premier RCPG dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X (Figure 1.2) par Krzysztof Palczewski et ses collaborateurs (Palczewski et al., 2000).

Tableau 1.1 Classification des récepteurs couplés aux protéines G (Bockaert et Pin, 1999)

	Classe 1		Classe 2		Classe 3
Famille	Famille <i>Rhodopsine</i>		Famille <i>Sécrétine</i>		Famille <i>Glutamate</i>
Récepteur					
Ligand	Endothéline	UrotensineII	Sécrétine		Glutamate
	LH/FSH	Sérotonine	Calcitonine		Phéromones
	Dopamine	Somatostatine	PACAP		Ca ⁺⁺

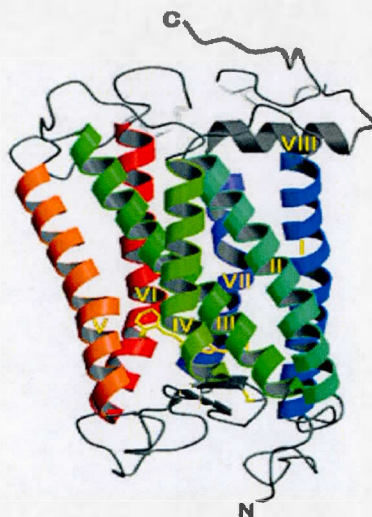


Figure 1.2 Représentation schématique de la structure cristalline de la rhodopsine bovine déterminée par diffraction des rayons X (PDBid 1F88). Les

domaines (I à VII) sous forme d'hélice représentent les segments transmembranaires (Palczewski et al., 2000).

1.1.2 Ligands et mécanismes d'activation

Les RCPGs sont activés par une large gamme de ligands affichant des propriétés physico-chimiques et structurales hautement divergentes. Parmi ces ligands, on rencontre des amines biogéniques, des peptides, des glycoprotéines, des lipides, des nucléotides, des ions, des protéases, des photons, des molécules odorantes et des phéromones (Tautermann et al., 2015). En fonction de la réponse générée et de l'activation ou de l'inactivation du récepteur, on distingue plusieurs classes de ligands: les agonistes, les agonistes inverses, les antagonistes et les modulateurs allostériques. Les agonistes représentent la majorité des ligands naturels et ils jouent le rôle d'activateur de récepteurs. À l'opposé, les agonistes inverses ont pour rôle d'empêcher l'activation de récepteur, en stabilisant sa conformation inactive (Chidiac et al., 1994). Les antagonistes compétitifs ont la particularité d'empêcher la fixation de l'agoniste et/ou de l'agoniste inverse. Les modulateurs allostériques quant à eux se fixent sur un autre site de liaison que l'agoniste, modifiant ainsi la structure et la pochette de liaison du récepteur et modulant de ce fait la liaison du ligand à son récepteur (Conn et al., 2009).

Les sites de fixation des ligands naturels sont répartis majoritairement au niveau de la région extracellulaire du récepteur. Selon le modèle de Bockaert, la pochette de liaison des ligands des RCPGs de la classe 1a se retrouve au niveau des TMs (Bockaert and Pin, 1999). Quant aux récepteurs de la classe 1b, la pochette de fixation pour le ligand se retrouve au chevauchement du domaine N-terminal et des ECLs (Allen et al., 2007). D'autre part, les RCPGs de la classe 1c affichent une pochette de liaison pour le ligand au niveau du domaine N-terminal et des ECLs. Ils n'impliquent nullement la cavité inter-transmembranaire comme c'est le cas chez les RCPGs de la classe 1b (Caltabiano et al., 2008). La pochette de liaison pour les

ligands des RCPGs de la classe 2 se trouve au niveau du domaine N-terminal et des ECLs (Tam et al., 2014) et chez la classe 3, on la rencontre uniquement au niveau du large domaine N-terminal (Kunishima et al., 2000).

L'activation des RCPGs par un agoniste conduit au recrutement et à la régulation de l'activité des protéines G (Gether, 2000). Dans ses travaux, Hamm (Hamm, 1998) a démontré que les protéines G hétérotrimériques intracellulaires, sont constituées de 3 principales sous-unités, à savoir les sous-unités $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. De façon séquentielle, l'activation du récepteur, ou la stabilisation de sa conformation active, induite par la fixation du ligand entraîne le couplage du récepteur aux protéines G intracellulaires. Le complexe formé (récepteur-ligand) déclenche le rejet de la guanidine diphosphate (GDP) au profit de la guanidine triphosphate (GTP). Le dimère $G_{\beta\gamma}$ va se détacher de la sous-unité $G\alpha$. On observera donc la présence de 2 complexes distincts à savoir la molécule GTP liée à la sous-unité α d'une part et le dimère stable $\beta\gamma$ d'autre part (Figure 1.3).

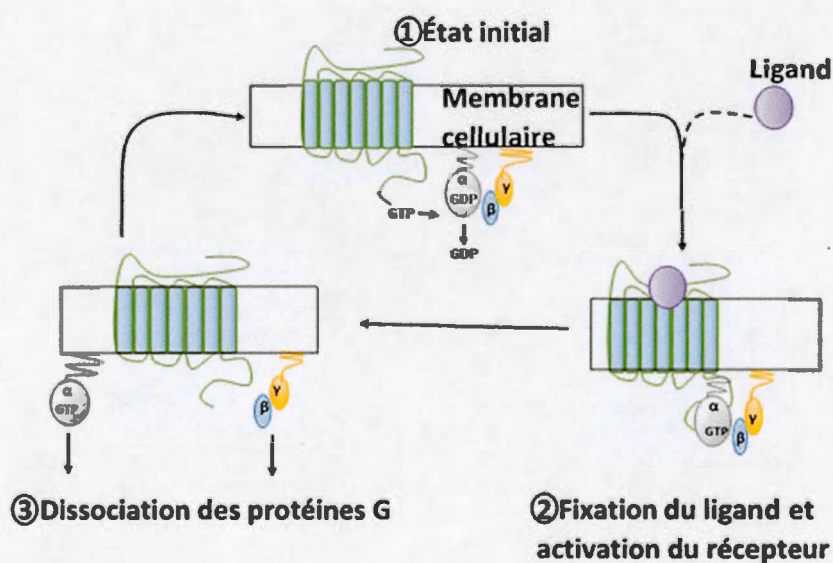


Figure 1.3 Schéma représentatif et simplifié de l'activation de la protéine G. (1) Le récepteur à l'état initial fixe le ligand. (2) Le récepteur une fois activé s'associe

à la protéine G trimérique et l'active par substitution du GDP par le GTP. (3) Le dimère $G\beta\text{-}G\gamma$ va se dissocier du complexe $G\alpha\text{-}GTP$ et l'hydrolyse du GTP en GDP va conduire à la reconstitution de la protéine G stable (Williams et Hill, 2009).

Ces deux complexes vont initier plusieurs cascades de signalisation au sein de la cellule, incluant la stimulation ou l'inhibition de l'adénylate cyclase, l'activation de la phospholipase et la régulation de l'activité des canaux calciques et potassiques. La déphosphorylation du GTP en GDP met fin au signal d'activation de la protéine G. Et le complexe $G_{\alpha\beta\gamma}$ en se reconstituant stabilisera la liaison du GDP (Hamm, 1998).

1.2 Ligands peptidiques des RCPGs de la classe 2

L'activation des récepteurs appartenant à la famille sécrétine (classe 2) des RCPGs est régulée par la liaison de diverses hormones peptidiques. Les ligands des RCPGs de la classe B (**Tableau 1.1**) sont regroupés en deux familles; la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH (*Growth Hormone-Releasing Hormone*) et la famille de la calcitonine (Foord, 2002). Les peptides de la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH sont des peptides linéaires constitués de plus de 27 résidus d'acides aminés (Miller et al., 2012). Leur séquence primaire est constituée de nombreux résidus basiques et présente une homologie de séquence plus ou moins élevée les uns par rapport aux autres. C'est le cas du VIP qui présente 68 % d'homologie comparé au PACAP27 (**Tableau 1.2**). Ces peptides se distinguent par leur capacité à adopter une structure secondaire en hélice α en présence de micelles lipidiques ou dans des solvants organiques (**Figure 1.4** et **Figure 1.5**), qui miment l'environnement adjacent à la membrane plasmique (Miller et al., 2012). Les membres de la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH peuvent agir en tant que neurotransmetteurs, neurohormones et/ou hormones. Ces ligands jouent principalement le rôle d'hormones et exercent de nombreuses fonctions biologiques importantes. En outre le VIP (*Vasoactive intestinal peptide*) régule l'appétit et la satiété, il procure la sensation de bien-être et régule les hormones métaboliques (Vu et al., 2015).

Tableau 1.2 Séquence primaire des hormones peptidiques appartenant à la superfamille glucagon/sécrétine/GHRH chez l'humain

Peptides	Structures primaires
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN
PACAP27	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL
PACAP38	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVLGKRYKQRVKNK
Sécrétine	HSDGTFTSELSRLREGARLQLLQGLV
GRF	YADAIFTNSYSKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL
Hélocortine	HSDAIFTEEYSKLLAKLALQKYLASILGSRTSPPP
Glucagon	HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT
GLP-2	HADGSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD
GIP	YAEFTFISDYSIAMDKIHQQDFNWLLAQKGKKNWVKNITQ

Les résidus de couleur rouge diffèrent de ceux rencontrés chez le VIP. Les séquences primaires du VIP et du PACAP27 présentent 68 % d'homologie.

1.2.1 Sécrétine

Découverte en 1902 par les chercheurs Bayliss et Starling chez le chien, la sécrétine fût le premier peptide identifié comme étant une hormone. Elle est principalement exprimée par les cellules S du duodénum. Elle fût purifiée et séquencée pour la première fois en 1961 et 1966, respectivement par les biochimistes suédois Érick Jorpes et Viktor Mutt chez le porc (Chey and Chang, 2003). Ce peptide est constitué de 28 acides aminés et d'une extrémité C-terminale amidée (**Figure 1.4**). Chez les espèces animales vertébrées, la structure primaire de la sécrétine est hautement conservée (**Tableau 1.3**). Comparée à celle chez l'homme, la séquence primaire de la sécrétine se différencie de celle du chien d'un seul résidu; de celles du porc, du bœuf et de la chèvre de deux résidus; de celles de la souris, du rat et des cobayes de trois résidus; de celle du lapin de quatre résidus et de celle de la poule de 13 résidus (**Tableau 1.3**) (Chey and Chang, 2014). Les gènes codants pour le précurseur de la sécrétine et de son récepteur (SCTR) sont exprimés dans de nombreux tissus et organes, incluant les testicules, le cœur, les reins, le foie et le cerveau sans oublier le

tractus gastro-intestinal (Afroze et al., 2013). La sécrétine est également impliquée dans la régulation physiologique de nombreux organes (**Tableau 1.4**).



Figure 1.4 Représentation en ruban de la structure 3D de la sécrétine observée en présence de micelles de DOPC (structure obtenue grâce au logiciel I-Tasser, d’Afroze et al., 2013).

Tableau 1.3 Évolution phylogénique de la sécrétine

Espèces	Séquences primaires	Homologie (%)
Humain	HSDGTFTSELSRLREGARLQRLLOGLV	100 %
Souris	HSDGMFTSELSRLRDSARLQRLLOGLV	89.3 %
Porc, bœuf et chèvre	HSDGTFTSELSRLRDSARLQRLLOGLV	92.9 %
Chien	HSDGTFTSELSRLRESARLQRLLOGLV	96.4 %
Rat	HSDGTFTSELSQLRDSARLQRLLOGLV	89.3 %
Lapin	HSDGTLTSELSRLRDLARLQRLLOGLL	85.7 %
Cobaye	HSDGTFTSEKSRRLRDSARLQRLLOGLV	89.3 %
Poule	HSDGLFTSEYSKMRGNAQVQKFLQNLML	57.1 %

Comparaison des séquences de la sécrétine chez les vertébrés. La séquence des autres espèces animales varie de 1-3 voire 13 résidus d'acide aminé par rapport à celle de l'humain. Les résidus soulignés diffèrent de ceux rencontrés chez l'humain (Chey et Chang, 2014).

Tableau 1.4 Exemples de fonctions biologiques de la sécrétine

Organes impliqués	Rôles	Référence
Cervelet	<ul style="list-style-type: none"> • Intervient dans la coordination et l'apprentissage des mouvements moteurs. 	Zhang et al., 2014
Cœur	<ul style="list-style-type: none"> • Augmente la pression artérielle. 	Zhang et al., 2014
Tractus gastro-intestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Maintient la balance homéostatique; • Inhibe la sécrétion d'acide gastrique; • Stimule la sécrétion de suc pancréatique riche en bicarbonate; • Régule l'adsorption de l'eau au niveau des reins. 	Sitniewska et Wisniewska, 1999

1.2.2 Pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide (PACAP)

Le PACAP est une (neuro)hormone constituée de 38 acides aminés impliquée dans la fonction physiologique de nombreux organes (**Tableau 1.6**). Elle a été isolée pour la première fois à partir d'hypothalamus ovins par Miyata en 1989 (Miyata et al., 1989). La structure primaire du PACAP a été presque totalement conservée chez les vertébrés durant l'évolution (**Tableau 1.5**). Ce peptide est exprimé chez les mammifères (l'homme, la chèvre, le rat et la souris) et chez les non mammifères (la poule, la grenouille, le saumon et le poisson-chat). En outre, la structure primaire de la région 1-27 du PACAP, qui est responsable de l'activité biologique du peptide, est hautement conservée chez le lézard et la grenouille (**Tableau 1.5**). La conservation de la séquence du PACAP à travers plusieurs espèces met en valeur le rôle important dont il jouerait dans la régulation des fonctions biologiques, essentiels pour la survie des espèces (Vaudry et al., 2009). Le PACAP adopte une structure d'hélice- α en présence de micelles ou de solvants organiques (**Figure 1.5**) et ses récepteurs sont exprimés au niveau du SNC et dans plusieurs tissus dont le pancréas, les gonades, le

système respiratoire, les glandes surrénales et le tractus gastro-intestinal (Vaudry et al., 2009).

Tableau 1.5 Évolution phylogénique du PACAP

Espèce	Séquences primaire	Homologie
Humain,[#]	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK	100 %
Poule	HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK	97 %
Lézard	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL	100*
Grenouille	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRIKNK	92 %
Saumon	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYRQRYRNK	89 %
Poisson-chat	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GRRYRQRFNKNK	89 %
Stargazer	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GRRYRQVRNKNK	89 %
Raie	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKPKVRNS GRRV FY	89 %
Tuniciers 1	HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYLA AVL	96 %*
Tuniciers 2	HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYL IALL	85 %*

* comparé au PACAP 27 chez l'humain; [#] Chèvre, souris rat et cobaye.

Comparaison de la séquence primaire du PACAP chez différentes espèces vertébrées, des procordés aux mammifères. Le pourcentage indique le nombre de résidus d'acide aminé du PACAP identiques entre les différentes espèces et l'humain pour le PACAP38 ou pour le PACAP27 (Vaudry et al., 2009).

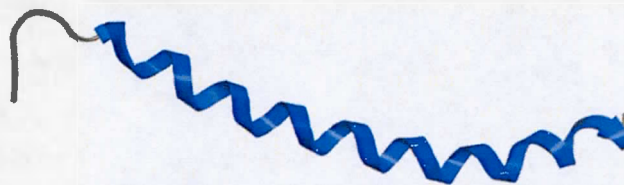


Figure 1.5 Représentation en ruban de la structure du PACAP38 humain en présence de micelles de DOPC (PDBid 2D2P).

Tableau 1.6 Fonctions physiologiques du PACAP (Vaudry et al., 2009)

Organe impliqué	Rôles
Axe hypothalamo-hypophysaire	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule le relâchement de l'oxytocine et de la vasopressine; • Active la synthèse de l'adénylyl cyclase; • Stimule l'activité des neurones hypothalamiques; • Joue le rôle de neurotransmetteur ou neuromodulateur dans la régulation de la sécrétion des neurohormones hypophysiotropique et neurohypophysaire; • Module la sécrétion de la mélatonine.
Gonades	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la sécrétion de la testostérone; • Active et inhibe la synthèse des protéines dans les spermatozoïdes et les spermatides, respectivement; • Stimule la sécrétion d'œstradiol et d'inhibine; • Stimule la sécrétion de chlorite important pour le stockage et l'activation du sperme.
Tractus gastro-intestinal	<ul style="list-style-type: none"> • Stimule la sécrétion salivaire des glandes submandibulaires; • Stimule la sécrétion de l'acide gastrique; • Stimule la sécrétion du bicarbonate dans le duodénum; • Module la relaxation des muscles gastriques.

1.2.3 Modèle de la catalyse membranaire

La caractérisation de la structure d'un ligand peptidique lorsque celui-ci est complexé à son récepteur est excessivement complexe, voire impossible avant les dernières percées scientifiques en biologie structurale. Pour pallier à cette difficulté, Sargent et Schwyzer ont caractérisé des ligands peptidiques dans des milieux qui miment l'environnement cellulaire tels que les micelles de dodécylphosphocholine (DOPC) (Sargent and Schwyzer, 1986). Ils ont proposé cette approche en se basant sur le fait qu'en plus de se fixer à leur récepteur membranaire spécifique, les ligands peptidiques interagissent à priori avec la bicouche lipidique environnante. De ce fait,

il y aurait une catalyse membranaire qui s'opérerait à ce niveau. L'hypothèse de la catalyse membranaire stipule qu'un ligand peptidique activerait son RCPG spécifique après avoir initialement interagi avec l'environnement extra membranaire de la cellule. Ce qui facilite l'adoption de la structure bioactive par le ligand peptidique, favorisant sa liaison au récepteur (**Figure 1.6**) et l'activation de ce dernier (Langelaan and Rainey, 2010).

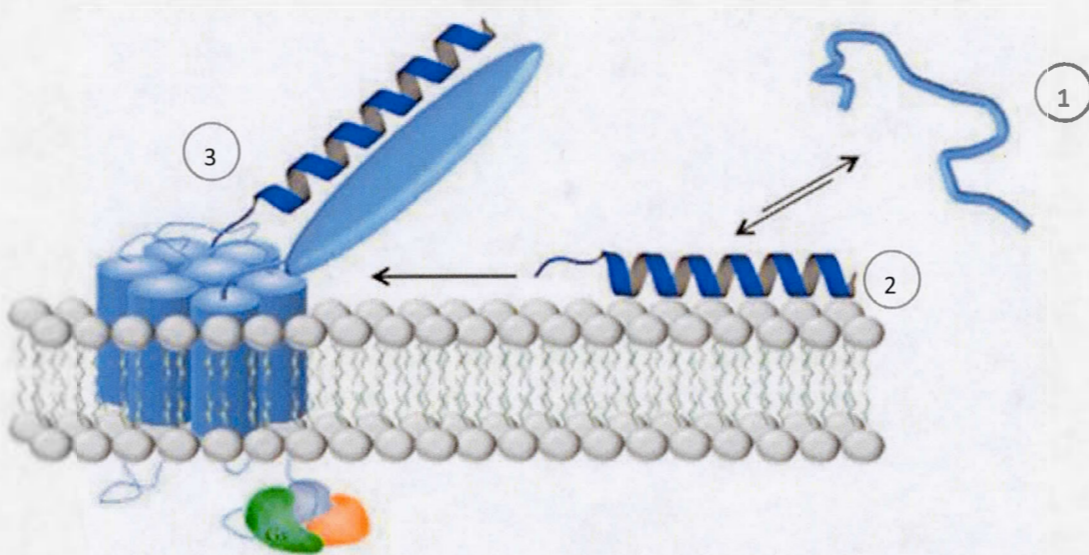


Figure 1.6 Illustration de l'hypothèse de la catalyse membranaire. (1) Le ligand initialement de conformation désordonnée, (2) adopte une structure secondaire en hélice alpha lorsqu'il entre en contact avec la bicouche lipidique. (3) Cette interaction ligand-membrane plasmique induisant la conversion de conformation du ligand serait propice à la reconnaissance du ligand par le récepteur et à l'activation de ce dernier.

La catalyse membranaire n'est pas un mécanisme général pour tous les modèles d'interaction peptide-récepteur; mais elle permet de mieux comprendre comment des hormones peptidiques telles que les ligands des RCPGs de classe B, à l'exemple du PACAP, changent de conformation suite au contact avec la membrane cellulaire et active par la suite ses récepteurs spécifiques. Dans ses travaux, Inooka et collaborateurs (Inooka et al., 2001) ont montré que le PACAP présente généralement

une conformation désordonnée en solution. Mais en présence de membranes modèles ou de solvants organiques, il adopte une conformation d'hélice α . Dans le même ordre d'idée, Sargent et Schwyzer affirment que la membrane agit comme un catalyseur qui rompt les barrières d'énergie du peptide afin que ce dernier adopte une conformation spécifique, augmentant ainsi son affinité pour son récepteur (Sargent and Schwyzer, 1986). Face à la difficulté de comprendre les différents mécanismes impliqués dans le changement de conformation des ligands peptidiques en contact avec l'environnement à la surface de la membrane plasmique de cellules eucaryotes, de nombreuses études portant sur la caractérisation structurale des peptides en présence de micelles ou de lipides membranaires ont été réalisées (Gremlich et al., 1983).

En 1972, Singer et Nicholson ont proposé le modèle de la mosaïque fluide afin de décrire la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Le terme «mosaïque fluide» fût employé pour décrire à la fois la composition diversifiée et le comportement dynamique des membranes biologiques (Singer and Nicolson, 1972). La membrane cellulaire est composée principalement de lipides et de protéines (**Figure 1.7**). L'environnement extracellulaire est pourvu des molécules résultantes de la complexation des glucides aux protéines; connus sous l'appellation de protéoglycanes (**Figure 1.7**). Le modèle de la mosaïque fluide appui également l'hypothèse que la fluidité de la bicouche lipidique faciliterait le glissement de la couche supérieure sur la couche inférieure et vice versa. Cette propriété permet des phénomènes d'échanges et de mouvements entre les différentes molécules constitutives de l'environnement extra-membranaire. De plus la distribution et la mobilité des molécules se produisent soit entre les deux couches (diffusion transversale) soit au sein de la même couche (diffusion latérale). Ces différents phénomènes comprenant la fluidité et les diversités chimiques et structurales rendent l'environnement membranaire très complexe (Singer and Nicolson, 1972). À titre d'exemple, la surface externe des membranes

plasmiques est généralement recouverte d'une couche dense de protéoglycanes. Les protéoglycanes forment des complexes covalents entre des protéines et des chaînes linéaires constituées de glucides appelés glycosaminoglycanes.

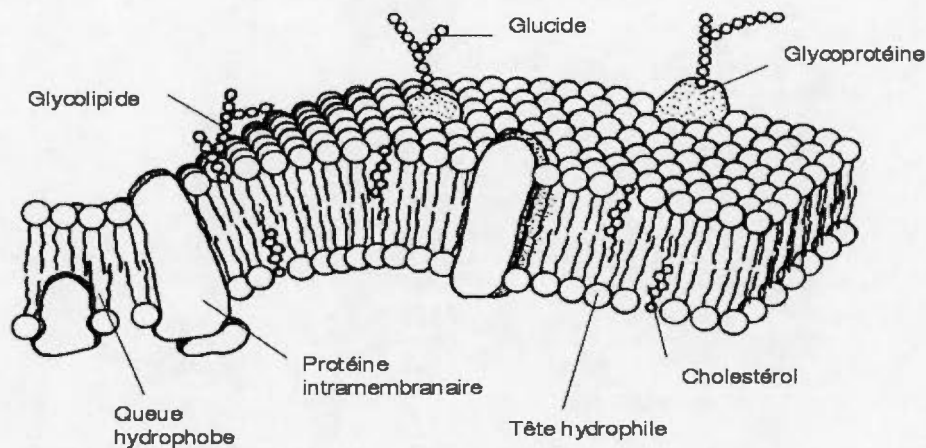


Figure 1.7 Modèle de la mosaïque fluide (Soucie, 2013).

1.3 Glycosaminoglycanes

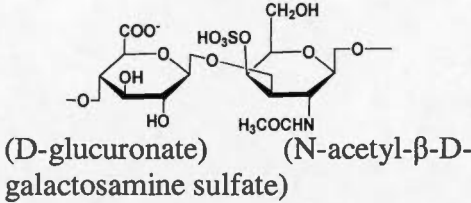
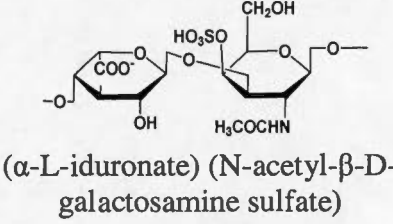
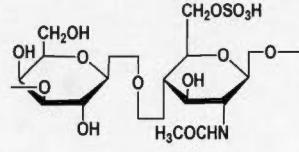
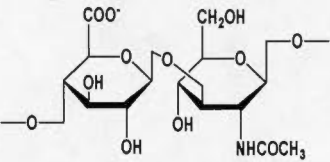
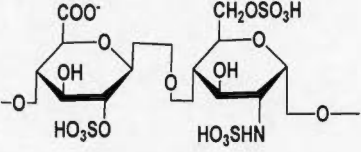
Les glycosaminoglycanes sont de longues chaînes linéaires de polysaccharides, sulfatés, négativement chargés et ils affichent un poids moléculaire qui varie entre 10-100 KDa. Les GAGs sont présents à la surface des cellules des vertébrés, au niveau de la membrane basale (Jackson et al., 1991) et de la matrice extracellulaire (Yu et al., 2005). Ils jouent un rôle essentiel dans l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules (Bishop et al., 2007). Les glycosaminoglycanes présentent un intérêt thérapeutique, car ils seraient impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que les cancers, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose et l'arthropathie (Bishop et al., 2007).

1.3.1 Structure et classification

Les GAGs sont divisés en deux principales classes dont les structures sont représentées dans le **tableau 1.7** : les GAGs non sulfatés incluant l'acide hyaluronique (AH) et les GAGs sulfatés incluant l'héparane sulfate (HS), les chondroïtines sulfates (CS), le dermatane sulfate (DS) et le kératane sulfate (KS). Les GAGs ont une structure linéaire formée de plusieurs unités de disaccharides. Chaque unité est constituée d'un acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-iduronique) et d'un sucre aminé (D-galactosamine ou D-glucosamine) N- et O-sulfaté complexifiant ainsi la structure des GAGs (Jackson et al., 1991). Les GAGs diffèrent en fonction du type de l'hexosamine, de l'hexose ou de l'acide hexuronique dont ils contiennent et également de la géométrie des liens glycosidiques établies entre les unités. Ainsi donc, CS et DS dont l'hexosamine est la galactosamine sont appelés des galactosaminoglycanes tandis que l'héparine et HS ayant les glucosamines sont appelés des glucosaminoglycanes.

Les GAGs sont généralement attachés de façon covalente à des axes verticaux, protéiniques appelés protéoglycanes. Ces axes protéiniques tapissent la membrane extracellulaire. La synthèse des GAGs est initiée par l'attachement irréversible du groupe D-xylosyl au résidu de sérine des protéoglycanes (**Figure 1.8**) (Jackson et al., 1991). Par la suite, la glycosyltransférase va catalyser l'ajout successif d'unité d'uridine à la chaîne de GAGs préexistante. Une fois la polymérisation terminée, la chaîne de GAGs est modifiée par épimérisation, en présence de sulfo-transférases pour donner des chaînes de GAGs matures et prêtes à être excrétées (Jackson et al., 1991).

Tableau 1.7 Récapitulatif des différentes classes de glycosaminoglycanes (Jackson et al., 1991)

Glycosaminoglycane	Structure	Caractéristiques
Chondroïtine sulfate	 <p>(D-glucuronate) (N-acetyl-β-D-galactosamine sulfate)</p>	5 - 50 KDa Présent au niveau du cartilage, du tendon, des ligaments
Dermatane sulfate	 <p>(α-L-iduronate) (N-acetyl-β-D-galactosamine sulfate)</p>	15 - 40 KDa Présent au niveau de la peau, des valves du cœur et les vaisseaux sanguins
Kératane sulfate	 <p>(β-D-galactose) (N-acetyl-β-D-glucosamine sulfate)</p>	4 - 19 KDa Présent au niveau de la cornée et du cartilage
Acide hyaluronique	 <p>(D-glucuronate) (N-acetyl-β-D-glucosamine)</p>	4 - 8000 KDa Présent dans le liquide synovial
Héparane sulfate/héparine	 <p>(α-L-iduronate) (N-acetyl-β-D-glucosamine sulfate)</p>	4 - 17 KDa Présent dans les tissus conjonctifs et les poumons

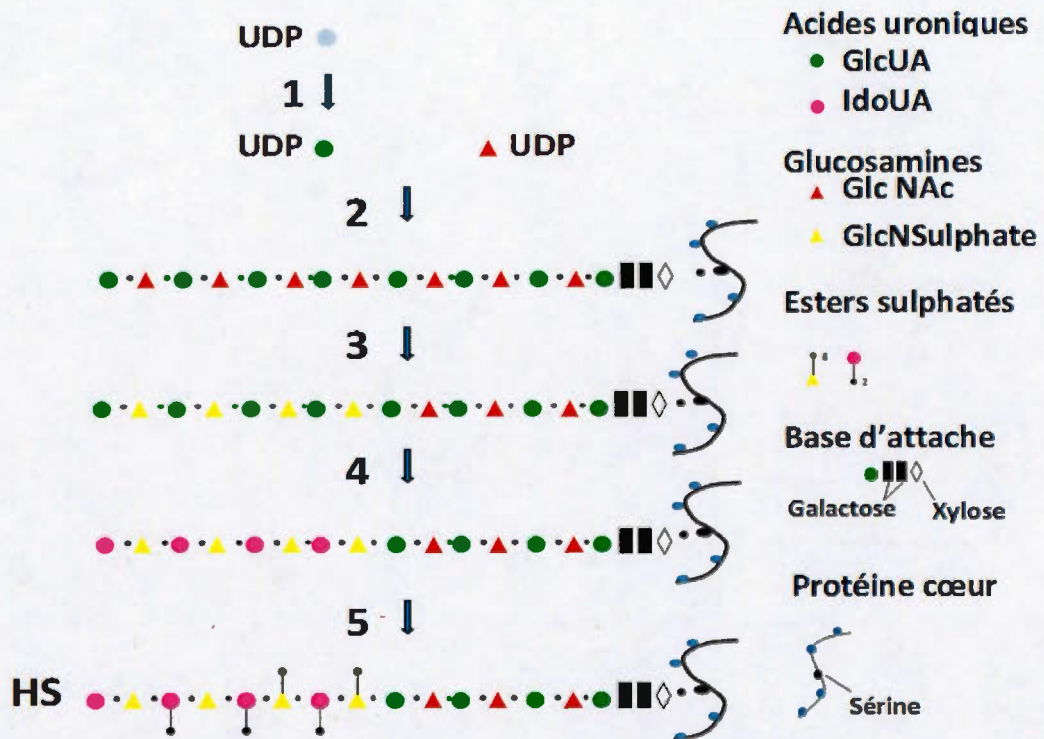


Figure 1.8 Biosynthèse des GAGs. Les enzymes impliqués sont: (1) UDP glucose déshydrogénase, (2) héparane sulfate (HS) déshydrogénase, (3) N-déacétylase/N-sulpho-transférase, (4) uronosyl C5-épimérase et (5) 2,6-O-sulphotransférases (Rabenstein, 2002).

1.3.2 Fonctions biologiques

Les GAGs particulièrement HS, sont exprimés et sécrétés par divers types cellulaires chez les animaux. En plus, ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et stimulent l'activité de nombreux systèmes biologiques chez les mammifères. À titre d'exemple, les GAGs présents sous la forme libre dans la matrice extracellulaire ou complexée à la membrane cellulaire, favorisent l'adhésion cellulaire, régulent la croissance et la prolifération cellulaire. D'ailleurs, ils sont impliqués dans les processus de développement cellulaire et stimulent la coagulation du sang (Bishop et al., 2007). De même, les GAGs sont impliqués dans le développement et la régénération des cellules nerveuses. Les travaux d'Esko (Esko and Lindahl, 2001) ont démontré que la sous-expression des GAGs entraînait une

inhibition de la croissance des cellules cancéreuses et de ce fait serviraient d'outils dans la lutte contre le cancer. De plus, les GAGs sont également impliqués dans le métabolisme des lipides, ils interagissent avec les lipases et permettent l'hydrolyse des lipoprotéines dans le foie. Par conséquent, les triglycérides résultant de l'hydrolyse vont interagir avec HS qui tapisse la membrane des hépatocytes et seront ensuite internalisés par les hépatocytes où ils vont être dégradés dans le but de produire de l'énergie utile pour les processus d'anabolisme (MacArthur et al., 2007).

Au niveau de la membrane basale, HS joue le rôle de filtre anionique. Il est impliqué dans des activités structurales et par conséquent il confère à la membrane basale des propriétés de barrière protectrice contre divers stress mécaniques et chimiques (Iozzo, 2005). De plus, les GAGs jouent le rôle de corécepteur des facteurs de croissance, des chémokines, des enzymes, des protéines adhésives et des virus (**Figure 1.9**).

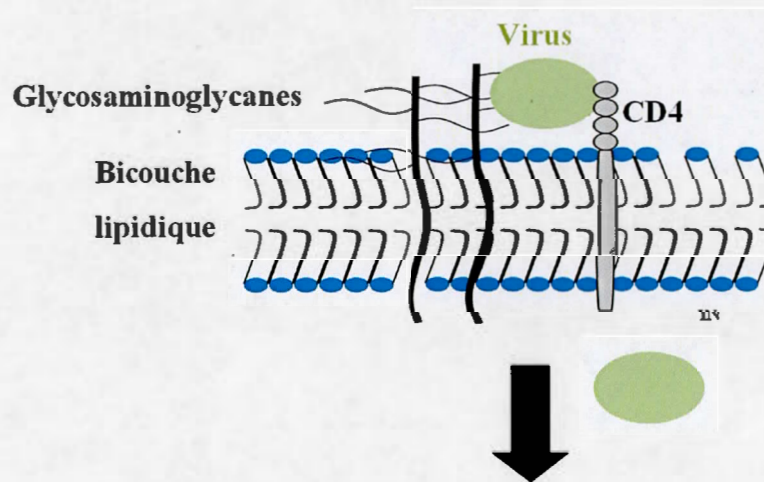


Figure 1.9 Rôle de co-récepteur des GAGs. Lors d'une infection virale, les GAGs fixent les virus et ils les présentent aux CD4. Après activation des CD4 suite au contact, les virus sont internalisés dans la cellule (Favretto et Brock, 2014).

Les GAGs sont constitués en moyenne de plus de 150 unités de disaccharides et sur chaque axe protéinique on peut dénombrer jusqu'à 100 chaînes de GAGs dépendamment du type de protéoglycans (Poole, 1986). HS est présent à la surface membranaire de la majorité des cellules des mammifères (Poole, 1986). Il assure plusieurs fonctions : corécepteur pour les facteurs de croissance, agent adhésif entre cellules adjacentes et transporteur des chémokines. Le HS sécrété est impliqué dans la formation de l'architecture extracellulaire de la matrice qui forme une barrière physiologique et séquestre les facteurs de croissance et les morphogènes pour un relâchement tardif de ces derniers (Figure 1.10).

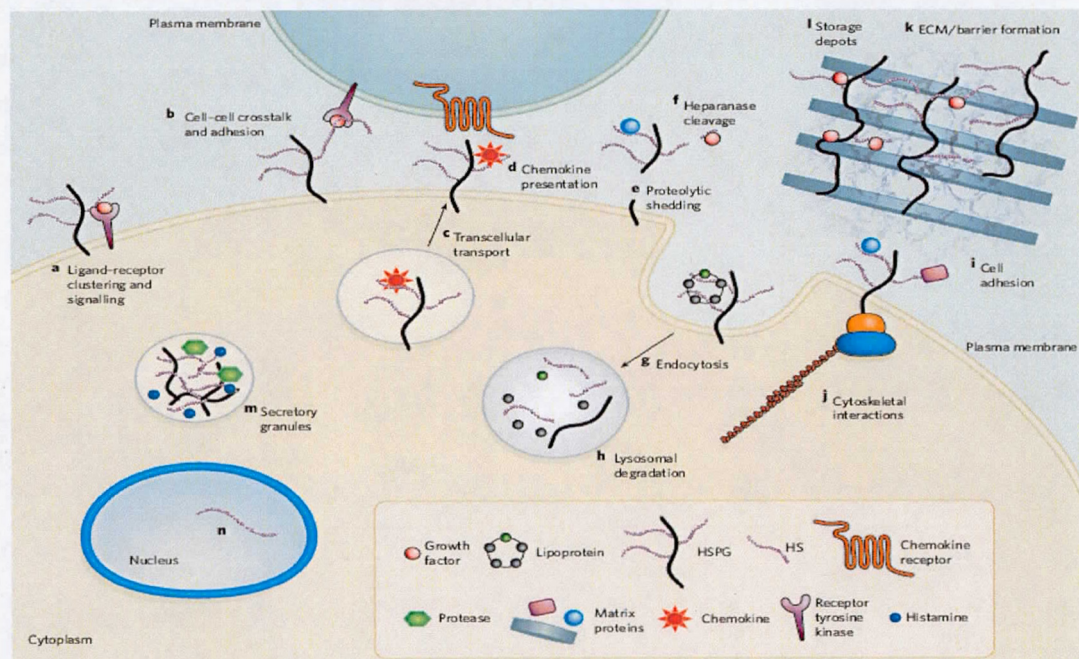


Figure 1.10 Rôle de l'héparane sulfate. (a) Fonction de co-récepteur de HS. (b) HS est impliqué dans l'adhésion cellulaire. (c) Il transporte les chémokines à la surface cellulaire. (d) HS présente les chémokines à leurs récepteurs spécifiques. (e) Les protéoglycans porteurs de GAGs sont digérés par des enzymes protéolytiques et (f) HS est clivé sous l'action de l'héparinase. (g) Le complexe protéoglycans et héparane sulfate HSPG est internalisé par endocytose par la cellule. (h) Une fois à l'intérieur, le complexe est soit recyclé soit dégradé par la machinerie lysosomiale. (i) HSPG permet à la cellule d'adhérer avec la matrice extracellulaire et (j) forme des ponts avec

le cytosquelette. Il joue le rôle de (k) barrière physiologique et (l) séquestre des petites molécules pour un relâchement plus tardif. On rencontre HSPG dans (m) les granules sécrétoires et (n) le noyau (Bishop et al., 2007).

1.3.3 Interaction GAG – protéine

Les GAGs interagissent avec une large gamme de protéines. Cette interaction est principalement modulée par des interactions électrostatiques. Néanmoins, les GAGs sont également prompts à établir d'autres types de liaison avec les protéines tels que les ponts d'hydrogène avec les résidus d'arginine et de glutamine des protéines et des interactions hydrophobiques avec les résidus de tryptophane (Amand et al., 2012).

Comme exemple bien connu d'interaction GAG-protéines, nous faisons référence à la liaison GAG-chémokines. Les chémokines ou cytokines chimiotactiques sont des protéines impliquées dans la migration des leucocytes (Sallusto and Baggiolini, 2008). Elles sont divisées en trois principales familles selon la disposition des premiers résidus de cystéines dans leur séquence primaire. C'est ainsi que l'on distingue : CC, CXC, CX3C, où X représente un résidu différent de la cystéine (C) (Proudfoot et al., 2003). Les chémokines et leurs récepteurs sont impliqués dans de nombreuses maladies incluant l'inflammation et le cancer (Balkwill, 2004; Koelink et al., 2012). Dans le but d'accomplir leurs fonctions biologiques les chémokines se lient initialement à des chaînes de GAGs sulfatés avec une affinité plus ou moins forte avant de se fixer à leurs récepteurs spécifiques (Johnson et al., 2005). En fait de nombreuses chémokines dirigent le transport des cellules immunitaires en conditions physiologiques ou pathologiques. Les GAGs jouent un rôle crucial lors de ce processus car en liant les chémokines, ils protègent ces derniers contre la protéolyse et la dilution tout en augmentant leur gradient de concentration local (Ellyard et al., 2007; Johnson et al., 2005). De nombreux travaux ont montré que HS immobilise les chémokines à la surface des cellules. C'est le cas des CXCL2 qui sont immobilisés à la surface des cellules endothéliales par HS. Cette interaction HS-CXCL2 est importante pour la transmigration des neutrophiles (Massena et al., 2010).

La présence de charges négatives des GAGs et le caractère cationique des chémokines entraînent une liaison électrostatique des chémokines aux GAGs. Chez la majorité des chémokines on retrouve au niveau de leur séquence des épitopes de liaison aux GAGs, appelés «*heparin binding domain*» XBBXB (où B correspond aux résidus basiques et X aux acides aminés arbitraires ou hydrophobiques, à l'exception d'une proline) (Cardin and Weintraub, 1989). Ainsi, la présence d'un épitope de liaison aux GAGs dans la séquence des chémokines leur confère un certain degré de sélectivité (Johnson et al., 2005). Dans le but de montrer l'importance des motifs «*heparin binding domain*», des mutations au niveau de ces sites ont été réalisées dans la séquence des chémokines CCL2, CCL4 et CCL5 et les résultats montraient une perturbation de l'activité chimiotactique des chémokines. De plus, la présence de GAGs solubles entre en compétition avec les GAGs membranaires et inhibe premièrement l'activation des récepteurs des chémokines et par la suite la réponse immunitaire (Kuschert et al., 1999).

1.4 Peptides à pénétration cellulaire (PPC)

Les PPCs sont principalement des peptides constitués de 8 à 30 résidus d'acide aminé. De nombreuses études pharmacologiques s'intéressent aux PPCs à cause de leur habileté à traverser la membrane cellulaire et à transporter des cargos d'intérêt à l'intérieur de la cellule. Ces cargos représentent le plus souvent des médicaments, des acides nucléiques (ARN_i), des peptides, des protéines ou des anticorps.

1.4.1 Classification

Selon leur propriété physico-chimique, on distingue trois classes de PPCs: cationique, amphipathique et hydrophobique (Milletti, 2012). Les PPCs cationiques sont caractérisées par la présence de nombreux résidus basiques K et R dans leur séquence. Les PPCs amphipathiques sont divisées en 4 sous-groupes: les amphipathiques primaires, les amphipathiques secondaires ou hélicoïdales, les amphipathiques feuillet- β et les amphipathiques riches en proline. Les amphipathiques

primaires représentent des peptides chimères; ils sont obtenus par l'attachement covalent d'un domaine hydrophobique à un PPC cationique constitué de plus de huit résidus d'arginine. Les amphipathiques en hélice α comprennent des résidus d'acides aminés hydrophobiques organisés sur une face d'un peptide hélicoïdal et la face opposée affiche des résidus hydrophiles, généralement cationique. En ce qui concerne les amphipathiques en feuillet β , ces peptides doivent adopter une conformation de feuillet β pour une internalisation efficace. Les amphipathiques riches en proline confèrent au peptide une rigidité due à la présence du noyau pyrrolidine; le peptide dans ce cas adopte une structure de polyproline. Les PPCs ont plusieurs origines. Il existe des PPCs d'origine antimicrobienne, virale, naturelle (peptide naturel ou segment de protéines) et synthétique (design) (**Tableau 1.8**).

Tableau 1.8 Classification des PPCs selon leur origine et leurs propriétés physico-chimiques (Bechara and Sagan, 2013; Milletti, 2012)

Classe	Peptide	Séquence	Référence
Origine naturelle			
Cationique	Tat (47-57)	YGRKKRRQRRR	Vives, 1997
Amphipathique secondaire en hélice α	AIP6	RLRWR	Wang, 2011
	VEC	LLIILRRRLRKQAHASK	Elmqvist, 2001
	M918	MVTVLFRRLRIRRACGPPRVV	El-Andaloussi, 2007
Hydrophobique	C105Y	PFVYLI	Rhee, 2006
	FGF12	PIEVCMYREP	Nakayama, 2011
Origine virale			
Amphipathique secondaire en feuillet β	VT5	DPKGDPKGVTVTVTVTVTGKGDPKPD	Oehlke, 1997
Amphipathique	HIV-1/ VPR 77-92	RHSRIGIIQQRTRNG	Godet, 2010
Origine antimicrobienne			
Amphipathique	Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	Fennell, 1967
hLF	Lactoferrine	KCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKR	Duchardt, 2009
Amphipathique riche en proline	BAC-7	RRIRPRPPRLPRPRRPLPFPRPG	Sadler, 2002
	Pyrrhocoricine	VDKGSYLPRTPPRPYIYNRN	Otvos, 2004
Design in silico			
Cationique	R9	RRRRRRRRRR	Mitchelle, 2000
Amphipathique (cationique primaire)	PEP-1	KETWWETWWTEWSQPKKRKV	Morris, 2001
Amphipathique riche en proline	(PPR) _n	(PPR) 3, (PPR) 4, (PPR) 5, (PPR) 6	Daniels, 2007
	Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	Gao, 2002

1.4.2 Mécanisme de pénétration cellulaire

Depuis la découverte des PPCs, de nombreuses études ont porté sur leurs mécanismes de pénétration cellulaire et ceux-ci peuvent être divisés en deux catégories, la translocation directe et l'endocytose (**Figure 1.11**). Le mécanisme de translocation directe implique deux modèles ; le modèle à tapis (**Figure 1.11a**) et le modèle "*Barrel-Staffe*" ou modèle de formation des pores (**Figure 1.11b**). La translocation via le modèle à tapis mieux connu sous le terme modèle à "carpet" est le modèle de translocation des peptides antimicrobiens (Pouny et al., 1992) et d'autres PPCs qui sont toxiques à haute concentration (Lundberg and Langel, 2003). Lors de ce processus, le contact du PPC avec la tête chargée des phospholipides entraîne un changement de conformation du peptide suivi de la rupture locale de la membrane facilitant ainsi l'internalisation (Lundberg and Langel, 2003). Quant au modèle *Barrel-Staffe*, l'interaction entre les résidus hydrophobiques du PPC et les lipides membranaires conduit à la formation des pores (Lundberg and Langel, 2003).

Parallèlement, les PPCs peuvent être internalisés par endocytose via différentes structures cellulaires, telles que les phagosomes, les macropinosomes, la clathrine et la cavéoline. Les phagosomes dérivant de la séquestration des peptides par des invaginations de la membrane plasmique vont transporter les PPCs dans les compartiments intracellulaires, il s'agit de la phagocytose (**Figure 1.11c**). En présence de soluté, on parlera de macropinocytose (**Figure 1.11d**) (Conner and Schmid, 2003). La clathrine et la cavéoline sont des protéines qui tapissent la région intracellulaire de la membrane.

Lors de l'endocytose dépendante des clathrines (CDE) (**Figure 1.11e**), les ligands emprisonnés dans des puits tapissés de clathrines sont véhiculés jusqu'à l'endosome et par la suite distribués aux lysosomes ou au réseau de Golgi. Contrairement à l'endocytose médiée par les cavéoles, l'endocytose indépendante de la clathrine et de

la cavéoline (**Figure 1.11g et Figure 1.11h**) se fait via les domaines de membrane plasmique nommés *lipids rafts* (Conner and Schmid, 2003).

De nombreux PPCs cationiques à l'exemple du Tat (Tyagi et al., 2001), de la pénétratine, des polymères d'arginine et de lysine (PenArg et PenLys respectivement) (Amand et al., 2012), et des peptides riches en arginine (Nakase et al., 2007) empruntent principalement la voie de la macropinocytose. Les mécanismes d'internalisation des PPCs sont étroitement liés à leurs propriétés physico-chimiques, à leur concentration, à la nature du cargo véhiculé et au type cellulaire (Lundberg and Langel, 2003). Bien que le mécanisme d'internalisation des PPCs ne soit pas encore clairement défini, des travaux pionniers incluant ceux de Brugidou (Brugidou et al., 1995), Wender (Wender et al., 2000) et Elmquist (Elmquist et al., 2001) ont montré que des PPCs tels que la pénétratine, pVEC et le peptide Tat étaient internalisés aussi bien à 4°C qu'à 37°C avec la même efficacité, bien que ces résultats sont aujourd'hui contestés. De plus, ils ont révélé que les inhibiteurs d'endocytose n'affectaient en aucun cas cette internalisation.

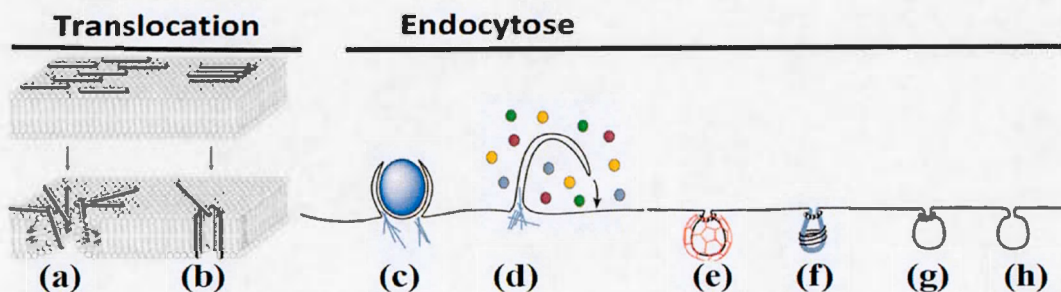


Figure 1.11 Différentes voies d'internalisation des PPCs. (a) Les PPCs sont internalisés par deux modèles de translocation directe: le modèle à tapis et (b) le modèle Barrel-Stave. On observe également l'internalisation par endocytose : (c) la phagocytose, (d) la macropinocytose, (e) l'endocytose médiée par les clathrines, (f) l'endocytose médiée par la cavéoline et (g et h) l'endocytose indépendante des clathrines et de la cavéoline (Lunderberg et Conner, 2003).

1.4.3 Rôle des GAGs dans l'internalisation des PPCs cationiques

En considérant leur charge nette positive au pH physiologique, les PPCs cationiques établissent des interactions électrostatiques avec les GAGs sulfatés qui tapissent la surface des cellules eucaryotes. Le peptide Tat fût le premier PPC cationique découvert. Celui-ci dérive de la protéine Tat (trans-activateur transcriptionnel du virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1)) et constitue le principal segment basique riche en résidus d'arginine et de lysine (Tyagi et al., 2001). La protéine Tat est exprimée précocement par le virus du VIH-1 après l'infection du sujet. Elle est un puissant activateur du processus de transcription du VIH-1 (Tyagi et al., 2001) d'où son rôle dans l'infection systémique des cellules. En plus de sa fonction de transcription du promoteur du VIH, cette dernière exerce des activités biologiques pléiotropiques. Elle est responsable de l'activité de translation du virus et est connue sous l'appellation de PTD (*protein transduction domain*). À partir des PTDs, de nombreux peptides dotés d'une capacité de transduction (les PPCs) ont été identifiés. Le mécanisme d'internalisation des PPCs cationiques, incluant le Tat, reste encore mal compris. Toutefois, on distingue deux principaux modes de pénétration de la protéine Tat: la translocation directe et l'endocytose (Wadia et al., 2004). Étant donné que les PPCs cationiques établissent des interactions avec les molécules chargées négativement que l'on retrouve à la surface membranaire des cellules eucaryotes, de nombreux travaux ont porté sur l'étude biophysique des interactions entre les PPCs et les composés anioniques de la membrane plasmique. Dans cet optique, Tyagi et collègues (Tyagi et al., 2001) ont montré au travers de leurs travaux que l'internalisation du Tat nécessitait la présence de HS à la surface des cellules. En effet, en incubant des cellules ovariennes d'hamsters chinois (CHO-K1) en présence d'héparine ou d'autres GAGs solubles, ils ont mis en relief le phénomène de compétition qui existerait entre les GAGs sulfatés à la membrane plasmique des cellules et les GAGs soluble pour le peptide Tat. L'héparine en solution exerce une inhibition totale tandis que les autres GAGs exercent une inhibition partielle de

l'internalisation. De plus, l'internalisation du peptide Tat par des cellules pourvues en GAGs à leur membrane a été comparée à celle de cellules déficientes en GAGs. Lorsque les GAGs des cellules CHO-K1 étaient digérés par l'héparinase avant l'incubation, la quantité de peptide internalisée par ces cellules était négligeable comparé aux cellules non-traitées. Le même résultat a été observé lorsque les CHO-K1 avec des GAGs prédigérés étaient remplacés par des CHO-pgs déficientes en xylosyl-transférase, une enzyme responsable du transfert de l'UDP-xylose au résidu de sérine des protéoglycanes, important pour la synthèse des GAGs. Donc, ces résultats confirment le rôle important des GAGs sulfatés dans l'internalisation des PPCs cationiques. L'implication des GAGs dans la pénétration de PPCs tels que la maurocalcine (Ram et al., 2008), la pénétratine et les peptides de conformations hélicoïdales qui lient l'héparine (HHBP) (Rullo et al., 2011) a également été démontrée (Figure 1.12).

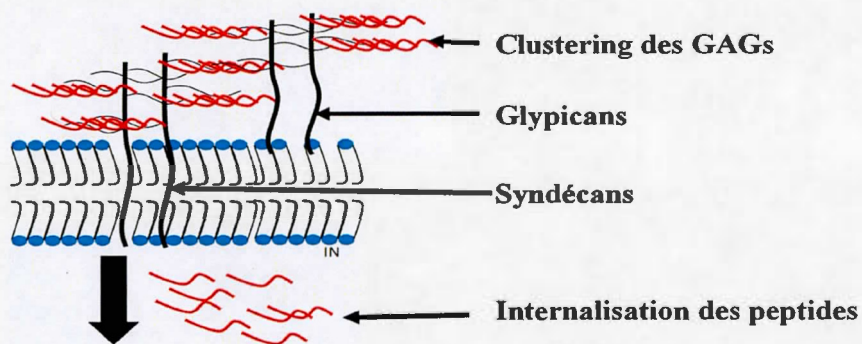


Figure 1.12 Mécanisme d'internalisation des PPCs. L'interaction entre les PPCs et les GAGs entraîne l'agrégation des GAGs et favoriserait l'internalisation des PPCs cationiques (Zeigler et al., 2005).

1.4.4 Le PACAP : un nouveau PPC

Les PPCs peuvent être d'origine naturelle (Tat, Maurocalcine) ou synthétique (R9). Tout récemment les travaux de Doan ont permis d'attribuer des propriétés de pénétration cellulaire au PACAP (Doan et al., 2012b). Il a été observé que le PACAP au même titre que certains de ses analogues biologiquement inactifs ont le potentiel de transporter divers cargos à travers la membrane cellulaire. Ce résultat indique que

l'endocytose du PACAP est indépendante de sa liaison à ses récepteurs (PAC1, VPAC1 et VPAC2). De même, en complexant l'Alexa fluor@568 streptavidine au PACAP biotinylé, les résultats de cytométrie en flux et de microscopie confocale ont révélé que le PACAP et ses dérivés inactifs étaient distribués de façon homogène dans les compartiments internes des cellules CHO-K1, HEK293 et HeLa; confirmant ainsi le fait que le PACAP a la capacité de traverser la barrière membranaire tout en transportant diverses macromolécules (Doan et al., 2012a). Des études ultérieures ont montré que le niveau d'internalisation du PACAP38 est trois fois plus élevé que celui observé pour le PACAP 27 ou le TAT. Le domaine C-terminal 28-38 du PACAP38, qui est absent chez le PACAP 27 et riche en résidus basiques (R³⁰, R³⁴ et K²⁹, K³², K³⁶ et K³⁸), pourrait expliquer cette différence d'internalisation. L'étude des voies d'internalisation du PACAP à 4°C ou en présence d'une déplétion d'ATP, a montré une réduction de 80 % de l'internalisation, suggérant que le PACAP est principalement internalisé par un transport actif bien que la translocation directe soit également impliquée.

Le traitement des cellules CHO-K1 avec différents inhibiteurs d'endocytose a entraîné une diminution du transport du PACAP. C'est le cas de l'antimycine A, l'amiloride et la méthyl-β-cyclo dextrine(MβCD). L'action de l'antimycine A consiste à inhiber la glycolyse et la chaîne respiratoire mitochondriale important lors du processus d'endocytose. Quant à l'amiloride et MβCD, ils sont communément utilisés pour inhiber la macropinocytose et pour réduire le niveau de cholestérol respectivement (Doan et al., 2012b). Ces différents tests basés sur l'utilisation de ces différents inhibiteurs d'endocytose confirment l'internalisation du PACAP dans les compartiments internes de la cellule par macropinocytose.

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1 Problématique

Les peptides de la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH sont des (neuro)hormones qui modulent plusieurs fonctions physiologiques importantes via leur interaction spécifique avec des RCPGs localisés au niveau de la membrane plasmique. La présence de résidus basiques dans la séquence de ces hormones et le caractère anionique de la membrane plasmique suggèrent que l'adsorption initiale de ces peptides à la surface des cellules pourrait être favorisée par des interactions électrostatiques. De nombreuses études ont portées sur la liaison de ligands peptidiques à des membranes lipidiques modèles et ont conduit au modèle de la catalyse membranaire. Toutefois, les membranes plasmiques sont excessivement complexes et hétérogènes et les lipides anioniques constituent moins de 2 % des lipides membranaires. Particulièrement, le caractère anionique de la surface cellulaire est principalement dû à la présence de GAGs sulfatés. Les GAGs sont reconnus pour leur capacité à reconnaître des motifs «*heparin binding domain*» (XBBXB) présents chez certaines protéines, incluant les cytokines et des facteurs de croissance. Ainsi, les GAGs favorisent une accumulation locale de ces ligands protéiques au niveau de la membrane et contribuent à une élévation du gradient de concentration.

Par ailleurs, une analyse des séquences et structures secondaires des peptides de la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH permet d'observer la présence de motif «*heparin binding domain*» chez plusieurs de ces ligands. Il apparaît donc que les GAGs pourraient moduler les activités biologiques de ces peptides. Toutefois, cette hypothèse n'a jamais été étudiée jusqu'à présent.

2.2 Hypothèse de travail

Les hormones peptidiques, ligands de RCPGs de classe B, affichent des structures amphiphiliques et cationiques. En considérant que ce caractère leur permet de se fixer aux glycosaminoglycane présents à la surface des cellules et en se basant sur le modèle de la catalyse membranaire proposé par Sargent et Schwyzer, nous avons émis l'hypothèse que ces composés sulfatés pourraient moduler les fonctions biologiques de ces peptides. En outre, ce projet de recherche repose sur l'hypothèse que les GAGs (i) seraient responsables de l'adsorption initiale des peptides à la membrane plasmique, (ii) contribueraient à leur capacité de pénétration cellulaire et (iii) favoriseraient la reconnaissance du peptide par son RCPG spécifique (**Figure 2.1**).

2.3 Objectifs de recherche

En se basant sur nos hypothèses de recherche, l'objectif global de ce travail était de caractériser les interactions entre ces hormones peptidiques et les GAGs en combinant des approches biophysiques et biologiques. Tout d'abord, nous allons définir les paramètres cinétiques, thermodynamiques et structuraux de ces interactions en combinant la résonance plasmonique de surface, la chromatographie d'affinité, la titration isotherme calorimétrie et la spectroscopie de dichroïsme circulaire. De même, cette étude a pour objectif de comprendre le mécanisme d'internalisation du PACAP38, et d'élucider le rôle des GAGs dans la catalyse membranaire et éventuellement la présentation des ligands peptidiques à leur récepteur spécifique.

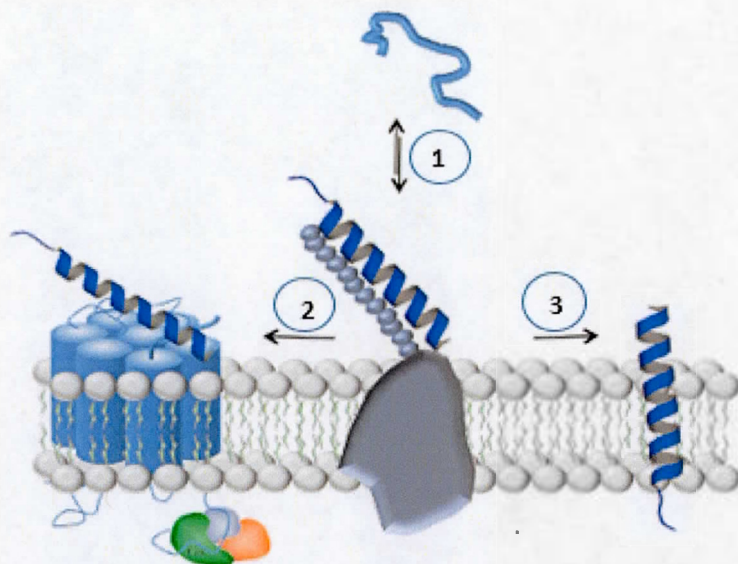


Figure 2.1 Représentation schématique de nos hypothèses de travail. (1) Changement conformationnel et adsorption du peptide induit par les GAGs sulfatés;(2) présentation du peptide au récepteur ou (3) pénétration du peptide.

CHAPITRE III

SECONDARY CONFORMATIONAL CONVERSION IS INVOLVED IN
GLYCOSAMINOGLYCANS-MEDIATED CELLULAR UPTAKE OF CATIONIC
CELL-PENETRATING PEPTIDE PACAP

RÉSUMÉ

Les peptides de pénétration cellulaire (CPPs) sont une classe de courts peptides affichant la capacité de véhiculer des molécules non-perméables de la membrane plasmique jusque dans les compartiments intracellulaires. De récents travaux ont montré que l'hormone peptidique PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), présente un fort potentiel à traverser la barrière membranaire des cellules eucaryotes, pouvant ainsi véhiculer divers cargos. Ces études suggèrent que le PACAP et ses dérivés pourraient être utilisés en tant que vecteur peptidique. Toutefois, les mécanismes moléculaires à la base de son internalisation demeurent toujours inconnus. En considérant le caractère cationique du PACAP, celui-ci peut établir des interactions électrostatiques avec les groupements sulfatés des glycosaminoglycanes (GAGs) localisés à la surface des cellules. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était de caractériser les mécanismes impliqués dans l'internalisation de ce CPP en présence des GAGs. La cytométrie en flux (FACS) a permis de suggérer que l'internalisation de PACAP était dépendante de la présence de GAGs. En outre, par dichroïsme circulaire, nous avons observé que la liaison du PACAP à l'héparine, induisait un changement conformationnel du peptide d'une structure initialement aléatoire à une hélice- α . Afin d'étudier l'implication de cette transition conformationnelle dans l'internalisation du PACAP, nous avons développé des dérivés de PACAP en substituant deux résidus voisins de configuration L en leurs énantiomères de configuration D. Les spectres obtenus, ont montré que ces analogues conservent leur conformation aléatoire et ce, même en présence d'héparine. Les analogues D,D ont été peu internalisés par les cellules pourvues de GAGs. De même, par chromatographie d'affinité, nous avons observé que ces dérivés avaient une affinité pour l'héparine similaire à celle du PACAP. Globalement, nos résultats démontrent le rôle clé des GAGs dans l'internalisation du PACAP et mettent en exergue la capacité du peptide PACAP à traverser la membrane plasmique. Particulièrement, cette étude montre pour la première fois l'importance de l'adoption d'une structure secondaire bien définie pour l'internalisation d'un CPP cationique via des mécanismes impliquant les GAGs

AVANT-PROPOS

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Concernant les travaux réalisés et qui ont concourus à la publication de cet article, A. Tchoumi Nerée a réalisé la majorité des expérimentations en laboratoire. Tchoumi a également participé au design du projet de recherche, à l'analyse des résultats, au montage des figures et à la rédaction de la section Matériels et Méthodes; N. Phuong Trang a participé au design du projet de recherche, à l'expérimentation et à l'analyse des résultats; les Professeurs D. Chatenet et A. Fournier ont participé au design du projet de recherche et à la révision du manuscrit; et le Professeur S. Bourgault a supervisé les travaux du projet, il a réalisé le montage des figures et la rédaction de la version finale du manuscrit.

Secondary conformational conversion is involved in glycosaminoglycans-mediated cellular uptake of the cationic cell-penetrating peptide PACAP.

Armelle Tchoumi Neree^{a,b}, Phuong Trang Nguyen^{a,b}, David Chatenet^c, Alain Fournier^c and Steve Bourgault^{a,b*}

^a*Department of Chemistry, Pharmaqam, University of Québec in Montreal, Montreal, QC, Canada, H3C 3P8*

^b*Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, PROTEO*

^c*INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Qc, Canada, H7V 1B7*

Article publié dans FEBS Letters. 588(2014):4590-6.

***Corresponding author:**

Pr. Steve Bourgault,
Université du Québec à Montréal
C.P. 8888, Succursale Centre-Ville
Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada
1-514-987-3000 (5161)
bourgault.steve@uqam.ca

3.1 Abstract

For cationic cell-penetrating peptides (CPPs), glycosaminoglycans (GAGs) contribute significantly to their cellular uptake. However, molecular details about the contributions of GAGs in internalization remain unclear. In this study, we examined the cellular uptake mechanism of an arginine-rich CPP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). We observed that the uptake efficiency of PACAP was dependent on cell surface GAGs. As the binding of PACAP to sulfated GAGs induced a random coil-to- α -helix conformational conversion, we probed the role of the helical formation in internalization. Whereas this secondary structure was not crucial for efficient internalization in GAG-deficient cells, PACAP α -helix was essential for GAG-dependent uptake.

Keywords:

Cell-penetrating peptide; Glycosaminoglycans; α -Helix; Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; Cellular uptake

Highlights:

- Glycosaminoglycans play a key role for the cellular uptake of the cationic peptide PACAP
- PACAP binding to GAGs induces a random coil-to- α -helix conformational conversion
- PACAP α -helix is necessary for efficient internalization mediated by cell surface GAGs

3.2 Introduction

Over the last two decades, cell-penetrating peptides (CPP) have gained interest as chemical tools for the intracellular delivery of macromolecular cargoes intended for biological and medical applications (Jones and Sayers, 2012). CPPs are a class of diverse peptides, usually ranging from 5 to 30 residues, which can cross the plasma membrane through a variety of mechanisms that remain partially elusive. According to their physicochemical properties, CPPs can be classified into three major classes: (i) cationic, (ii) amphipathic and (iii) hydrophobic (Milletti, 2012). Cationic CPPs are short peptides that are rich in arginine and lysine residues (Futaki et al., 2001; Tunnemann et al., 2008). The vast majority of CPPs derived from natural protein motifs and were identified in DNA/RNA-binding proteins, viral proteins, signal peptides or heparin-binding proteins (Milletti, 2012). Interestingly, we recently reported that an endogenous peptide neurohormone, pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide (PACAP), can cross efficiently the plasma membrane in a specific-receptor independent manner, mainly by active endocytosis involving a clathrin-dependent pathway and micropinocytosis (Doan et al., 2012a). This peptide was highly effective in mediating the cellular uptake of a variety of cargoes, including protein and DNA plasmid (Doan et al., 2012b). The cellular uptake efficacy of PACAP was 3-times higher than that observed for the TAT peptide (Doan et al., 2012a), underlining the potent ability of this peptide to cross the plasma membrane. These studies have identified PACAP as a new member of the CPP family and suggest that PACAP derivatives represent excellent vectors for the intracellular delivery of non-permeable molecules. Nonetheless, as for other CPPs, the elucidation of the molecular requirements of PACAP internalization is necessary to improve its delivery efficiency.

PACAP is a 38-amino acid C-terminally- α -amidated peptide that encompasses 11 basic residues, *i.e.* 4 arginines and 7 lysines, conferring a polycationic nature to this

peptide (**Figure 3. 1A**) (Vaudry et al., 2009). PACAP exhibits a random coil conformation in aqueous solutions whereas the central and C-terminal domains of the polypeptide chain readily adopt a helical structure in membrane mimicking milieu, such as dodecyl phosphocholine (DOPC) micelles (**Figure 3.1B**) (Bourgault et al., 2011; Hoare, 2005; Sze et al., 2007). Helical wheel representation of this putative helical segment (**Figure 3.1C**) shows that cationic residues are dispersed on both sides of the α -helix, conferring a highly positive charge distribution on the overall surface of the peptide. For cationic CPPs, it has been reported that membrane-associated glycosaminoglycans (GAGs) contribute significantly to their cellular uptake (Favretto et al., 2014). For instance, the removal of cell surface sulfated GAGs was shown to decrease substantially the cellular uptake of the TAT peptide (Richard et al., 2005), penetratin (Amand et al., 2012; Jiao et al., 2009) and the R8 poly-arginine peptide (Nakase et al., 2007).

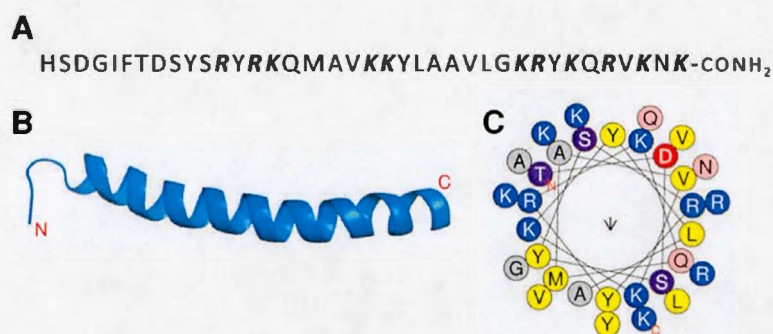


Figure 3.1 Sequence and structure of PACAP (A) Primary structure of PACAP with basic residues indicated in italic bold letters. (B) Schematic ribbon representation of micelle-bound PACAP secondary structure (PDB code: 2D2P). (C) Helical wheel representation of the putative α -helix segment of PACAP (Thr7-Lys38) with basic residues indicated in blue.

GAGs, including heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS), are long and linear polysaccharides composed of repeating disaccharide units (Bishop et al., 2007). They are abundant on the outer leaflet of the plasma membrane of every cell type of metazoan organisms where they are O-linked to proteoglycans (Moremen et al.,

2012). Owing to their high content in carboxylate and sulfate groups, GAGs are highly negatively charged biopolymers that surround cells. Despite the well-recognized importance of GAGs in the uptake of cationic CPPs, the molecular details regarding the roles of proteoglycans are still a matter of controversy and several mechanisms have been inferred from biophysical and biochemical investigations. It has been recently proposed by Favretto and *al.*, (Favretto et al., 2014) that the roles of GAGs in the endocytosis of CPPs could be ascribed to either (i) GAGs clustering upon peptide binding, (ii) co-clustering of a receptor and GAGs upon CPP binding and/or (iii) GAGs mediating peptide adsorption to the plasma membrane. Particularly, in contrast to amphipathic CPPs, the importance of the secondary structure of cationic CPPs has been poorly investigated so far.

In this study, we first investigated the roles of cell surface GAGs in the adsorption of PACAP to the outer leaflet of the plasma membrane and its subsequent cellular uptake. Considering that the binding of PACAP to sulfated GAGs induced a random coil-to- α -helix conformational conversion, we studied the contribution of this secondary structure in cellular uptake. This study highlights the mechanistic elements of PACAP endocytosis and exposes a new molecular basis of GAGs-mediated uptake of cationic CPPs.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Peptide synthesis, purification and characterization

Peptides were synthesized on solid phase, purified by reverse-phase high performance liquid chromatography and characterized by mass spectrometry as described in the Supplementary materials.

3.3.2 Peptide uptake

CHO-K1 and CHO pgs-A-745 were seeded in 12-well plates at a density of 30 000 cells/well for 48 hours. Cells were incubated in presence of fluorescein-labelled

peptides for 1 h at 37°C and 5 % CO₂. Time of incubation was defined according to our previous study (Doan et al., 2012a). After incubation, cells were washed twice with HBSS buffer, treated for 5 min with 100 µg/mL heparin to remove the excess of peptide bound to the cell surface (Al-Taei et al., 2006; Kaplan et al., 2005), washed once again and detached by trypsinization. Trypsin action was stopped and cells were centrifuged. Cells were resuspended in 500 µL sorting buffer and kept on ice until flow cytometry analysis. For heparinase treatment, CHO-K1 cells were seeded as described above. After 24 h incubation, cells were treated overnight with 8 UI/mL of heparinase. One hour before cell treatment with peptide, heparinase was added and experiments were performed as above-described above. These methods are described in detail in Supplementary materials.

3.3.3 Membrane binding

Cell surface adsorption was assessed using a protocol adapted from Gump *et al.* (Gump et al., 2010). Cells were seeded as described above and after 48 h, cells were incubated on ice at 4°C for 10 min. Cells were then incubated in presence of fluorescein-labelled peptide for 15 min at 4°C. Cells were then washed 3 times and detached manually. Cells were centrifuged at 4°C before being resuspended in sorting buffer. Flow cytometry analyses were performed using a FACS Calibur instrument (BD Biosciences) and a minimum of 10 000 gated cells per sample were analyzed. These methods are described in detail in Supplementary materials.

3.3.4 Characterization of PACAP - sulfated – GAGs - interaction

Affinity chromatography, circular dichroism (CD) spectroscopy and static light scattering were used to probe PACAP interaction with heparin as described in the Supplementary materials.

3.4 Results

3.4.1 Cell surface glycosaminoglycans promote cellular uptake and membrane binding of PACAP

According to the high positive net charge of PACAP, we initially investigated the potential role of cell surface GAGs in the uptake and membrane binding. We used the CHO pgs-A-745 cells, which are deficient in xylosyl transferase, an enzyme that catalyzes the transfer of a D-xylosyl group to the side chain of a serine, a key step in the synthesis of proteoglycans. As a consequence, these cells do not express any GAGs on their plasma membrane (Esko et al., 1985). As observed by flow cytometry, pgs-A-745 cells were significantly less effective than their wild type counterpart to internalize fluorescein-labelled PACAP (**Figure 3.2A**, **Figure 3.2B**). To confirm that these results were not a consequence of a defect in the endocytosis machinery of CHO pgs-A-745, we exposed the CHO-K1 cells to an enzymatic treatment to remove cell surface GAGs. To digest cell surface HS, two successive treatments with 8 UI/mL heparinase VIII were performed. Such treatment was previously shown to be effective for decreasing the amount of cell surface GAGs, while not affecting the integrity of the plasma membrane (Bradshaw et al., 2010; Verdurmen et al., 2013). It is worth mentioning that HSPGs constitute the major proteoglycans of CHO-K1 cells (Esko et al., 1987). The uptake of PACAP was reduced by approximately 50 % upon HS enzymatic removal with heparinase (**Figure 3.2C**, **Figure 3.2D**). Particularly, CHO-K1 heparinase-treated cells showed a comparable uptake of PACAP to pgs-A-745 cells. Secondly, we addressed the contributions of proteoglycans in extracellular membrane association by incubating the cells at 4°C for 15 min before detaching them with a non-enzymatic treatment. Such conditions are known to inhibit active endocytic pathways (Amand et al., 2012; Gump et al., 2010). As observed for endocytosis, the extent of cell membrane binding was dependent on the presence of GAGs, with cell surface adsorption being approximately 3-fold higher for CHO-K1 (**Figure 3.3A**, **Figure 3.3B**). These results demonstrate the major contributions of cell surface GAGs in PACAP cellular uptake and membrane binding. Nonetheless, GAGs-independent mechanisms of endocytosis and membrane adsorption also contributed to some extent to internalization, suggesting that sialic acid and/or

anionic phospholipids could be involved in PACAP attachment to the cell surface. This is in agreement with previous studies reporting that the removal of cell surface HS leads to a 20 to 80 % reduction of uptake of cationic CPPs (Amand et al., 2012; Favretto et al., 2014; Nakase et al., 2007; Richard et al., 2005).

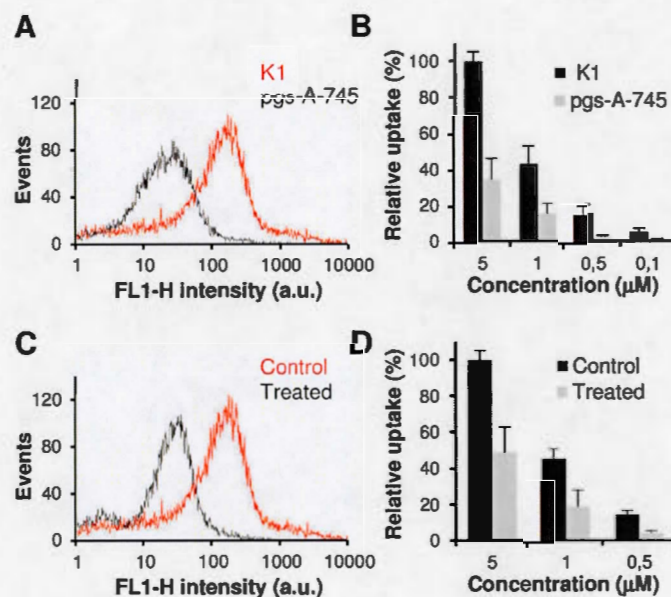


Figure 3.2 Role of cell surface glycosaminoglycans in PACAP cellular uptake. (A) Representative flow cytometry histograms showing cellular uptake of 1 μM PACAP in CHO-K1 (red) and CHO pgs-A-745 (black) cells. (B) Cellular uptake of PACAP by CHO-K1 and CHO pgs-A-745 cells. (C) Representative flow cytometry histograms showing cellular uptake of 1 μM PACAP in CHO-K1 cells treated with 8 U/mL heparinase (black) and non-treated control cells (red). (D) Cellular uptake of PACAP by CHO-K1 treated or not with 8 U/mL heparinase. (B, D) Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M.) of gated cells from at least 3 individual experiments and results are expressed as a percentage of the median fluorescence for 5 μM PACAP in CHO-K1 cells. (A, B, C, D) Cells were incubated for 1h at 37°C in 5 % CO₂ with fluorescein-PACAP, washed twice in HBSS, treated with 100 μg/mL heparin for 5 min, detached by trypsin treatment, washed by centrifugation and resuspended in ice-cold sorting buffer before flow cytometry analysis.

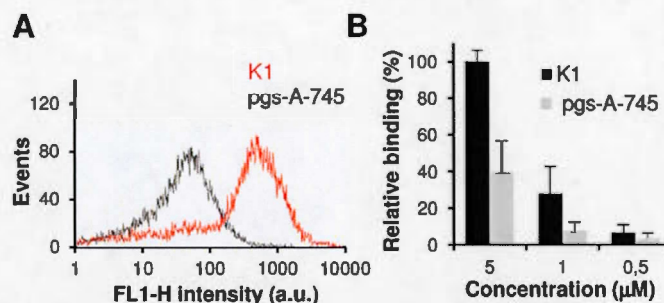


Figure 3.3 Role of Cell surface glycosaminoglycans in PACAP binding to the cell surface. (A) Representative flow cytometry histograms showing membrane binding at 4 °C of 1 μ M PACAP on CHO-K1 (red) and CHO pgs-A-745 (black) cells. (B) Membrane binding at 4°C of PACAP on CHO-K1 and CHO pgs-A-745 cells. Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M.) of gated cells from at least 3 individual experiments and results are expressed as a percentage of the median fluorescence for 5 μ M PACAP38 in CHO-K1 cells. (A, B) Pre-chilled cells were incubated for 15 min at 4°C with fluorescein-PACAP, washed 3 times with ice-cold HBSS, detached mechanically with a cell scraper, washed by centrifugation at 4°C and resuspended in ice-cold sorting buffer before flow cytometry analysis.

3.4.2 Conformational conversion of PACAP upon binding to heparin

PACAP exhibits mainly a random coil conformation in aqueous solution while it readily adopts an α -helix in the presence of DPC micelles (Bourgault et al., 2008; Bourgault et al., 2009; Wray et al., 1993). By CD spectroscopy, the far-UV spectra of PACAP in absence of heparin exhibited a single minimum at 200 nm characteristic of a random coil structure, although signals around 210-220 nm indicate a slight contribution of ordered secondary structure (**Figure 3.4**). In contrast, in the presence of 12.5 and 50 μ M heparin, CD spectra displayed two negative minima at 208 and 222 nm and a positive maximum at 192 nm, indicative of a helical conformation (**Figure 3.4**). At 3.125 μ M heparin, the CD signal was weak and somewhat unclear, most likely because of light scattering produced by the formation of large particles that could be observed by visual inspection. These data suggest that heparin acts as a molecular anionic surface for the conformational conversion of PACAP.

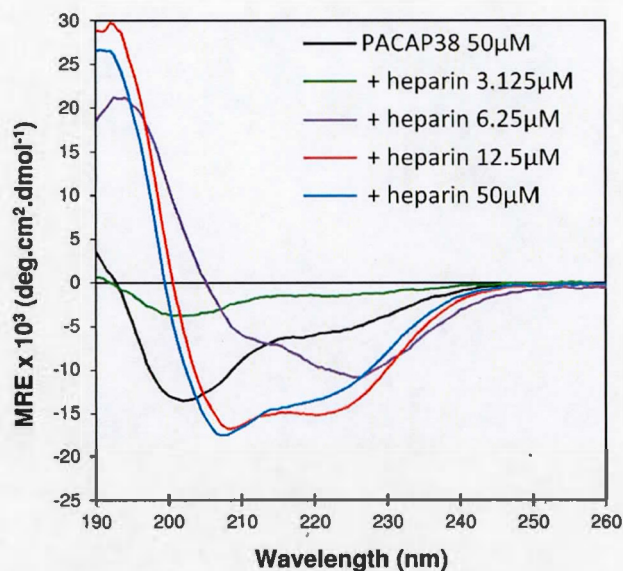


Figure 3.4 conformational conversion of PACAP upon binding to heparin. Circular dichroism spectra of PACAP (50 μM) in absence or in presence of increasing concentrations of heparin (3.125 to 50 μM). Buffer in all experiments is 20 mM phosphate, 100 mM NaF, pH 7.4 and temperature was set at 25 $^{\circ}\text{C}$.

3.4.3 Role of conformational conversion in PACAP cellular uptake

This random coil-to- α -helix conformational conversion upon PACAP binding to sulfated GAGs has been previously reported for the cationic lytic peptide melittin (Klocek and Seelig, 2008) and for analogs of the CPP penetratin (Bechara et al., 2013). However, the contribution of this structural change in the uptake of cationic CPPs has not been addressed so far. Thus, we investigated this issue by designing two PACAP analogs in which two or three pairs of adjacent residues were substituted with their corresponding D-enantiomers. Double D-substitutions introduced in the putative helical region of PACAP should result in disturbance of the α -helix, without modifying other properties of the peptide such as hydrophobicity and net charge (Wieprecht et al., 1996).

Considering that the α -helix in structure-induced milieu spans from Thr⁷ to the C-terminal end (Sze et al., 2007), we introduced the D,D successive substitutions in positions 11-12 and 23-24 (D4-PACAP) as well as in positions 11-12, 23-24 and 33-34 (D6-PACAP) to disrupt the formation of a α -helix induced by heparin. By CD spectroscopy, D4-PACAP and D6-PACAP exhibited mainly a random coil conformation in absence or in presence of heparin with spectra exhibiting a single minimum fluctuating between 200 and 205 nm (**Figure 3.5A**, **Figure 3.5B**). To confirm that the incapacity of these two D,D-residue containing analogs to switch into helical conformation was not the result of a lower binding affinity towards the sulfated GAG, we initially performed affinity chromatography. D4-PACAP and D6-PACAP eluted from the heparin-sepharose column approximately at the same NaCl concentration as that of PACAP (**Figure 3.5C**), confirming that these two derivatives bound heparin with a relatively high affinity.

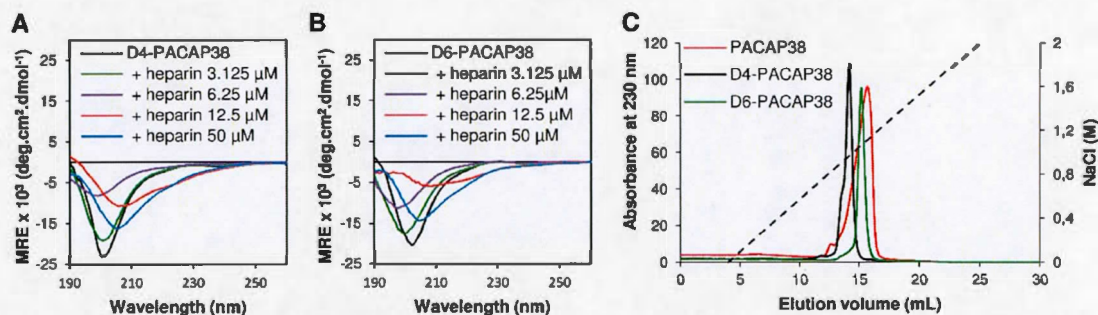


Figure 3.5 Inhibition of heparin-induced conformational transition of PACAP with double-D substitutions. (A, B) Circular dichroism spectra of (A) [D-Ser¹¹, D-Arg¹², D-Leu²³, D-Ala²⁴]PACAP (D4-PACAP) and (B) [D-Ser¹¹, D-Arg¹², D-Leu²³, D-Ala²⁴, D-Gln³³, D-Arg³⁴]PACAP (D6-PACAP) in absence or in presence of increasing concentrations of heparin (3.125 to 50 μM). Buffer in all experiments is 20 mM phosphate, 100 mM NaF, pH 7.4, temperature is 25 °C and peptide concentration is 50 μM. (C) Heparin affinity chromatography of PACAP and its derivatives. Superimposed chromatograms of PACAP (red), D4-PACAP (black) and D6-PACAP (green) elution with increasing NaCl concentration on a sepharose heparin column

connected to a FPLC Aktapure system. Injection of 250 μg of peptides in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) and the flow rate is 0.5 mL/min.

As revealed by affinity chromatography, D4-PACAP and D6-PACAP can bind to heparin to the same extent as PACAP although, as observed by CD spectroscopy, this binding event is not accompanied with the formation of a helical structure. Thus, the role of PACAP random coil-to- α -helix conformational conversion in uptake was assessed by evaluating the endocytosis of fluorescein-labelled D,D derivatives. D4-PACAP and D6-PACAP were significantly less internalized in CHO-K1 cells compared to PACAP with relative cellular uptakes varying between 10 and 20 % of that PACAP (**Figure 3.6A**, **Figure 3.6B**). In contrast, in GAGs-defective pgs-A-745 cells, the uptake efficacies of double D-substituted analogs were ranging between 60 to 80 % of that PACAP (**Figure 3.6C**, **Figure 3.6D**). The relative lower extent of uptake of D,D-derivatives in CHO-K1, in contrast to pgs-A-745, indicates that the α -helix structure is critical for GAGs-mediated endocytosis whereas GAGs-independent internalization is less affected by the locked random coil conformation of PACAP.

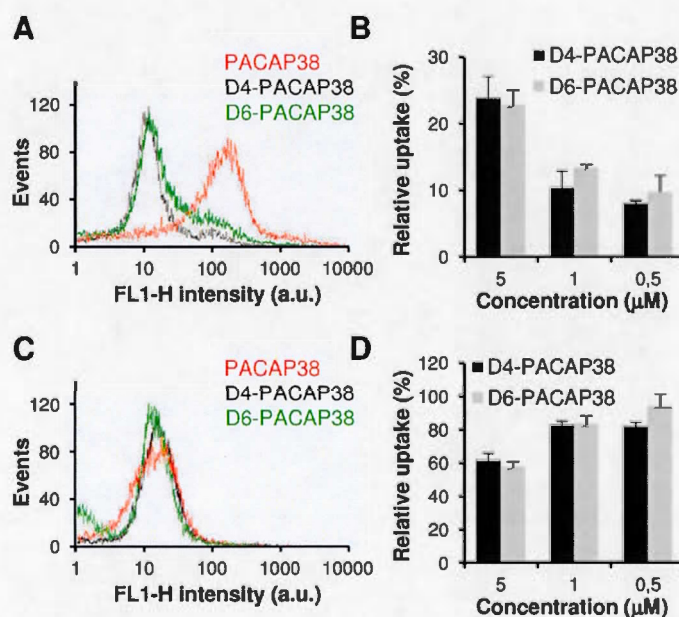


Figure 3.6 Role of PACAP conformational conversion in GAGs-mediated cellular uptake. (A) Representative flow cytometry histograms showing cellular uptake of 1 μ M D4-PACAP38 (black), D6-PACAP (green) or PACAP (red) in CHO-K1 cells. (B) Cellular uptake of PACAP38 and derivatives by CHO-K1 cells. (C) Representative flow cytometry histograms showing cellular uptake of 1 μ M D4-PACAP (black), D6-PACAP (green) or PACAP (red) in CHO pgs-A-745 cells. (D) Cellular uptake of PACAP and derivatives by CHO pgs-A-745 cells. (B, D) Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M.) of gated cells from at least 3 individual experiments and results are expressed as a percentage of the median fluorescence for PACAP used at the same concentration. (A, B, C, D) Cells were incubated for 1h at 37°C in 5 % CO₂ with fluorescein-peptides, washed twice with HBSS, treated with 100 μ g/mL heparin for 5 min, detached by trypsin treatment, washed by centrifugation and resuspended in ice-cold sorting buffer before performing flow cytometry analysis.

While trying to characterize the thermodynamics and binding constants of the interaction of PACAP with sulfated GAGs by isothermal titration calorimetry (ITC), an approach that we routinely used (De Carufel et al., 2013), we were unsuccessful to get a clear calorimetry plot, most likely because of a prompt aggregation event. In fact, we could observe by visual inspection that the heparin solution became turbid upon PACAP addition. It has been previously shown that GAGs clustering plays a pivotal role in the endocytosis of cationic CPPs, such as WR9 (Ziegler and Seelig, 2011) and penetratin (Amand et al., 2012). Therefore, we explored if the lower GAG-dependant cellular uptake of D4-PACAP and D6-PACAP could not be ascribed to a lower capacity to cluster sulfated GAGs. First, we attempted to analyze by dynamic light scattering the formation of molecular heparin-peptide complexes, but this approach was not appropriate as heparin-PACAP clusters aggregated too quickly and to large extent. Consequently, reliable data could not be obtained. Hence, the increase of solution turbidity at 400 nm was monitored upon the titration of the peptide into heparin and *vice versa*. When heparin (1.25 μ L; 100 μ M) was successively titrated into PACAP solution (1 mL; 50 μ M), we observed a rapid increase of turbidity after an initial baseline during the first few injections (**Figure 3.7A, inlet**). Increasing the heparin/peptide ratio to a molar ratio of 0.8 and higher led to a less turbid solution. In

the peptide-into-heparin titration experiment, PACAP solution showed a significant increase of turbidity at a molar ratio of *peptide/heparin*= 2 and higher (**Figure 3.7B**). Interestingly, D4- and D6-PACAP displayed a somewhat similar capacity to that of PACAP to form large particles in the heparin-into-peptide titration experiment. In the peptide-into-heparin titration, the increase of turbidity at 400 nm was faster in the case of PACAP. Nonetheless, it is very unlikely that the slight variation in heparin clustering *in vitro* observed for D4-PACAP and D6-PACAP underlies the pronounced difference in the cellular uptake of these peptides by CHO-K1 cells. Overall, these data indicate that the cellular uptake efficacy of PACAP does not necessary correlate to its *in vitro* binding to sulfated GAGs and/or GAGs clustering capacity. Instead, we showed that the conformational transition of a natively disordered cationic CPP is crucial for GAG-mediated internalization.

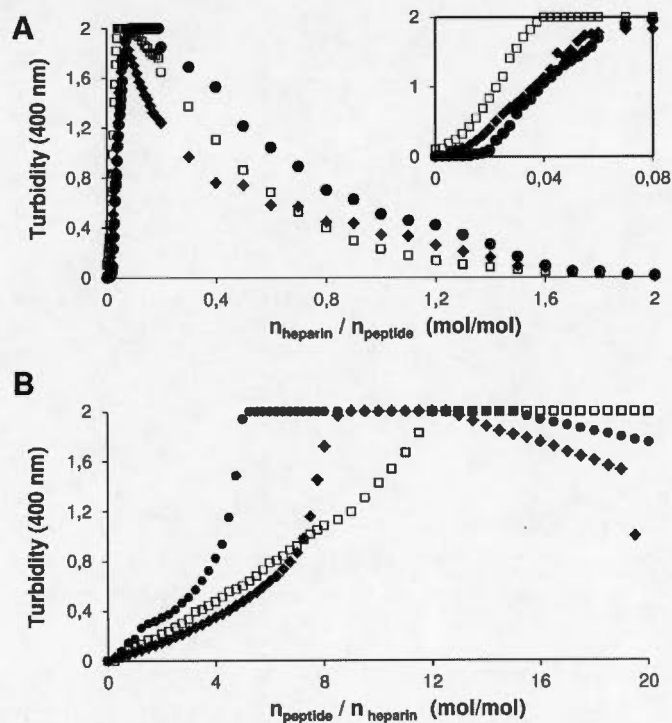


Figure 3.7 Light scattering showing heparin clustering by PACAP38 and its D,D-derivatives. (A) Titration of heparin into PACAP (●), D4-PACAP (□) or D6-PACAP

(◆) monitored by turbidity at 400 nm. Each peak corresponds to the injection of 1.25 μL of a 100 μM heparin solution into a 1 mL 50 μM peptide solution. Inset: emphasis on the initial phase of the titration assay. (B) Titration of PACAP (●), D4-PACAP (□) and D6-PACAP (◆) into heparin monitored by turbidity at 400 nm. Each peak corresponds to the injection of 12.5 μL of a 200 μM peptide solution into a 1 mL 10 μM heparin solution. Data are expressed as a function of the heparin/peptide molar ratio (A) or peptide/heparin molar ratio (B). (A, B) All experiment were performed in 20 mM phosphate, 100 mM NaCl, and pH 7.4.

3.5 Discussion

Cell surface GAGs have been shown to interact with relatively high affinity with polycationic peptides (Goncalves et al., 2006; Rullo et al., 2011; Ziegler and Seelig, 2004, 2008) and to contribute significantly to the cellular uptake of CPPs (Amand et al., 2012; Jiao et al., 2009; Nakase et al., 2007; Richard et al., 2005). It was originally hypothesized that the contribution of GAGs in uptake is primarily related to the adsorption of CPPs to the outer leaflet of the plasma membrane through electrostatic interactions (Drin et al., 2003). Over the last decade, several reports have proposed that the capacity of cationic CPPs to cluster GAGs can directly be ascribed to their cell penetrating efficacy (Amand et al., 2012; Nakase et al., 2007; Ziegler and Seelig, 2011). For instance, it was shown that the internalization efficiency of penetratin derivatives correlates directly with their ability to cluster heparin *in vitro* (Amand et al., 2012). On the other hand, it has been recently shown that the cellular uptake efficacy of CPPs derived from the human protein lactoferrin (hLF) does not correlate with the propensity of hLF peptides to cluster HS *in vitro* (Wallbrecher et al., 2014). Instead, the authors found a strong negative correlation between the extent of cellular uptake and the stoichiometry of binding to HS of hLF peptide analogs (Wallbrecher et al., 2014). Thus, although the contribution of cell surface GAGs in the uptake of cationic CPPs is well-recognized, the molecular mechanisms by which proteoglycans facilitate internalization remains unclear (Favretto et al., 2014). Moreover, even if

some studies have reported that the binding of cationic peptides to sulfated GAGs induces the formation of a α -helix (Bechara et al., 2013; Klocek and Seelig, 2008), the role(s) of this conformational shift in GAGs-mediated cellular uptake has not been investigated so far.

Herein, we focused on the mechanism of cellular uptake of PACAP in the context of cell surface GAGs. As previously reported for other cationic CPPs (Amand et al., 2012; Bechara et al., 2013; Favretto et al., 2014; Jiao et al., 2009; Nakase et al., 2007; Richard et al., 2005), we showed here that GAGs play a pivotal role in the internalization of PACAP. It was originally assumed that the chirality and/or secondary structure of cationic CPPs did not play a pivotal role in their uptake efficacy (Jiao et al., 2009). Instead, the number of positively charged residues and their linear disposition were considered as the key factors for efficient internalization. However, it was recently reported that the uptake efficiency of a CPP derived from the hLF protein is dependent on its conformation (Duchardt et al., 2009) and that L-nona-arginine peptide is internalized more efficiently than its all-D-counterpart (Verdurmen et al., 2011). As we observed that PACAP readily adopts a α -helix in presence of heparin, we sought to investigate the role(s) of this heparin-induced conformational conversion in cellular uptake by destabilizing PACAP helical structure. D,D-analogs bound heparin with a relative affinity similar to that observed for PACAP and both peptides were efficient to induce GAGs clustering. Nonetheless, D,D-derivatives were poorly taken up by CHO-K1 cells. In sharp contrast, in GAG-deficient cells, the levels of uptake of D,D-analogs were around 80 % of that PACAP. This indicates that this conformational conversion is essential in GAG-dependent internalization whereas in GAG-independent uptake, the formation of a helical secondary structure is not an absolute prerequisite for cellular uptake. To the best of our knowledge, this is the first report describing a key implication of conformational conversion of a cationic CPP in GAG-mediated endocytosis. It has been recently

shown that the stoichiometry of peptide-HS binding is a key determinant in the uptake efficiency of CPPs (Wallbrecher et al., 2014). Unfortunately, because of the prompt aggregation in the initial phase of PACAP-into-heparin and heparin-into-PACAP titrations, we were unable to determine the binding stoichiometry by ITC. Nevertheless, it is hypothesized that the conformational shift of PACAP modifies the stoichiometry of peptide-GAG binding, resulting in a change in internalization level, an avenue that should be further investigated. Besides, formation of an α -helix triggers the spatial gathering of Arg and Lys side chains and the formation of clusters of positive charges that might tighten GAG-peptide interactions.

Overall, this study emphasizes the promoting roles of cell surface proteoglycans in the endocytosis of cationic CPPs and sheds light on the molecular basis of the high cell penetrating capacity of PACAP. Besides, we demonstrated that the uptake efficiency of a given cationic CPP does not necessarily correlate to its *in vitro* binding to sulfated GAGs and/or to its *in vitro* ability to cluster GAGs. Instead, this report describes that the adoption of an α -helix is a crucial step for GAGs-mediated endocytosis of a cationic CPP. This observation will support the development of CPPs since it is not only GAGs binding/clustering but also peptide conformation that drives the extent of internalization.

REFERENCES

- Al-Taei, S., Penning, N.A., Simpson, J.C., Futaki, S., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., 2006. Intracellular traffic and fate of protein transduction domains HIV-1 TAT peptide and octaarginine. Implications for their utilization as drug delivery vectors. *Bioconjugate chemistry* 17, 90-100.
- Amand, H.L., Rydberg, H.A., Fornander, L.H., Lincoln, P., Norden, B., Esbjorner, E.K., 2012. Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochimica et biophysica acta* 1818, 2669-2678.
- Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y., Burlina, F., Alves, I.D., Lequin, O., Sagan, S., 2013. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 738-749.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., Esko, J.D., 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446, 1030-1037.
- Bourgault, S., Chatenet, D., Wurtz, O., Doan, N.D., Leprince, J., Vaudry, H., Fournier, A., Vaudry, D., 2011. Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Current pharmaceutical design* 17, 1002-1024.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Guilhaudis, L., Raoult, E., Couvineau, A., Laburthe, M., Segalas-Milazzo, I., Vaudry, H., Fournier, A., 2008. Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *Journal of molecular neuroscience : MN* 36, 260-269.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Segalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., Fournier, A., 2009. Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *Journal of medicinal chemistry* 52, 3308-3316.
- Bradshaw, A.C., Parker, A.L., Duffy, M.R., Coughlan, L., van Rooijen, N., Kahari, V.M., Nicklin, S.A., Baker, A.H., 2010. Requirements for receptor engagement

- during infection by adenovirus complexed with blood coagulation factor X. *PLoS pathogens* 6, e1001142.
- De Carufel, C.A., Nguyen, P.T., Sahnouni, S., Bourgault, S., 2013. New insights into the roles of sulfated glycosaminoglycans in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and cytotoxicity. *Biopolymers* 100, 645-655.
- Doan, N.D., Chatenet, D., Letourneau, M., Vaudry, H., Vaudry, D., Fournier, A., 2012a. Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 940-949.
- Doan, N.D., Letourneau, M., Vaudry, D., Doucet, N., Folch, B., Vaudry, H., Fournier, A., Chatenet, D., 2012b. Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 163, 256-265.
- Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A.R., Temsamani, J., 2003. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *The Journal of biological chemistry* 278, 31192-31201.
- Duchardt, F., Ruttekolk, I.R., Verdurmen, W.P., Lortat-Jacob, H., Burck, J., Hufnagel, H., Fischer, R., van den Heuvel, M., Lowik, D.W., Vuister, G.W., Ulrich, A., de Waard, M., Brock, R., 2009. A cell-penetrating peptide derived from human lactoferrin with conformation-dependent uptake efficiency. *The Journal of biological chemistry* 284, 36099-36108.
- Esko, J.D., Stewart, T.E., Taylor, W.H., 1985. Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 3197-3201.
- Esko, J.D., Weinke, J.L., Taylor, W.H., Ekborg, G., Roden, L., Anantharamaiah, G., Gawish, A., 1987. Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. *The Journal of biological chemistry* 262, 12189-12195.
- Favretto, M.E., Brock, R., 2014. Stereoselective Uptake of Cell-Penetrating Peptides is Conserved in Antisense Oligonucleotide Polyplexes. *Small*.
- Favretto, M.E., Wallbrecher, R., Schmidt, S., van de Putte, R., Brock, R., 2014. Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players? *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 180, 81-90.

- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y., 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of biological chemistry* 276, 5836-5840.
- Goncalves, E., Kitas, E., Seelig, J., 2006. Structural and thermodynamic aspects of the interaction between heparan sulfate and analogues of melittin. *Biochemistry* 45, 3086-3094.
- Gump, J.M., June, R.K., Dowdy, S.F., 2010. Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *The Journal of biological chemistry* 285, 1500-1507.
- Hoare, S.R., 2005. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug discovery today* 10, 417-427.
- Jiao, C.Y., Delarochette, D., Burlina, F., Alves, I.D., Chassaing, G., Sagan, S., 2009. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *The Journal of biological chemistry* 284, 33957-33965.
- Jones, A.T., Sayers, E.J., 2012. Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161, 582-591.
- Kaplan, I.M., Wadia, J.S., Dowdy, S.F., 2005. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 102, 247-253.
- Klocek, G., Seelig, J., 2008. Melittin interaction with sulfated cell surface sugars. *Biochemistry* 47, 2841-2849.
- Milletti, F., 2012. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug discovery today* 17, 850-860.
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., Nairn, A.V., 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 448-462.
- Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., Futaki, S., 2007. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* 46, 492-501.

- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., Chernomordik, L.V., 2005. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *The Journal of biological chemistry* 280, 15300-15306.
- Rullo, A., Qian, J., Nitz, M., 2011. Peptide-glycosaminoglycan cluster formation involving cell penetrating peptides. *Biopolymers* 95, 722-731.
- Sze, K.H., Zhou, H., Yang, Y., He, M., Jiang, Y., Wong, A.O., 2007. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology* 148, 5042-5059.
- Tunnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R.M., Stockl, M., Herrmann, A., Cardoso, M.C., 2008. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 14, 469-476.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K., Hashimoto, H., Galas, L., Vaudry, H., 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological reviews* 61, 283-357.
- Verdurmen, W.P., Bovee-Geurts, P.H., Wadhvani, P., Ulrich, A.S., Hallbrink, M., van Kuppevelt, T.H., Brock, R., 2011. Preferential uptake of L- versus D-amino acid cell-penetrating peptides in a cell type-dependent manner. *Chemistry & biology* 18, 1000-1010.
- Verdurmen, W.P., Wallbrecher, R., Schmidt, S., Eilander, J., Bovee-Geurts, P., Fanghanel, S., Burck, J., Wadhvani, P., Ulrich, A.S., Brock, R., 2013. Cell surface clustering of heparan sulfate proteoglycans by amphipathic cell-penetrating peptides does not contribute to uptake. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 170, 83-91.
- Wallbrecher, R., Verdurmen, W.P., Schmidt, S., Bovee-Geurts, P.H., Broecker, F., Reinhardt, A., van Kuppevelt, T.H., Seeberger, P.H., Brock, R., 2014. The stoichiometry of peptide-heparan sulfate binding as a determinant of uptake efficiency of cell-penetrating peptides. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 2717-2729.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Schumann, M., Krause, E., Beyermann, M., Bienert, M., 1996. Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane

environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement. *Biochemistry* 35, 10844-10853.

Wray, V., Kakoschke, C., Nokihara, K., Naruse, S., 1993. Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32, 5832-5841.

Ziegler, A., Seelig, J., 2004. Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophysical journal* 86, 254-263.

Ziegler, A., Seelig, J., 2008. Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds. *Biophysical journal* 94, 2142-2149.

Ziegler, A., Seelig, J., 2011. Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide WR9. *Biochemistry* 50, 4650-4664.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Secondary conformational conversion is involved in glycosaminoglycans-mediated cellular uptake of the cationic cell-penetrating peptide PACAP.

Armelle Tchoumi Nerée^{a,b}, Phuong Trang Nguyen^{a,b}, David Chatenet^c, Alain

Fournier^c and Steve Bourgault^{a,b*}

^a*Department of Chemistry, Pharmaqam, University of Québec in Montreal, Montreal, QC, Canada, H3C 3P8*

^b*Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, PROTEO*

^c*INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies, Laval, Qc, Canada, H7V 1B7*

Supplementary Materials and Methods

Peptide synthesis, purification and characterization:

All peptides were synthesized on a Tribute peptide synthesizer (Protein Technologies) with standard Fmoc chemistry using 2-(6-chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate (HCTU) as a coupling reagent and diisopropylethylamine (DIEA) as a base. For fluorescein labeling, Fmoc-Ahx-OH was first coupled at the N-terminus of each peptidyl-resin. After Fmoc removal, a solution containing fluorescein isothiocyanate (FITC; 3 eq.), triethylamine (TEA; 3 eq.) in DCM:DMF (1:1) was added to the reaction vessel and was allowed to react overnight at room temperature. FITC coupling was monitored using the ninhydrin test. Peptides were cleaved from the resin using a mixture of trifluoroacetic acid (TFA):ethanedithiol:phenol:water (92:2.5:3:2.5; v/v). After filtration and evaporation of the cleavage mixture, peptides were precipitated and washed with diethylether, solubilized in water and lyophilized. Crude peptides were purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a preparative Luna C₁₈ column (250 mm x 21.2 mm; 5µm, 100Å, Phenomenex) using a linear gradient of acetonitrile (ACN) in H₂O/TFA (0.06 % v/v). Collected fractions were analyzed by analytical RP-HPLC using an Aeris peptide XB C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm; 3.6µm, Phenomenex) and by ESI-TOF mass spectrometry. Fractions corresponding to the desired peptides, as confirmed by mass spectrometry, with purity higher than 95 %, as measured by analytical HPLC, were pooled and lyophilized.

Cell culture:

Chinese hamster ovary cells K1 (CHO-K1; obtained from ATCC) and xylosyltransferase deficient cells (Esko et al., 1985) (CHO pgs-A-745; obtained from ATCC) were maintained in Ham's F12 medium supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and antibiotic antimycotic (10 000 UI/ml penicillin, and 10 000 UI/mL streptomycin). Cells were maintained as a monolayer at 37°C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air and passaged by trypsinization when the cells reached 70-80 % confluence.

Peptide uptake:

CHO-K1 and CHO pgs-A-745 were seeded in 12-well plates at a density of 30 000 cells/well for 48 hours to approximately 75 % confluence. After removing the culture media, cells were incubated in 1 % FBS Ham's F12 medium (supplemented with glutamine and antibiotic/antimycotic) in presence of different concentrations of fluorescein-labelled peptide for 1 h at 37°C and 5 % CO₂. The time of incubation was defined according to our previous study showing that the maximum uptake was obtained upon a 1 h incubation (Doan et al., 2012a). After incubation, cells were washed twice with HBSS buffer, treated for 5 min at room temperature with 100 µg/mL heparin in HBSS to remove the excess of peptide bound to the cell surface (Al-Taei et al., 2006; Kaplan et al., 2005), washed once again with HBSS and detached by trypsinization (5 min) at 37 °C. Trypsin action was stopped by the addition of complete Ham's F12 media supplemented with 10 % FBS and cells were centrifuged for 5 min at 400 x g. Cells were resuspended in 500 µL ice-cold sorting buffer (Ca/Mg free PBS, 1 mM EDTA, 25 mM HEPES, 1 % FBS) and kept on ice

until flow cytometry analysis. For heparinase treatment, CHO-K1 cells were seeded in 12-well plates at a density of 30 000 cells/well. After a 24 h incubation, cells were treated overnight with 8 UI/mL of heparinase (heparinase I/III blend from flavobacterium heparinum, Sigma-Aldrich) in 1 % FBS Ham's F12 medium (supplemented with glutamine and antibiotic/antimycotic). One hour before cell treatment with FITC-peptide, 8 UI/mL of heparinase was added to the cell media and experiment were performed as above-described.

Membrane binding:

Cell surface adsorption was assessed using a protocol adapted from Gump *et al.* (Gump *et al.*, 2010). Briefly cells were seeded as described above and after 48 h incubation at 37°C and 5 % CO₂, cells were incubated on ice at 4°C for 10 min. After removing the culture media, cells were incubated in ice-cold 1 % FBS Ham's F12 medium (supplemented with glutamine and antibiotic/antimycotic) in presence of different concentrations of fluorescein-labelled peptide for 15 min at 4°C to block active endocytic uptake. Cells were then washed 3 times with ice-cold HBSS and detached manually with a cell scraper. Cells were centrifuged for 5 min at 400 x g at 4°C before being resuspended in 500 µL ice-cold sorting buffer and kept on ice until flow cytometry analysis. All flow cytometry analyses were performed using a FACS Calibur instrument (BD Biosciences) and a minimum of 10 000 gated cells per sample were analyzed. The fluorescein-peptide was excited at 488 nm and emission was measured through a 530 nm filter. Data analysis was performed with the WinMDI software (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry).

Affinity chromatography:

The relative binding affinity of the peptides for sulfated GAGs was evaluated using a 1 mL HiTrap Heparin HP column packed with Sepharose and immobilized heparin from porcine intestinal mucosa (GE Healthcare). The column was connected to a FPLC AktaPure system (GE Healthcare) and equilibrated with phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) prior to injection. A volume of 500 μ L of 0.5 mg/mL peptide solutions was injected at a flow rate of 0.5 mL/min. After injection, the elution consisted of an isocratic step of 5 mL phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) followed by a gradient from 0 to 2 M NaCl in phosphate buffer (pH 7.4). Peptide elution was monitored using absorbance at 230 nm.

Circular dichroism spectroscopy:

Far-ultraviolet circular dichroism (CD) spectra were recorded at room temperature using a Jasco J-810 CD spectrometer (Jasco). Peptide solutions, without or with increasing concentrations of heparin (from porcine intestinal mucosa) were prepared in phosphate buffer (20 mM, 100 mM NaF, pH 7.4). All spectra were measured from 260 to 190 nm and were corrected by subtracting the appropriate blank solution (with or without heparin). A 1 mm path length quartz cuvette was used.

Clustering measured by turbidity:

The formation of macromolecular GAG-peptide clusters was monitored by measuring the light scattering at 400 nm using a 100 Bio Cary UV-visible spectrophotometer (Varian). Briefly, for the heparin-into-peptide titration, a 1 cm length quartz cuvette was filled with 1 mL of a 50 μ M peptide solution (20 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.4) and 1.25 μ L aliquots of a 100 μ M heparin solution (20 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.4) were successively added. The solution was gently

vortexed and the turbidity at 400 nm was immediately measured. For the peptide-into-heparin titration, a 1 cm length quartz cuvette was filled with 1 mL of a 10 μ M heparin solution (20 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.4) and 12.5 μ L aliquots of a 200 μ M peptide solution (20 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, pH 7.4) were successively added. The solution was gently vortexed and the turbidity at 400 nm was immediately measured. Data were expressed as solution turbidity at 400 nm as a function of peptide/heparin or heparin/peptide molar ratio.

REFERENCES

- Al-Taei, S., Penning, N.A., Simpson, J.C., Futaki, S., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., 2006. Intracellular traffic and fate of protein transduction domains HIV-1 TAT peptide and octaarginine. Implications for their utilization as drug delivery vectors. *Bioconjugate chemistry* 17, 90-100.
- Doan, N.D., Chatenet, D., Letourneau, M., Vaudry, H., Vaudry, D., Fournier, A., 2012. Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 940-949.
- Esko, J.D., Stewart, T.E., Taylor, W.H., 1985. Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 3197-3201.
- Gump, J.M., June, R.K., Dowdy, S.F., 2010. Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *The Journal of biological chemistry* 285, 1500-1507.
- Kaplan, I.M., Wadia, J.S., Dowdy, S.F., 2005. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 102, 247-253.

CHAPITRE IV

GLYCOSAMINOGLYCAN MEDIATE PLASMA MEMBRANE ADSORPTION OF PEPTIDES OF THE SECRETIN/GLUCAGON/GHRH SUPERFAMILY

RESUME

L'hypothèse de la catalyse membranaire stipule qu'un ligand peptidique active son récepteur spécifique après avoir initialement interagit avec la membrane plasmique. Dans le passé de nombreuses études ont décrit les lipides de la membrane plasmique comme les seules composantes impliquées. Or l'environnement membranaire est très complexe et comprend diverses macromolécules anioniques constituées majoritairement de glycosaminoglycanes (GAGs). Les GAGs sont des polymères linéaires de polysaccharides. Ils sont impliqués dans les fonctions biologiques de diverses molécules de signalisation telles que les cytokines et les facteurs de croissances. Toutefois, le rôle des GAGs dans l'activité biologique des hormones peptidiques reste jusqu'à date non clarifié. De ce fait, en combinant des approches biophysiques et biologiques, nous avons étudié dans le cadre de ce projet, le rôle des GAGs dans l'adsorption membranaire des peptides cationiques. L'absence de GAGs à la surface des cellules CHO régule négativement l'adsorption membranaire des hormones. Or en présence de CHO-K1, l'adsorption se fait dépendamment des GAGs. Parallèlement des études spectroscopiques de l'interaction peptide – GAG montrent l'importance d'un épitope antigénique dans l'attachement aux GAGs. En présence d'un motif «*heparin binding domain*», l'affinité des hormones pour les GAGs est comparable à celle des chemokines. De plus, la fixation des peptides à différentes concentrations d'héparine (1.5-50 μ M) induit la conversion du peptide en une conformation bioactive. Cette conversion est inhibée lorsque des résidus de configuration L du segment antigénique sont substitués par ceux de configuration D. La destabilisation du motif «*heparin binding domain*», entraîne également l'inhibition de l'adsorption membranaire des peptides. Nos résultats montrent que la distribution spatiale des résidus basiques des hormones peptidique appartenant à la superfamille glucagon/sécrétine/GHRH joue un rôle clé dans leur attachement à la surface membranaire ; suggérant que les GAGS situés à la membrane plasmique seraient impliqués *i)* dans l'adsorption initiale des peptides cationiques à la membrane cellulaire, *ii)* dans la présentation de ces ligands à leur récepteur spécifique et *iii)* dans la régulation de leurs fonctions biologiques.

AVANT PROPOS

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Concernant les travaux réalisés et qui ont concourus à la publication de cet article, Armelle T. N., Mathieu L.W. et Nguyen P.T. ont réalisé les expérimentations en laboratoire et l'analyse des données. Armelle T. N. a également rédigé la version initiale du manuscrit. Le Professeur Steve B. a supervisé les travaux du projet et a corrigé le manuscrit.

Glycosaminoglycans Mediate Plasma Membrane Adsorption of Peptides of the Secretin/Glucagon/GHRH Superfamily

Armelle Tchoumi Nerée^{a,b}, Mathieu Laporte Wolwertz^{a,b}, Phuong Trang Nguyen^{a,b}
and Steve Bourgault^{a,b*}

^a*Department of Chemistry, Pharmaqam, University of Québec in Montreal, Montreal, QC, Canada, H3C 3P8*

^b*Quebec Network for Research on Protein Function, Structure, and Engineering, PROTEO*

Article en préparation pour BBA Biomembrane

***Corresponding author:**

Pr. Steve Bourgault,
Université du Québec à Montréal
C.P. 8888, Succursale Centre-Ville
Montréal (Québec), H3C 3P8, Canada
1-514-987-3000 (5161)
bourgault.steve@uqam.ca

4.1 Abstract

The membrane catalysis hypothesis advocates that a peptide ligand activates its cognate cell surface receptor after an initial interaction with the plasma membrane. Upon adsorption to the cell surface, the peptide undergoes a conformational transition that favors receptor binding. Whereas most attention has been given to the lipidic components of the membrane, the outer leaflet of the cell surface is complex and is constituted of a variety of macromolecules, including glycosaminoglycans (GAGs). Although these long linear polysaccharides are known to mediate the activities of signalling molecules, including cytokines and growth factors, nothing is known about the contribution of GAGs in the membrane adsorption of cationic peptidic hormones. In this context, by combining biological and biophysical approaches, we probed the interaction of peptides from the secretin/glucagon/GHRH superfamily with GAGs and its roles in membrane adsorption. By flow cytometry and confocal microscopy, we observed that CHO-pgs-A-745 cells, which are deficient in GAG biosynthesis, adsorbed less fluorescein-labelled peptides compared to CHO-K1 cells. Peptide-GAG interactions were studied by affinity chromatography and isothermal titration calorimetry and revealed that these ligands have a strong affinity for sulfated GAGs. By designing secretin derivatives with restricted conformational ensemble, we observed that the spatial distribution of basic residues, rather than simply the cationic nature of the peptide, constitutes a key element for high affinity binding. This study suggests that cell surface GAGs participate in the initial adsorption of these peptides to the cell surface and, perhaps, could present the peptide to cell surface receptor.

Keywords:

Peptide hormones; Plasma membrane; Glycosaminoglycans; Secondary structure; Secretin/Glucagon/GHRH Superfamily.

4.2 Introduction

The regulation of the activation level of numerous plasma membrane receptors plays key physiological roles and these proteins constitute the target of over 50 % of the drugs currently used in the clinic (Overington et al., 2006). The conformational state of membrane receptor is modulated by the binding of numerous ligands of a wide variety of chemical identity, from photons to large proteins and from small organic molecules to peptides (Gether, 2000). Several G-protein coupled receptors (GPCRs), the most abundant membrane-bound signaling receptors, are activated by the binding of peptide ligands, such as glucagon and oxytocin (Fredriksson et al., 2003). These peptides bind to their cognate receptors with very high affinity, with dissociation constant in the low nanomolar range or often lower. The peptidic ligand-receptor binding reaction is often ascribed as multiple sequential steps, involving cell surface accumulation of the peptide, ligand-membrane interaction and ultimately binding to the receptor (Langelaan and Rainey, 2010). This model originally proposed by Sargent and Schwyzer in 1986 (Sargent and Schwyzer, 1986), known as the membrane catalysis hypothesis, is still applied today to describe the sequential mechanisms of the activation of a membrane bound receptor by a peptide ligand (Bourgault et al., 2011; Bourgault et al., 2009; Langelaan and Rainey, 2010). The central hypothesis of the membrane catalysis model is that a peptidic ligand interacts with the plasma membrane before binding to its receptor. This model is characterized by several key elements. First, a peptide ligand is more likely to bind first to the outer leaflet of the membrane, in which the receptor is embedded, rather than directly to the receptor as the receptor occupies a very small surface area. This initial membrane binding event will drastically amplify the local concentration, increasing the rate of receptor activation (Sargent and Schwyzer, 1986). Moreover, upon adsorption to the cell surface, ligand diffusion to its

cognate receptor becomes two-dimensional instead of three-dimensional, increasing peptide-receptor binding rates. Besides, upon binding to the lipid bilayer, the membrane environment triggers a conformational conversion of peptide structure closely related to its bioactive conformation, as inferred from numerous structure-activity relationship studies (Hoare, 2005; Inooka et al., 2001). Thus, the lipid-induced conformation is proposed to facilitate, or to prime, peptide recognition by the receptor.

Although several experimental evidence supports this model (Sargent and Schwyzer, 1986), the membrane catalysis hypothesis considers the plasma membrane as a simple anionic lipid bilayer and does not take into account the high heterogeneity, the dynamics and the complexity of the membrane environment. Eukaryotic cell surface are decorated with a diversity of macromolecules, including a high density of (glyco)proteins and proteoglycans. Proteoglycans are ubiquitously expressed on the membrane and consist of highly-glycosylated membrane proteins comprising a protein core with covalently attached glycosaminoglycan (GAG) chain(s). GAGs are long, linear and heterogeneous polysulfated polysaccharides. The basic subunit of a GAG is a disaccharide and chain lengths can reach up to 25000 disaccharides (Handel et al., 2005). Heparan sulfate (HS) is the most abundant cell surface GAG. The negatively charged sulfate groups on HS are known to mediate interactions with a variety of proteins, including chemokines, cytokines and growth factors (Handel et al., 2005). Increasing biochemical and pharmacological evidence indicates that HS plays an integral role in the signaling pathways mediated by these molecules (Johnson et al., 2005). Although the contribution of sulfated GAGs in modulating of the activity of a variety of signaling proteins, often as co-receptors, has been documented over the last decade, nothing is known about the roles of GAGs in the membrane adsorption and

activity of several classes of peptide hormones.

Class B GPCRs constitute a small and highly homogenous group of membrane receptors that regulate key (neuro)endocrine functions and represent attractive therapeutic and diagnostic targets (Hoare, 2005; Vaudry et al., 2009). The 15 known class B GPCRs are endogenously activated by large, often strongly cationic, linear peptide hormones, containing 27 to 84 residues (Chapter et al., 2010). These peptide ligands include members of the secretin/glucagon/GHRH superfamily and members of the calcitonin family. Owing to their cationic and flexible nature, peptide ligands of class B GPCRs can bind electrostatically to various anions located on the outer leaflet of eukaryotic cell membrane, including GAGs. Particularly, sequence analysis or two-dimensional projection of their environment-induced α -helix revealed that the majority of class B GPCR ligands comprise a consensus heparin-binding motif (XBBXB_X; in which B is a basic amino acid), distributed either sequentially or spatially upon helical folding, suggestive of GAG-peptide interactions. However, the contribution of GAGs in peptide adsorption to the plasma membrane has never been explored so far for these peptides.

In this context, we evaluated the roles of cell surface GAGs in plasma membrane adsorption of representative members of the secretin/glucagon/GHRH superfamily. By means of a GAG-deficient cell line, we observed that binding to the cell surface is strongly dependent of the presence of GAGs. By combining biophysical and chemical approaches, we probed the thermodynamics of peptide-GAG interactions and the specificity of these interactions. These results provide novel evidence for an involvement of HS in the activity of these peptide hormones and suggest that the membrane

catalysis hypothesis could be ultimately revisited in order to take into account cell surface GAGs.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Peptide synthesis

All peptides were synthesized on a Tribute peptide synthesizer (Protein Technologies) with standard Fmoc chemistry using 2-(6-chloro-1-H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium hexafluorophosphate (HCTU) as a coupling reagent and diisopropylethylamine (DIEA) as a base. Deprotection used 20 % piperidine in DMF. For fluorescein labeling, Fmoc-Ahx-OH was first coupled at the N-terminus of each peptidyl-resin. After Fmoc removal, a solution containing fluorescein isothiocyanate (FITC; 3 eq.), triethylamine (TEA; 3 eq.) in DCM:DMF (1:1) was added to the reaction vessel and was allowed to react overnight. FITC coupling was monitored using the ninhydrin test. Peptides were cleaved from the resin using a mixture of trifluoroacetic acid (TFA):ethanedithiol:phenol:water (92:2.5:3:2.5; v/v). After filtration and evaporation of the cleavage mixture, peptides were precipitated and washed with diethylether, solubilized in water and lyophilized. Crude peptides were purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a preparative Luna C₁₈ column (250 mm x 21.2 mm; 5 μ m, 100Å, Phenomenex) using a linear gradient of acetonitrile (ACN) in H₂O/TFA (0.06 % v/v). Collected fractions were analyzed by analytical RP-HPLC using an Aeris peptide XB C₁₈ column (150 mm x 4.6 mm; 3.6 μ m, Phenomenex) and by ESI-TOF mass spectrometry. Fractions corresponding to the peptidic hormone, as confirmed by mass spectrometry, with purity higher than 95 %, as measured by analytical HPLC, were pooled and lyophilized.

4.3.2 Cell culture

Chinese hamster ovary cells K1 (CHO-K1; obtained from ATCC) and xylosyltransferase deficient cells (CHO pgs-A-745; obtained from ATCC) were

maintained in Ham's F12 medium supplemented with 10 % foetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and antibiotic antimycotic (10 000 UI/ml penicillin, and 10 000 UI/mL streptomycin). Cells were maintained as a monolayer at 37°C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air and passaged by trypsinization when the cells reached 70-80 % confluence.

4.3.3 Peptide membrane adsorption

Cell surface adsorption was assessed using a protocol adapted from Gump et al. (Gump et al., 2010). CHO-K1 and CHO pgs-A-745 were seeded in 12-well plates at a density of 30000 cells/well for 48 hours to approximately 75 % confluence. After removing the culture media, cells were incubated in 1 % FBS Ham's F12 medium (supplemented with glutamine and antibiotic/antimycotic) in the presence of different concentrations of fluorescein-labelled peptide for 15 min at 4°C. After incubation, cells were washed twice with HBSS buffer and detached manually in 0.5 mL of complete Ham's F12 media supplemented with 10 % FBS and cells were centrifuged for 5 min at 400x g. Cells were suspended in 500 µL ice-cold sorting buffer (Ca/Mg free PBS, 1 mM EDTA, 25 mM HEPES, 1 % FBS) and kept on ice until flow cytometry analysis.

4.3.4 Confocal microscopy

CHO-K1 and CHO pgs-A-745 were seeded on coverslip placed in 6-well plates at a density of 30 000 cells/well for 48 hours to reach approximately 75 % confluence. After removing the culture media, cells were incubated in 1 % FBS Ham's F12 medium (supplemented with glutamine and antibiotic/antimycotic) in the presence of different concentrations of fluorescein-labelled peptide as described above for the peptide adsorption. After incubation, cells were washed twice with PBS buffer and fixed with formaldehyde during 10 min, then wash 3 times with PBS. The actin and nucleus of cells were stain with 1/200 (mL/mL) of Texas-Red-phalloidin and 10 µg/ml of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), respectively. Staining steps were

separated by three successive washing with PBS. A confocal nikon microscopy equipped with a 60x oil immersion objective was used. Images were captured using Nikon imaging software.

4.3.5 Affinity chromatography

The relative binding affinity of the peptides for sulfated GAGs was evaluated using a 1 mL HiTrap Heparin HP column packed with Sepharose and immobilized heparin (GE Healthcare). The column was connected to a FPLC Aktapure system (GE Healthcare) and equilibrated with phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) prior to injection. A volume of 500 μ L of 0.5 mg/mL peptide solutions were injected at a flow rate of 0.5 mL/min. After injection, the elution consisted of an isocratic step of 5 mL phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) followed by a gradient from 0 to 2 M NaCl in phosphate buffer (pH 7.4). Peptide elution was monitored using absorbance at 230 nm.

4.3.6 Circular dichroisme spectroscopy

Far-ultraviolet circular dichroism (CD) spectra were recorded at room temperature using a Jasco J-810 CD spectrometer (Jasco). Peptide solutions, without or with increasing concentrations of heparin (from porcine intestinal mucosa) were prepared in phosphate buffer (20 mM, 100 mM NaF, pH 7.4). All spectra were measured from 260 to 190 nm and were corrected by subtracting the appropriate blank solution (with or without heparin). A 1 mm path length quartz cuvette was used.

4.3.7 Isothermal titration calorimetry

Measurements were performed using a Microcal VP-ITC (GE Healthcare). Lyophilized aliquots of peptides were dissolved in phosphate buffer (pH 7.4) at a final concentration ranging between 50 and 100 μ M just before being injected into the calorimeter cell. Heparin was prepared at a final concentration ranging between 15 to 30 μ M in phosphate buffer (pH 7.4). Titrations were performed by injecting 10

μL of the heparin solution (except for the initial 2 μL injection) into the peptide solution. The temperature was set at 25°C. Heats of dilution were measured by injecting heparin solution into the corresponding buffer and were included in the final analysis. Data analysis was done with the software package (Origin) provided by manufacturer. Data were fit to an independent set of multiple binding sites model.

4.4 Results and discussion

4.4.1 Cell surface glycosaminoglycans promote cellular adsorption of cationic peptides of the secretin/glucagon/GHRH superfamily

It is known that the binding of proteins, such as chemokines, to sulfated GAGs is mediated by electrostatic interactions and that these proteins exhibit the so-called GAG-binding-epitopes, rich in Arg, Lys and, less frequently, His residues (Handel et al., 2005). Thus, as peptide (neuro)hormones from the secretin/glucagon/GHRH superfamily display several cationic residues (**Table 4.1**), we initially probed the roles of GAGs in cell surface adsorption by flow cytometry and confocal microscopy. Peptides were labeled with a fluorescent dye at their N-terminal amine function. Membrane adsorption assay was performed by incubating the pre-chilled cells at 4°C for 15 minutes with FITC-peptides before detaching the cells with non-enzymatic treatment for flow cytometry analysis. For confocal microscopy, cells were extensively washed before being fixed. As previously reported, under these conditions, endocytosis is mostly inhibited and the fluorescence level correlates closely with cell surface binding (Bechara et al., 2013; Gump et al., 2010). To address the roles of GAGs in membrane adsorption of representative members of the secretin/glucagon/GHRH superfamily, we used the CHO-pgs-A-745 cells. These cells are deficient in xylosyl transferase, an enzyme that catalyzes the transfer of a D-xylosyl group to the side chain of a serine, a key step in the synthesis of proteoglycans. Therefore, these cells do not express any GAGs (HS and CS) on the outer leaflet of their plasma membrane (Esko et al., 1985). As observed, by flow cytometry, the pgs-A-745 cells were significantly less effective to their wild type

counterpart (CHO-K1) to adsorb peptides at their surface (**Figure 4.1A, Figure 4.1B**). As a matter of fact, the fluorescent intensity of cells was reduced by 70 % for CHO-pgs-A-745 cells. This effect was observed for concentrations ranging from 1 to 50 μ M, for which peptide adsorption was approximately 2-3 fold higher in CHO-K1 in comparison to GAGs-deficient cells. At concentrations below 0.5 μ M, no significant binding of FITC-peptides could be detected by flow cytometry, except for PACAP38, a peptide hormone with cell penetrating capacity (Doan et al., 2012a; Tchoumi Neree et al., 2014) (data not shown). In fact, GAG-dependent membrane adsorption of the polycationic PACAP38 was around 3-4 fold higher than other peptides used in the present study. Strikingly, all others peptide hormones were adsorbed to the cell surface to similar extent. These results were confirmed by confocal microscopy. As observed in **Figure 4. 1C**, membrane adsorption of 5 μ M FITC-secretin is significantly lower for GAGs-deficient cells.

Table 4.1 Sequence of peptide hormone used in this study

Peptide	Sequence^{a,b}
PACAP38	HSDGIFTDSYS RYRKQ MAV KKY LA AVL GKRYKQ RV KNK
PACAP27	HSDGIFTDSYS RYRKQ MAV KKY LA AVL
VIP	HSDAVFTDNY TRLRKQ MAV KKY LNSILN
Secretin	HSDGTFTSELS RLLREGARLQ RLQGLV
GIP	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAQGFIAWL VKGRG
GLP-1	YAEGTFISDYSIAMD KIHQQ DFVNWLLA QKGK KNDW KHNITQ
Glucagon	HSQGTFTSDYS KYLDS RR AQDFVQWLMNT

^aBasic residues (arginine and lysine) are marked in bold.

^bAll peptides are C-terminally- α -amidated.

We then confirmed these results by performing a competition assay with soluble sulfated GAGs in the culture media. CHO-K1 cells were treated with 100 μ g/mL heparin, used as a model of the sulfated domain of HS, for 5 minutes before being incubated at 4°C for 15 minutes with FITC-secretin. As measured by flow cytometry, the presence of heparin in culture media reduced membrane adsorption of secretin by over 70 % for concentrations ranging from 5 to 50 μ M (**Figure 4.2**). Interestingly, the level of cell surface binding of secretin to CHO-K1 in presence of soluble heparin was equivalent to the level observed for CHO-pgs-A-745 cells, confirming the key role of GAGs in cell surface adsorption.

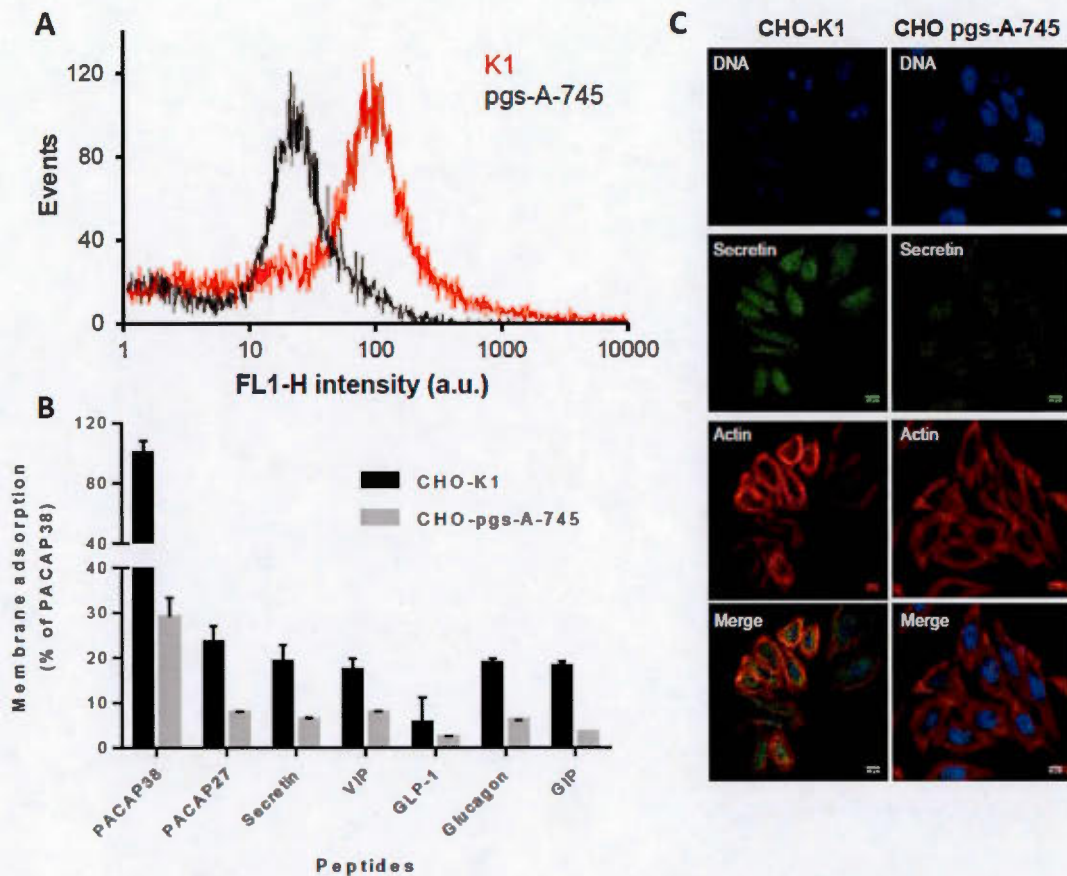


Figure 4.1 Cell surface GAGs mediate plasma membrane adsorption. (A) Representative flow cytometry histograms showing the cellular adsorption of 10 μ M secretin to CHO-K1 (red) and to CHO-pgs-A-745 cells (black). (B) Cellular adsorption of 10 μ M peptide ligands on CHO-K1 (black) and CHO-pgs-A-745 cells (gray). Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M.) of gated cells from at least 3 individual experiments and results are expressed as a percentage of the median fluorescence for 10 μ M PACAP38 on CHO-K1 cells. (A, B) Cells were incubated for 15 min h at 4°C with fluorescently labelled peptides, washed twice with HBSS, detached manually, washed by centrifugation and resuspended in ice-cold sorting buffer before flow cytometry analysis. (C) Representative confocal microscopy images of cellular adsorption of secretin on CHO-KI and CHO-pgs-A-745 cells.

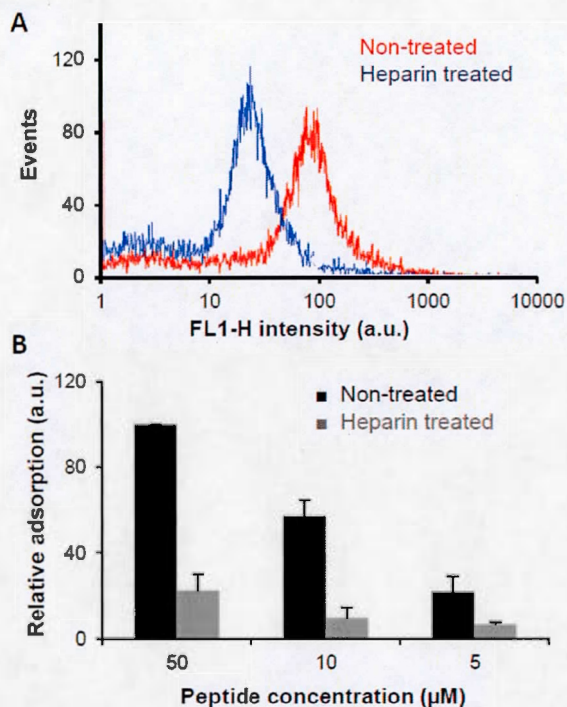


Figure 4.2 Soluble heparin inhibits membrane adsorption of secretin. (A) Representative flow cytometry histograms showing the cellular adsorption of 10 μM secretin to CHO-K1 in absence (red) or in presence of 100 $\mu\text{g/mL}$ heparin (black). (B) Cellular adsorption of secretin on CHO-K1 in absence (black) or in presence of heparin (gray). Data represent the relative mean fluorescence intensity (\pm S.E.M.) of gated cells from at least 3 individual experiments and results are expressed as a percentage of the median fluorescence for 50 μM secretin in absence of heparin. (A, B) Cells were treated with 100 $\mu\text{g/mL}$ heparin for 5 minutes at 4°C, then incubated for 15 min at 4°C with fluorescently labelled peptides, washed twice with HBSS, detached manually, washed by centrifugation and resuspended in ice-cold sorting buffer before flow cytometry analysis.

4.4.2 Affinity for sulfate glycosaminoglycans

The significance of protein-GAG interactions is often initially assessed by studying the binding of proteins, such as chemokines and cytokines, to purified GAGs *in vitro* (Handel et al., 2005). Commonly, the relative affinity of a given polypeptide for sulfated GAGs is measured by affinity chromatography using a heparin-functionalized sepharose column. As the binding of protein to the heparin resin is

mostly mediated by electrostatic interactions, the concentration of NaCl required to elute the protein from the column constitutes a good estimation of the relative affinity towards sulfated GAGs. To confirm the binding of peptides from the secretin/glucagon/GHRH superfamily to sulfated GAGs, we probed the relative affinity of these peptides for GAGs by affinity chromatography. Peptides were injected onto a heparin sepharose column and eluted with a NaCl gradient of 0 to 2 M. surprisingly, secretin, GIP and glucagon showed a higher relative affinity for heparin compared to PACAP38 (**Figure 4.3**), despite their lower content in positive charges (**Table 4.1**). Indeed, secretin and glucagon display 4 and 3 basic residues, respectively, whereas PACAP38 encompasses 4 Arg and 7 Lys. This data indicates that the binding mode of these peptides to heparin is not purely based on electrostatic interactions, suggesting specificity in heparin-secretin and heparin-glucagon interactions. Indeed, although glucagon has only 2 Arg and 1 Lys, this peptide showed the higher relative affinity for heparin among all peptides studied, indicative of a possible contribution of the Arg-Arg motif located at positions 17 and 18. Similarly, while PACAP27 and VIP display a high sequence homology with secretin (**Table 4.1**), they bind relatively weakly to heparin compared to secretin, consistent with the fact that Arg has a higher affinity for sulfated GAGs than lysine (Fromm et al., 1995). Although GLP-1 encompasses 5 Lys residues, this peptide attached weakly to the heparin column (**Figure 4.3**). Above all, the NaCl concentrations needed to elute secretin (1.45 M) and glucagon (1.65 M), were higher to the one reported for the majority of the chemokines, growth factors and cytokines known to interact *in vivo* with sulfated GAGs (Handel et al., 2005). For instance, IL-8 needs a 0.6 M NaCl concentration to be eluted whereas RANTES is eluted at 1.1 M NaCl (Handel et al., 2005) from heparin-functionalized column. In fact, the concentration required to elute all these peptides from the heparin conjugated resin, except for GLP-1, was in the higher range than the ones previously reported for known GAG-binding proteins. Thus, peptides from the secretin/glucagon/GHRH superfamily bind heparin with a

relative affinity higher than most of the cytokines and chemokines known to interact with HS, strongly suggesting a physiological role of these interactions.

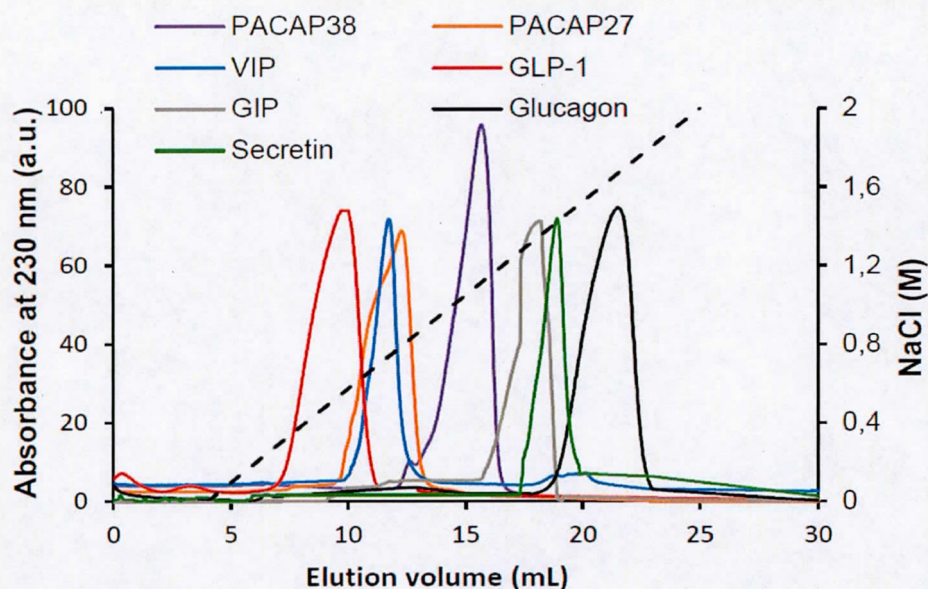


Figure 4.3 Heparin affinity chromatography of cationic peptide hormones. Superimposed chromatograms of PACAP38 (purple), PACAP27 (orange), VIP (blue), GLP-1 (red), GIP (gray), glucagon (black) and secretin (green) elution with increasing NaCl concentration on a sepharose heparin column connected to a FPLC Aktapure system. Injection of 250 μg of peptides in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) and the flow rate is 0.5 mL/min. The NaCl gradient is shown as dashed line.

4.4.3 Thermodynamics of peptide – sulfated GAGs binding

In order to better understand the thermodynamics basis of the high affinity of peptide ligands towards sulfated GAGs and to evaluate their binding affinity, we performed ITC. **Figure 4.4**, top panel, shows a representative calorimetric heat flow trace obtained by the titration of secretin with heparin at 25°C at pH 7.4. Secretin solution (100 μM) was filled in the calorimeter cell and 10 μL of heparin solution (30 μM) were injected every 10 min. The downward direction of the titration peaks indicated that binding of secretin to heparin is an exothermic reaction at 25°C. The reaction

heats represented in the lower panel were obtained by integrating the titration peaks and were corrected for the heats of dilution of heparin into the corresponding buffer. As the concentration of heparin in the calorimeter cell increased, the proportion of unbound secretin decreased and the heats of reaction became smaller. The integrated peaks were fit to a model of independent identical binding sites, where secretin was considered as the ligand. The thermodynamics parameters obtained were an enthalpy of $\Delta H_{\text{peptide}} \approx -7.91$ kcal/mol and an entropy of $\Delta S_{\text{peptide}} \approx -23.3$ cal/mol/deg. This suggests that binding is predominantly enthalpy-driven, most likely through electrostatic interactions, whereas the contribution of entropy is limited. The obtained dissociation constant (K_d) was $0.18 \mu\text{M}$, suggesting high affinity of secretin to heparin at physiological pH and 25°C . The binding stoichiometry (n) was evaluated at 32.4, providing an approximation of the number of secretin molecules bound per heparin molecule, based on an average molecular weight of 17 kDa. All other peptides evaluated bound to heparin predominantly by means of electrostatic interactions with dissociation constants in the low μM range (**Table 4.2**). Binding thermodynamics of PACAP38 to heparin could not be measured because of high extent of aggregation within the calorimetric cell, as previously reported (Tchoumi Neree et al., 2014). Thus, ITC confirmed the high affinity of peptides of the secretin/glucagon/GHRH superfamily towards sulfated GAGs, indicating potential physiological implications.

Table 4.2 Thermodynamic parameters for heparin binding to peptide hormones

Peptide	Binding stoichiometry (n_{peptide})	K_d (μM)	$\Delta H_{\text{peptide}}$ (kcal/mol)	$\Delta S_{\text{peptide}}$ (cal/mol/deg)
PACAP27	17.5	1.48	-8.08	-25.1
VIP	19.6	1.81	-7.46	-25.5
Secretin	32.4	0.18	-7.91	-23.3
GIP	19.6	1.24	-4.23	-21.5
Glucagon	32.4	3.23	-1.48	-4.8
GLP-1	-	-	-	-
PACAP38	-	-	-	-

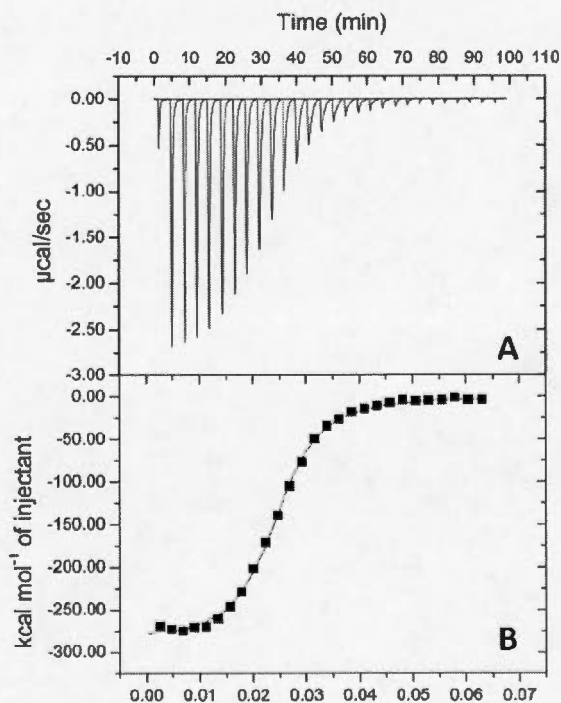


Figure 4.4 Titration of heparin into secretin. (A) Calorimetric trace of reaction obtained at 25°C by the titration of heparin ($30\mu\text{M}$) into a solution of secretin ($100\mu\text{M}$) in 20mM phosphate buffer, $\text{pH } 7.4$. (B) Heats of reaction were integrated from the calorimetric trace and plotted as a function of heparin/secretin molar ratio.

4.4.4 Conformational conversion of PACAP38 upon binding to heparin

One of the key elements of the membrane catalysis hypothesis, is that the lipid bilayer induces a conformational shift of the peptide towards its biologically active conformation, thus priming the peptide ligands for specific molecular recognition with its cognate receptor (Langelaan and Rainey, 2010). Peptide ligands of class B GPCRs mostly exhibit a random coil secondary structure in aqueous solution but require a highly specific three-dimensional topology for receptor binding and activation (Chapter et al., 2010; Hoare, 2005). The central and C-terminal domains of these peptides adopt a helical conformation in milieu mimicking the environment adjacent to the plasma membrane, such as trifluoroethanol and dodecylphosphocholine. Structure-activity relationships studies have highlighted the crucial role of the ligand α -helix for receptor binding (Neumann et al., 2008), suggesting that the cell surface environment surrounding the receptor prompts a random coil to α -helix structural transition. In this view, we probed if the binding of class B GPCRs ligands to sulfated GAGs could induce a conformational secondary conversion of the peptide, as previously observed for the cytolytic peptide mellitin (Goncalves et al., 2006). As observed by CD spectroscopy, most of the peptides used in the present study displayed a disordered structure in aqueous solution, as revealed by the presence of a single minimum at around 205 nm (**Figure 4.5A**; VIP as a representative peptide). The peptide secretin was unique among these peptides with a CD spectrum displaying two minima at 206 and 222 nm and a single maximum at 190 nm, indicating the presence of a partial helical secondary structure in buffer solution (Fig. 5B). When heparin was titrated in VIP solution, the peptide undergoes a conformational rearrangement towards an α -helix configuration (**Figure 4.5A**). Similar results were obtained for other members of the secretin/glucagon/GHRH superfamily. Upon binding to heparin, the helical structure of secretin is stabilized, as inferred from the red-shift of the minima from 206 to 208 nm and an increase of the negative ellipticity at 222 nm (**Figure 4.5B**). Thus, CD experiments revealed that

upon binding to sulfated GAGs, these peptides undergo a secondary conformational conversion into an α -helix, a structure closely related to the biological active conformation of these ligands.

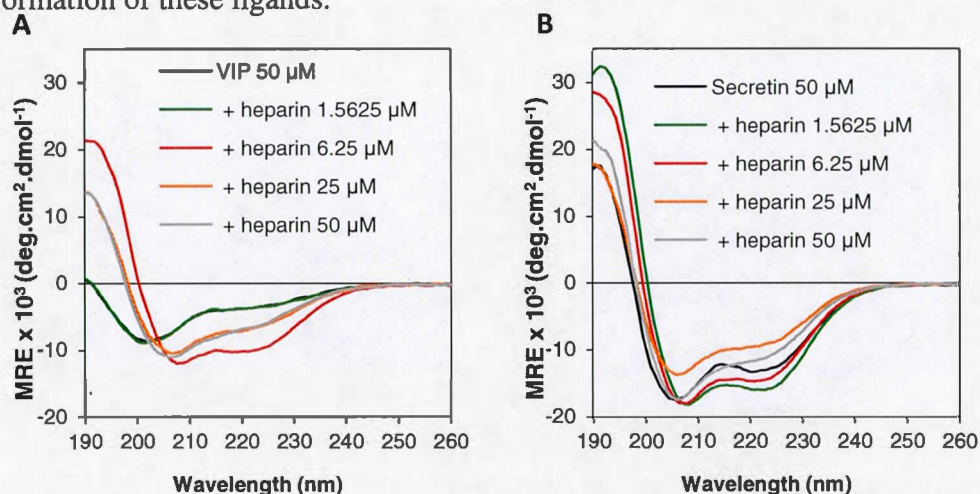


Figure 4.5 Binding to heparin induces the formation of α -helix. (A, B) Circular dichroism spectra of VIP (A) and secretin (B) at a concentration of 50 μ M in absence or in presence of increasing concentration of heparin (1.125 to 50 μ M). Buffer in all experiments is 20 mM phosphate, pH 7.4.

4.4.5 Role of secretin secondary structure for GAGs-mediated cell surface adsorption

The high binding affinity of secretin to heparin, as revealed by affinity chromatography (NaCl elution concentration of 1.45 M) and ITC (K_d of 180 nM), is intriguing, considering that this peptide does not encompass any GAG-binding epitope (**Table 4.1**). However, careful examination of the helical wheel representation of the putative α -helical segment of secretin revealed that Arg residues 14, 18 and 21 are located on one face of the helical wheel (**Figure 4.6A**). Thus, a heparin binding motif, *i.e.* LRRGRS, is formed upon helical folding of the peptide and this 3-dimensional epitope might explain the high binding affinity of secretin toward sulfated GAGs. In order to probe this possibility, we designed 3 secretin analogs in which two adjacent amino acids of the helical segment were substituted by their D-

enantiomers. Successive double d-substitutions introduced in a helical region should result in local disturbance of the α -helix, without modifying other properties of the peptide such as hydrophobicity and net charge (Tchoumi Neree et al., 2014; Wieprecht et al., 1996). Taking into account that the α -helix of secretin spanned over the central and C-terminal segments, to disrupt the helical conformation we sequentially introduced the D,D successive substitutions at positions 11-12, 13-14 and 18-19, referring to [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹]secretin, [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴]secretin and [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin, respectively. As revealed by CD spectroscopy, all 3 D,D-derivatives displayed predominantly a random coil conformation whereas native secretin is mostly helicoidal (**Figure 4.6B**). By affinity chromatography, we observed that hindering the helical folding propensity of secretin precludes its binding to the heparin-sepharose resin, as these 3 peptides were eluted from the column with a NaCl concentration of around 0.1 M (**Figure 4.6C**). Besides, no thermodynamics data could be extracted from ITC experiments, as the binding of these helically-frustrated derivatives to heparin was too weak. As anticipated from the low binding affinity and the disordered conformation in aqueous solution, the presence of heparin in the solution did not lead to the formation of a well-structured α -helix (**Figure 4.6D**). These results indicate that the GAG-binding epitope of secretin is encrypted within its tridimensional structure and not simply in the linear disposition of positively charged residues, suggesting of some specificity within sulfated GAGs-secretin interaction.

Next, we evaluated the contribution of this 3D GAG-binding motif in cell surface binding of secretin by evaluating the plasma membrane adsorption of the fluorescently labelled D,D derivative, [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin. Flow cytometry analysis revealed that [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin was significantly less absorbed to the cell surface of CHO-K1 for concentrations ranging from 5 to 50 μ M with relative cellular uptakes between 15 and 30 % of that secretin (**Figure 4.7A**, **Figure 4.7B**).

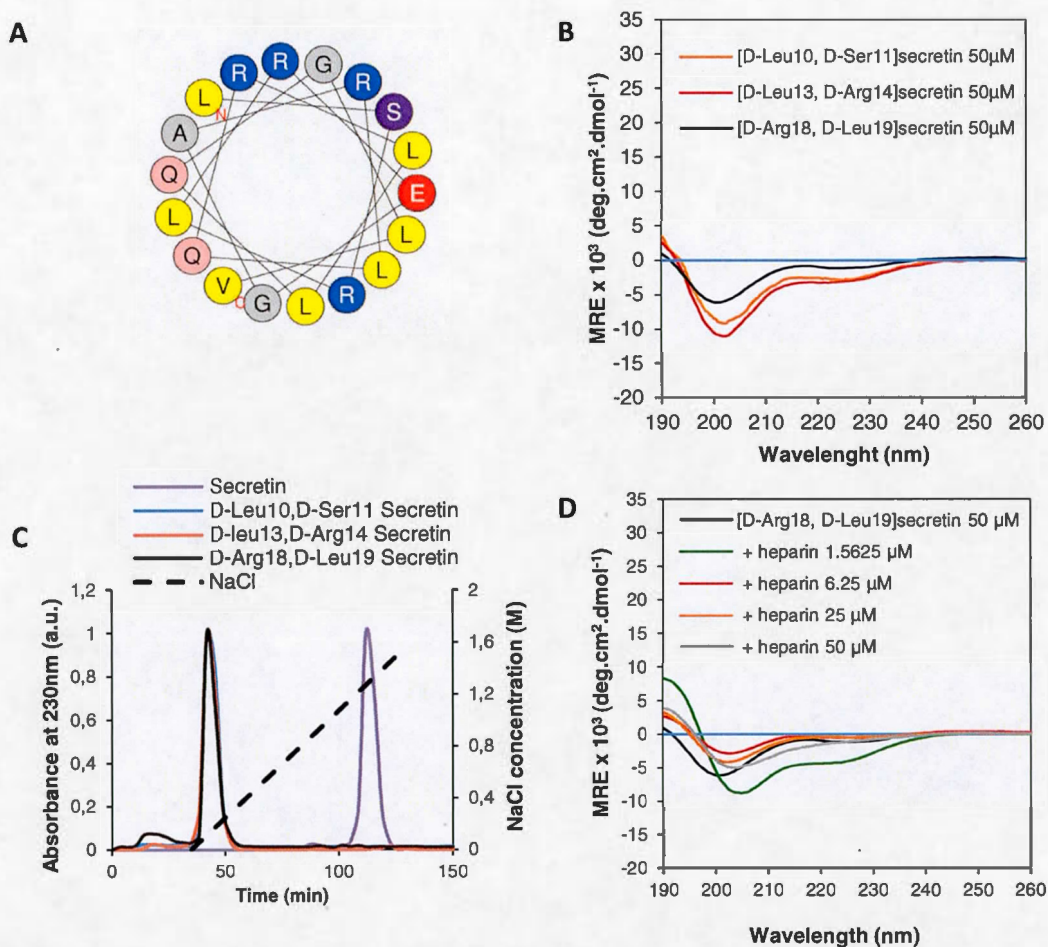


Figure 4.6 Destabilization of secretin α -helix inhibits binding to sulfated GAGs. (A) Helical wheel representation of the putative α -helical segment of secretin (10-27) with basic residues indicated in blue. (B) Circular dichroism spectra of [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹]secretin, [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴]secretin and [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin in 20 mM phosphate, pH 7.4 at a concentration of 50 μ M. (C) Heparin affinity chromatography of secretin derivatives. Superimposed chromatograms of secretin (yellow), [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹]secretin (blue), [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴]secretin (orange) and [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin (black) elution with increasing NaCl concentration on a sepharose heparin column. Injection of 500 μ l of 0.5 mg/ml peptides in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) and the flow rate is 0.5 mL/min. (D) Circular dichroism spectra of [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin at a concentration of 50 μ M in absence or in presence of increasing concentration of heparin (1.125 to 50 μ M).

This result indicates that disrupting the formation of an α -helix drastically reduced cell surface adsorption of secretin on CHO-K1 cells, most likely by hindering the

binding to HS. As a matter of fact, in GAGs-defective CHO pgs-A-745 cells, the cell surface binding of secretin was similar to the adsorption of the helical-deficient secretin derivative (**Figure 4.7C**, **Figure 4.7D**). This result, confirmed by confocal microscopy (**Figure 4.7E**), indicates that GAGs-independent membrane adsorption of secretin is not affected by inhibiting the helical folding. Overall, these data emphasize that the cellular adsorption of peptide of the secretin/glucagon/GHRH superfamily is mediated by GAGs and strongly suggest that the interactions of these ligands with HS could be specific, as previously reported for chemokines and cytokines (Handel et al., 2005).

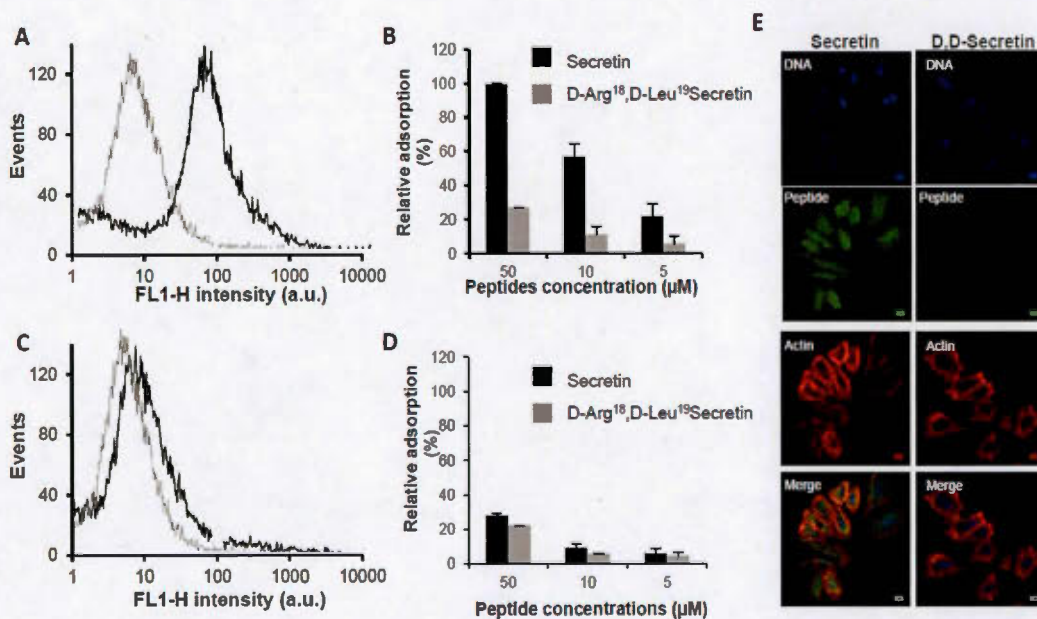


Figure 4.7 Role of secretin secondary helical structure in membrane adsorption. (A) Representative flow cytometry histograms showing cell adsorption of 10 μM [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin (grey) and 10 μM secretin (black) on CHO-K1 cells. (B) Cell surface adsorption of secretin and its derivative on CHO-K1 cells. (C) Representative flow cytometry histograms showing cellular uptake of 10 μM [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin (grey) and 10 μM secretin (black) on CHO pgs-A-745 cells. (D) Cellular uptake of secretin and its derivative on CHO pgs-A-745 cells. (E) Representative confocal microscopy images of cellular adsorption of 10 μM secretin or [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]secretin on CHO-K1.

4.5 Conclusion

Plasma membrane proteoglycans are known to modulate many aspects of cell biology, such as cell adhesion, cellular growth and metabolism, by interacting with different signal molecules, such as chemokines and cytokines. Nevertheless, despite these important physiological functions, our knowledge about the molecular basis, *i.e.* specificity and molecular recognition, remains at an infantile state. Particularly, although peptide hormones from the secretin/glucagon/GHRH superfamily, acting as endogenous ligands of class B GPCRs, are polycationic peptides, their interaction with cell surface sulfated GAGs has never been investigated so far. In this study, we observed that the adsorption of these peptides to the cell membrane is mediated by GAGs. Particularly, *in vitro* binding studies to purified heparin highlighted the potential biological significance of peptide-GAG interaction. These results indicate that cell surface GAGs participate in the initial adsorption of these peptides to the cell surface and that the classical view of the membrane catalysis hypothesis should be revisited to take into account GAGs. It will now be important to assess if, in a similar way as cytokines, GAGs play a role of co-receptor and, perhaps, could present these hormones to their specific GPCR.

REFERENCES

- Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y., Burlina, F., Alves, I.D., Lequin, O., Sagan, S., 2013. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 738-749.
- Bourgault, S., Chatenet, D., Wurtz, O., Doan, N.D., Leprince, J., Vaudry, H., Fournier, A., Vaudry, D., 2011. Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Current pharmaceutical design* 17, 1002-1024.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Segalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., Fournier, A., 2009. Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *Journal of medicinal chemistry* 52, 3308-3316.
- Chapter, M.C., White, C.M., DeRidder, A., Chadwick, W., Martin, B., Maudsley, S., 2010. Chemical modification of class II G protein-coupled receptor ligands: frontiers in the development of peptide analogs as neuroendocrine pharmacological therapies. *Pharmacology & therapeutics* 125, 39-54.
- Doan, N.D., Chatenet, D., Letourneau, M., Vaudry, H., Vaudry, D., Fournier, A., 2012. Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 940-949.
- Esko, J.D., Stewart, T.E., Taylor, W.H., 1985. Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 3197-3201.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* 63, 1256-1272.
- Fromm, J.R., Hileman, R.E., Caldwell, E.E., Weiler, J.M., Linhardt, R.J., 1995. Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the

- importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Archives of biochemistry and biophysics* 323, 279-287.
- Gether, U., 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 21, 90-113.
- Goncalves, E., Kitas, E., Seelig, J., 2006. Structural and thermodynamic aspects of the interaction between heparan sulfate and analogues of melittin. *Biochemistry* 45, 3086-3094.
- Gump, J.M., June, R.K., Dowdy, S.F., 2010. Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *The Journal of biological chemistry* 285, 1500-1507.
- Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Proudfoot, A.E., 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annual review of biochemistry* 74, 385-410.
- Hoare, S.R., 2005. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug discovery today* 10, 417-427.
- Inooka, H., Ohtaki, T., Kitahara, O., Ikegami, T., Endo, S., Kitada, C., Ogi, K., Onda, H., Fujino, M., Shirakawa, M., 2001. Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nature structural biology* 8, 161-165.
- Johnson, Z., Proudfoot, A.E., Handel, T.M., 2005. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 625-636.
- Langelaan, D.N., Rainey, J.K., 2010. Membrane catalysis of peptide-receptor binding. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 88, 203-210.
- Neumann, J.M., Couvineau, A., Murail, S., Lacapere, J.J., Jamin, N., Laburthe, M., 2008. Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends in biochemical sciences* 33, 314-319.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L., 2006. How many drug targets are there? *Nature reviews. Drug discovery* 5, 993-996.

- Sargent, D.F., Schwyzer, R., 1986. Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5774-5778.
- Tchoumi Neree, A., Nguyen, P.T., Chatenet, D., Fournier, A., Bourgault, S., 2014. Secondary conformational conversion is involved in glycosaminoglycans-mediated cellular uptake of the cationic cell-penetrating peptide PACAP. *FEBS letters* 588, 4590-4596.
- Vaudry, D., Gonzalez, B.J., Basille, M., Yon, L., Fournier, A., Vaudry, H., 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological reviews* 52, 269-324.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Schumann, M., Krause, E., Beyermann, M., Bienert, M., 1996. Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement. *Biochemistry* 35, 10844-10853.

CHAPITRE V

ANALYSE

La bicouche lipidique de la membrane plasmique assure l'intégrité de la cellule. Elle sépare l'enceinte de la cellule de l'environnement externe. De plus, les molécules composantes de la membrane cellulaire incluent des protéines complexées aux oses à l'exemple des GAGs. La charge nette négative constitutive des GAGs, serait à l'origine de l'implication des GAGs dans de nombreuses interactions électrostatiques (Favretto et al., 2014). Dans ce projet, mes recherches se sont attardées aux rôles des GAGs à la fois dans l'internalisation des hormones peptidiques appartenant à la classe des RCPGs de classe B mais également dans le processus d'adsorption membranaire de ces dernières.

5.1 Synthèse, purification et caractérisation des peptides de la superfamille secretin/glucagon/GHRH

La synthèse sur support solide (SPPS, solid-phase peptide synthesis) via la chimie Fmoc et le rendement des différentes hormones peptidique de RCPG de classe B, des dérivés [D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹]sécrétine, [D-Leu¹³, D-Arg¹⁴]sécrétine et [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹]sécrétine et des dérivés [D-Ser¹¹, D-Arg¹², D-Leu²³, D-Ala²⁴] ou D4-PACAP et [D-Ser¹¹, D-Arg¹², D-Leu²³, D-Ala²⁴, D-Gln³³, D-Arg³⁴]ou D6-PACAP est compris entre 7.2 et 36.3 % (**Tableau 5.1**) La pureté de ces différents peptides a été évaluée à plus de 95 % (**Annexe**).

Tableau 5.1 Rendement des peptides d'intérêt

Peptide	Rendement (%)	Pureté (%)	Masse théorique (g/mol)	<i>m/z</i>	Masse expérimentale (g/mol)
D4-PACAP38	21.3	> 95 %	4520.2	2261.75 (+2)	4521.5
				1508.17 (+3)	
D6-PACAP38	23.5	> 95 %	4520.2	2261.75 (+2)	4521.5
				1508.17 (+3)	
PACAP38	36.3	> 95 %	4520.2	2261.75 (+2)	4521.5
				1508.17 (+3)	
PACAP27	22.0	> 95 %	3148.6	1573.55 (+2)	3145.1
				1049.36 (+3)	
VIP	10.1	> 95 %	3326.8	1592.85 (+2)	3183.7
				1062.23 (+3)	
Sécrétine	20.4	> 95 %	3040.4	1520.35 (+2)	3038.7
				1013.90 (+3)	
[D-Leu¹⁰, D-Ser¹¹] sécrétine	20.3	> 95 %	3040.4	1520.35 (+2)	3038.7
				1013.90 (+3)	
[D-Leu¹³, D-Arg¹⁴] sécrétine	20.9	> 95 %	3040.4	1520.35 (+2)	3038.7
				1013.90 (+3)	
[D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹] sécrétine	9.6	> 95 %	3040.4	1520.35 (+2)	3038.7
				1013.90 (+3)	
GLP-1	7.2	> 95 %	4111.5	1804.85 (+2)	3607.7
				1203.57(+3)	
GIP	30.5	> 95 %	4983.6	2489.25 (+2)	4976.5
				1659.83 (+3)	
Glucagon	21.7	> 95 %	3482.7	1804.85 (+2)	3607.7
				1203.57 (+3)	

Les masses théoriques sont déterminées à l'aide d'un outil protéomique fourni par le site expasy.org (portal, 2013). Les masses expérimentales sont calculées à partir des rapports m/z fournis par l'analyse en spectrométrie de masse. La valeur de pureté (%) correspond à la pureté des fractions qui sont mises en commun pour former l'échantillon de peptide pur : cette valeur est donnée par le logiciel fourni par le fabricant du HPLC analytique. Le rendement de synthèse et de purification correspond au ratio (en %) de la masse de peptide pur obtenue sur la masse de peptide maximale théorique. La masse de peptide maximale théorique est calculée à partir de l'échelle de synthèse.

5.2 Rôle des GAGs dans l'internalisation du PACAP

Via des techniques biologiques telles que la cytométrie en flux et la microscopie confocale, nous avons observé que l'internalisation du PACAP par les cellules CHO-K1 pourvues de GAGs était approximativement 3 fois supérieure, comparée à celle des cellules CHO-pgs-A-745 dépourvues en GAGs. Afin de montrer que cette différence d'internalisation n'est pas reliée à une défaillance de la machinerie cellulaire des CHO pgs-A745, nous avons procédé à la digestion enzymatique des GAGs à la surface des CHO-K1. Ces résultats ont permis de mettre en relief le rôle clé des GAGs dans l'internalisation du PACAP. Donc, l'internalisation du PACAP est dépendant des GAGs. Ces observations furent également répertoriées dans les travaux de Tyagi (Tyagi et al., 2001) et Nakase (Nakase et al., 2007) dans l'étude des interactions entre les GAGs et le peptide Tat ou des peptides riches en résidus d'arginine.

D'autre part, la co-incubation avec l'héparine soluble, inhibait l'internalisation des peptides. De ce fait, il était fort probable que l'héparine soluble compétitionnait avec les GAGs de surface membranaire; montrant une fois de plus l'importance des GAGs dans l'internalisation cellulaire des peptides cationiques. Ces résultats reflétaient ceux de Console dans l'étude de l'internalisation du Tat (Console et al., 2003).

5.3 Rôle de la transition conformationnelle du PACAP

Afin de déterminer les différents mécanismes moléculaires impliqués dans l'internalisation du PACAP, nous avons caractérisé l'interaction entre le PACAP et les GAGs sulfatés. Pour ce faire, une analyse de cette interaction par dichroïsme circulaire (CD) a été réalisée. Le principe du CD est basé sur le fait que les peptides sont constitués d'éléments optiquement actifs et produisent un spectre CD qui est caractéristique de leur structure secondaire. Donc, en fonction de la structure secondaire qu'adopte un peptide en solution, différents spectres CD pourront être obtenus.

Les spectres CD du PACAP38 nous indiquait que ce dernier présente une conformation principalement aléatoire en solution aqueuse et d'hélice- α en présence de concentrations croissantes d'héparine (6.25; 12.5 et 50 μ M). Ces données suggèraient que l'interaction du PACAP avec l'héparine induirait un changement de conformation. Or, contrairement à nos travaux, Ziegler et Seelig (2004) ont montré que l'addition de différentes concentrations d'héparine diminuait l'amplitude du signal et n'induisait aucun changement de conformation du Tat dont la conformation en solution aqueuse est aléatoire.

Dans le but de comprendre quel est le rôle de la structure secondaire du PACAP lors de l'internalisation médiée par les GAGs, des analogues du PACAP ont été synthétisés en substituant deux paires d'acides aminés voisins, initialement de configuration L par des résidus de configuration D. L'incorporation d'acide aminé de configuration D a pour rôle de déstabiliser la structure secondaire du peptide (Chen et al., 2002; Hruby, 2002). Ainsi, les résultats obtenus par CD ont confirmé que la substitution des résidus L par ceux de configuration D du PACAP inhibe la formation de l'hélice- α . Par contre, l'affinité du PACAP pour l'héparine était indépendamment de la configuration des résidus qui constituent sa séquence primaire; puisque la chromatographie d'affinité a révélé qu'il existait une affinité entre les D,D PACAP et

l'héparine sensiblement similaire à celle obtenu entre le PACAP et l'héparine. Par conséquent, nous pouvions confirmer que la configuration D des résidus inhibe le changement de conformation du peptide peu importe l'apport en concentration d'héparine dans le milieu.

Parallèlement, l'étude de l'internalisation des analogues du PACAP a montré que les D,D PACAP étaient peu internalisés par les cellules CHO-K1 comparés au PACAP. Or, nous n'avons observé aucune différence significative au niveau de l'internalisation des D,D PACAP comparé au PACAP chez des cellules CHO-pgs-A-745. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la configuration D des résidus basiques inhiberait l'internalisation du peptide et que la faible internalisation ou la non internalisation des analogues du PACAP serait indépendante de la présence des GAGs à la surface des cellules CHO. L'absence d'internalisation des analogues du PACAP serait donc due à la perturbation de l'hélice- α . En d'autres termes, nos résultats ont montré que le changement de conformation est un facteur clé dans l'internalisation du PACAP en présence des GAGs.

Le spectre CD du PACAP en présence d'une concentration en héparine de $3.125 \mu\text{M}$ indiquait une perte de signal. Nous avons observé à l'œil nu que la solution devenait trouble après ajout d'une faible concentration d'héparine dans le milieu. Afin de comprendre le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans la perte de signal et la formation d'agrégats, nous avons effectué la titration de la solution de PACAP par l'héparine et vice versa de l'héparine par la solution de PACAP. Par la suite, nous avons analysé la capacité pour chaque molécule (PACAP ou héparine) à former des agrégats. La titration de la solution de PACAP ou des analogues de PACAP par l'héparine induisait de façon instantanée la formation d'une solution trouble. Or en titrant la solution d'héparine par le PACAP (ou analogues), nous avons observé successivement l'apparition d'une phase latente, d'une phase d'agrégation à partir

d'un ratio molaire (n)=1 et d'un plateau à partir de n=4 (PACAP), n=8 (D6-PACAP) ou n=12 (D4-PACAP). Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus par Zeigler (2002) et Rullo (2011), qui ont montré que les PPCs ont la capacité d'agrèger les GAGs. Contrairement à ces deux chercheurs, qui ont montré que les agrégats GAGs-peptides étaient liés à l'internalisation des PPCs, l'agrégation des GAGs par le PACAP (peptide ciblé dans notre étude) ne constitue pas une condition sine qua non pour son internalisation par les cellules CHO. Parce que les analogues du PACAP n'étaient pas internalisés bien qu'ils avaient également la possibilité d'agrèger l'héparine, nous sommes arrivés à la conclusion que le changement de structure du PACAP induit par les GAGs était un mécanisme clé pour son internalisation efficace.

5.4 Rôle des GAGs dans l'attachement cellulaire des hormones peptidiques

L'inhibition de l'internalisation du PACAP par les cellules CHO a montré que le PACAP était adsorbé à la membrane des cellules CHO. Grâce au FACs, il s'est révélé que cette adsorption était dépendant des GAGs.

Étant donné que le PACAP appartienne à la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH, nous nous sommes également intéressés au rôle des GAGs dans l'adsorption membranaire des peptides de cette superfamille à savoir le PACAP27, la sécrétine, le GIP, le GLP-1 et le glucagon. De même que le PACAP38, ces différents peptides présentent également dans leur séquence des acides aminés basiques. De plus, des analyses de FACs ont montré que l'adsorption membranaire de tous ces peptides appartenant à la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH était dépendante de la présence des GAGs à la membrane des cellules CHO. À titre d'exemple, les résultats obtenus ont révélé que la sécrétine était plus adsorbée par les cellules CHO-K1 comparé aux CHO-pgs-A-745 qui sont dépourvues en GAGs. Dans le but de montrer que la différence d'adsorption entre les cellules pourvues et celles déficientes en GAGs n'était pas liée à une défaillance de la machinerie des CHO-pgs-A-745, nous avons réalisé la digestion enzymatique des GAGs à la surface des CHO-K1. Les

résultats obtenus en présence de CHO-K1 traitées à l'héparinase étaient semblables à ceux obtenus avec les CHO-pgs-A-745. La quantité de sécrétine adsorbée par les CHO-K1 était élevée comparée à celle adsorbée par CHO-K1 traitées à l'héparinase.

En ajoutant dans le milieu cellulaire de l'héparine soluble, nous avons observé une diminution de la quantité de ligands adsorbée. De ce fait, l'héparine soluble rendrait le peptide indisponible pour les GAGs du glycocalyx. Ce qui suggère que l'héparine soluble compétitionne avec les GAGs localisés à surface membranaire pour le ligand peptidique.

Dans l'objectif de montrer que la différence d'adsorption membranaire était liée au degré d'affinité des différentes hormones peptidiques avec les GAGs, nous avons réalisé de la chromatographie d'affinité. Contrairement à notre attente, nous avons observé que le PACAP38 possédait moins d'affinité pour l'héparine comparé au GIP, à la sécrétine et au glucagon. Pour être élués de la colonne Sepharose fonctionnalisée à l'héparine, le PACAP, le GIP, la sécrétine et le glucagon nécessitaient une concentration en sel de 1, 1.3, 1.4 et 1.7 M respectivement. Or, comparée aux autres hormones peptidiques, membres de la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH, le PACAP38 était plus adsorbée à surface membranaire des cellules CHO.

Dans le but de caractériser la nature de la force qui résultait de l'interaction hormone peptidique cationique - GAGs, nous avons réalisé la titration isotherme calorimétrie. De cette analyse, nous avons obtenu les données thermodynamiques de différentes hormones témoignant d'une forte interaction et validant ainsi les résultats obtenus par chromatographie d'affinité. Ceci à l'exception du PACAP et du GLP-1 dont l'obtention des données thermodynamiques s'est révélée impossible. Les paramètres thermodynamiques non disponibles du PACAP38 pourraient s'expliquer par le fait que lors de la titration calorimétrique, le peptide agrégeait instantanément l'héparine.

Quant au GLP-1, la non disponibilité des valeurs thermodynamiques pourrait s'expliquer par l'absence d'affinité entre le GLP-1 et l'héparine matérialisé par la chromatographie d'affinité.

Par ailleurs, les paramètres thermodynamiques résultant de l'interaction entre la sécrétine et l'héparine révélaient une forte affinité entre ces deux composés, avec une constante de dissociation (Kd) égale à 0.18 μ M. Cette valeur du Kd de la sécrétine était inférieure de celle issue de l'interaction entre les cytokines et les GAGs dont le Kd varie entre 0.39-2.63 μ M (Kuschert et al., 1999). De plus, la chromatographie d'affinité a montré que la sécrétine était éluée avec une concentration en sel supérieure à celle nécessaire pour l'éluion des cytokines (Handel et al., 2005).

Les interactions GAGs - protéines ont été le sujet de nombreuses études. De ces études, il s'est révélé que les différentes interactions GAG-protéine se faisaient par le biais de séquences conservées connus sous l'appellation de ``heparin binding`` et matérialisé par XBBXBX et XBBBXXBX où X représente un résidu d'acide aminé non chargé et B un résidu basique. L'épitope XBBXBX est retrouvé sur le domaine N-terminal de la séquence du PACAP38, matérialisé par G²⁸K²⁹R³⁰Y³¹K³²Q³³; or aucun de ces deux épitopes n'est présent dans la séquence de la sécrétine. Toutefois, l'épitope XBBXBX a été retrouvé lorsque le peptide adopte une structure secondaire. Donc, les résidus L¹⁰R²¹R¹⁴G²⁵R¹⁸S¹¹ de la sécrétine représente l'épitope XBBXBX orienté du même côté de la roue hélicoïdale. Ainsi donc, la présence d'épitope détectable au niveau de la séquence (PACAP) ou de la structure secondaire (sécrétine) jouerait un rôle important dans l'adsorption des hormones peptidiques aux GAGs

Les spectres CD du VIP et de la sécrétine ont montré que le VIP et la sécrétine adoptaient une conformation désordonnée et d'hélice- α partielle respectivement en solution aqueuse. Or en présence d'une concentration croissante d'héparine dans le

milieu, elles adoptaient une conformation en hélice- α stable. Ainsi donc, l'héparine induirait un changement de conformation du VIP et stabiliserait la conformation hélicoïdale de la sécrétine.

5.5 Importance de la fonction «*heparin binding domain*»

Dans le but de démontrer le rôle clé de l'épitope XBBXBX dans la fixation de la sécrétine aux GAGs, nous avons désigné et synthétisé sur support solide trois analogues de la sécrétine. En substituant premièrement les résidus L-Leu¹⁰ et L-Ser¹¹ par D-Leu¹⁰ et D-Ser¹¹, les L-Leu¹³ et L-Arg¹⁴ par D-Leu¹³ et D-Arg¹⁴, les L-Arg¹⁸ et L-Leu¹⁹ par D-Arg¹⁸ et D-Leu¹⁹ nous avons obtenu la [D-Leu¹⁰ et D-Ser¹¹]sécrétine, la [D-Leu¹³ et D-Arg¹⁴]sécrétine et la [D-Arg¹⁸ et D-Leu¹⁹]sécrétine respectivement. Tel que mentionné par Chen (2002), la substitution des résidus d'acides aminés de configuration L en leur analogue de configuration D a déstabilisé la structure d'hélice- α des peptides. Dans le cas de la sécrétine initialement de conformation hélice- α partielle, la présence de résidus de configuration D a inhibé la stabilisation de l'hélice- α et induisait une conformation aléatoire. De plus aucun changement de conformation n'a été observé en présence de concentrations croissantes d'héparine dans le milieu. Parallèlement, la présence de résidus d'acides aminés de configuration D a inhibé la fixation des D,D sécrétine à l'héparine.

Visant à montrer l'importance de la disposition spatiale des résidus basiques de la sécrétine dans son adsorption membranaire, nous avons évalué par FACs la capacité des cellules CHO à adsorber la sécrétine et ses analogues à leur surface membranaire. Les résultats obtenus ont montré que l'adsorption à la surface des cellules CHO-K1 de la sécrétine est significativement supérieure comparée à l'adsorption membranaire de son analogue [D-Arg¹⁸, D-Leu¹⁹] sécrétine. De plus, cette adsorption était dépendante de la présence des GAGs à la surface cellulaire. Ce qui suggère que la déstabilisation de l'épitope «*heparin binding domain*» par la présence des résidus

d'acides aminés de configuration D; inhiberait l'adsorption à la membrane. Donc, le motif «*heparin binding domain*» jouerait un rôle clé dans l'adsorption de la sécrétine.

D'après l'hypothèse de la catalyse membranaire qui stipule qu'un ligand peptidique activerait son RCPG spécifique après avoir initialement interagi avec l'environnement extracellulaire, nous avons démontré tout au long de ce projet de maîtrise que l'épitope «*heparin binding domain*» favoriserait l'interaction entre les hormones peptidiques, membres de la super famille sécrétine/glucagon/GHRH avec la membrane cellulaire. De plus, nous avons émis l'hypothèse que les GAGs, après fixation du ligand, seraient impliqués dans l'apprêtement structural du peptide; en induisant sa conformation bioactive, suivi de la présentation du ligand à son récepteur spécifique. Des analyses résultant de l'étude d'interaction entre GAGs et chemokines par Johnson (2005) et Massena (2010) ont montré que lors de l'interaction GAGs-chemokines, les GAGs protégeaient les chemokines de la protéolyse et augmentaient la concentration locale en chemokines, ceci afin de faciliter leur internalisation. Dans le même ordre d'idée, des études sur la parathormone ont montré que l'interaction entre GAG et parathormone étaient impliquée dans l'exécution des fonctions biologiques de la parathormone (Kamerzell et al., 2007).

Nos travaux montrent que, les GAGs seraient impliqués avec une forte probabilité dans l'apprêtement structurale des hormones peptidiques avant qu'ils ne se fixent à leur récepteur spécifique. Tout comme les chémokines (Johnson et al., 2005; Massena et al., 2010), nous émettons l'hypothèse que l'interaction entre hormones peptidiques et GAGs serait cruciale dans l'exécution des fonctions des peptides et, en outre, pourrait protéger ces derniers de la protéolyse et augmenterait leur concentration locale à la surface membranaire.

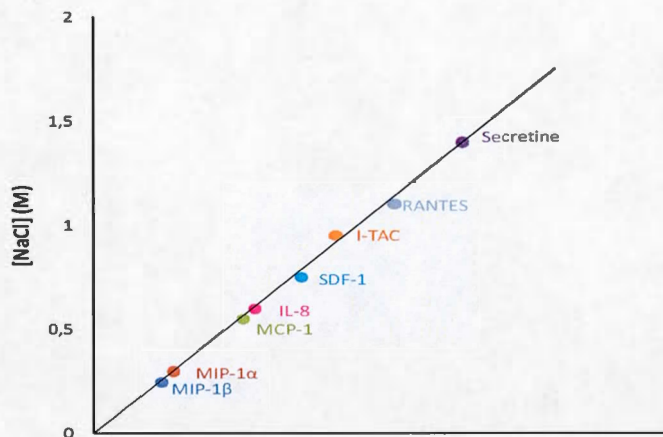


Figure 5.1 Affinité relative de la sécrétine pour l'héparine comparée à celle des chémokines. Les concentrations de NaCl nécessaires pour éluier les différents composés d'une colonne Sepharose-héparine sont représentés (Handel et al., 2005). Toutes les chimiokines sont éluées à des concentrations de NaCl inférieures à celles nécessaires pour l'éluition de la sécrétine d'une colonne fonctionnalisée à l'héparine.

Une analyse de la structure secondaire de la sécrétine, nous a permis d'identifier la présence d'un «*heparin binding domain*» seulement lorsque que le peptide est structuré. En effet, les chaînes latérales des résidus R²², R¹⁵ et R¹⁹ sont orientées sur la même face de l'hélice, formant ainsi un domaine poly-cationique. Comparativement au PACAP38 dont le motif «*heparin binding domain*» est présente dans le domaine C-terminal linéaire plus précisément au niveau du segment ²⁸GKRYKQ³³. Ces remarques montrent une fois de plus l'importance du domaine XBBXBX et XBBBXXBX (où X est un résidu non chargé et B est un résidu basique) des molécules pour la liaison aux GAGs.

5.6 Catalyse membranaire revisitée

Tel que stipulé par Sargent et collaborateur (Sargent and Schwyzer, 1986) dans le cadre de l'hypothèse de la catalyse membranaire, l'analyse CD des hormones peptidiques en présence d'héparine induit un changement de conformation. Ainsi, la sécrétine ayant une conformation d'hélice- α partielle en solution aqueuse adopte une

structure secondaire d'hélice- α stable en présence des GAGs. Ces résultats conduisent à l'hypothèse selon laquelle l'interaction entre la sécrétine et les GAGs pourrait induire un changement de conformation du peptide important pour la liaison au récepteur.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Ce projet de recherche axé sur la caractérisation des interactions intermoléculaires avait pour objectifs de (i) caractériser via des approches biophysiques des interactions GAG-hormone peptidique, (ii) comprendre le mécanisme d'internalisation d'un de ces peptides (le PACAP38), et (iii) élucider le rôle des GAGs dans la catalyse membranaire. Les différents résultats obtenus ont révélé que les GAGs pourraient jouer un rôle clé dans la modulation de l'activité biologique des peptides de la superfamille sécrétine/glucagon/GHRH. Dans un premier temps, nous avons montré que la conversion conformationnelle du PACAP38 induite suite à son interaction avec les GAGs est importante dans le maintien de ses propriétés de CPP. D'autre part, nous avons montré que la présence d'épitope «*heparin binding domain*» était primordial pour l'attachement à la membrane plasmique des cellules eucaryotes.

Notre étude sur la caractérisation biophysique des interactions de différentes hormones peptidiques avec les GAGs a montré que la présence de motifs «*heparin binding domain*» XBBXB, où X est un résidu non chargé et B est un résidu basique, est crucial pour une forte affinité entre GAG et les peptides ligands de RCPGs de classe B. En outre, nos résultats mettent en exergue le rôle de la disposition spatiale des résidus basiques dans la fixation aux GAGs. Ainsi l'arrangement spatial des motifs «*heparin binding domain*» dans la séquence ou dans la structure secondaire du peptide favoriserait des interactions électrostatiques entre le peptide et les domaines hautement

sulfatés des GAGs. De nombreuses études ont fait l'objet d'interaction entre les protéines et la membrane plasmique. Ces différentes études, mettaient en relief uniquement les phospholipides comme particules anioniques de la membrane cellulaire, susceptibles d'établir des interactions avec des molécules biologiques chargées. Or, les phospholipides qu'on retrouve à la surface des cellules de mammifères représentent uniquement les 2 % de particules anioniques de la membrane plasmique. En plus des phospholipides, les GAGs sulfatés sont présents à surface membranaire. Les groupements sulfatés confèrent aux GAGs une charge négative, propice pour d'éventuelle interactions électrostatiques avec des ligands cationiques de la matrice extracellulaire; d'où l'importance de revisiter la catalyse membranaire. En dépit du fait que les GAGs constituent la principale molécule anionique de l'environnement extracellulaire, aucune étude sur les interactions entre les GAGs et les ligands de RCPG de classe B n'était disponible dans la littérature avant nos travaux. Le manque de documentation rendait de ce fait difficile la compréhension des détails moléculaires impliqués lors des interactions GAG-hormone peptidique.

Les résultats de cette étude concourent à l'avancement des connaissances sur l'aspect biophysique des interactions intermoléculaires qui ont lieu au sein de notre organisme et des conséquences biologiques qui adviennent. Notamment l'internalisation et l'adsorption membranaire des peptides cationiques par des cellules de mammifères. En d'autres termes, ce mémoire constitue un apport important dans l'avancement des connaissances au niveau de la compréhension des mécanismes d'internalisation des PPCs via les GAGs. Nos travaux proposent parallèlement à ceux de Doan (2012), le PACAP comme une hormone peptidique présentant des propriétés de CPP. Le PACAP est une molécule innovatrice dans le monde des CPP, bien que sa séquence soit supérieure à celle des PPCs conventionnels. De plus, nous avons montré que contrairement aux PPCs déjà étudiés, l'internalisation du PACAP n'est pas régit par

la formation d'agrégats GAGs – peptide. Mais uniquement par sa capacité à adopter une conformation bioactive. De plus, nous avons montré que le changement de conformation du PACAP était une résultante de son interaction avec les GAGs sulfatés.

Le rôle clé des GAGs dans l'activité biologique des hormones peptidiques mettrait en question les phospholipides, considérés autrefois comme seules composantes anioniques impliquées dans la catalyse membranaire. La présence de motif «*heparin binding domain*» dans la séquence et la structure du PACAP et de la sécrétine respectivement constituerait un site d'attachement des peptides aux GAGs et éventuellement à la membrane plasmique.

Ce projet permet de mieux comprendre les mécanismes d'internalisation cellulaire et d'adsorption membranaire des ligands peptidiques des RCPGs de classe B et de démystifier des différentes composantes clés impliquées dans la catalyse membranaire.

Notre objectif futur consistera à épandre l'étude de la catalyse membranaire et à montrer l'influence de l'interaction GAG-hormone peptidique dans i) la présentation du ligand et l'activation des récepteurs spécifiques, ii) la protection des hormones peptidique face à l'action digestive des protéolyses tel que la trypsine et la chymotrypsine.

APPENDICE

EXEMPLE DE CALCUL DE RENDEMENT ET DE PURETÉ DES PEPTIDES :
CAS DE LA SÉCRÉTINE

A.1 Calcul du rendement

A.1.1 Données

Échelle de synthèse : 0.426 mmol

Nombre d'équivalent = 3

A.1.2 Calcul du poids moléculaire expérimental

Pour $Z=2$ (**Figure A.1**)

$$\frac{PM + z}{z} = 1520.3283 \text{ g/mol}$$

$$PM = 3040.4 \text{ g/mol}$$

A.1.3 Calcul de la masse théorique (m_{th})

m_{th} = nombre d'équivalent X échelle de synthèse x poids moléculaire du peptide

$$m_{th} = 3 \times 0.426 \text{ mmol} \times 3040.4 \text{ g/mol}$$

$$m_{th} = 3,88512 \text{ g}$$

A.1.4 Masse réelle de la sécrétine obtenue après synthèse et purification

$$m_r = 620 \text{ mg}$$

$$\text{Rdt} = 100 \times \frac{\text{masse réelle (obtenue après synthèse)}}{\text{masse théorique}}$$

$$\text{Rdt} = 100 \times \frac{0,62}{3,88512}$$

$$\text{Rdt} = 20.4 \%$$

A.2 Calcul de la pureté

As: Aire sous la courbe représentant la sécrétine (%) (voir **figure A.1**)

At : Aire totale de toutes les courbes (%)

$$\text{Pureté} = 100 \times \frac{As}{At}$$

$$\text{Pureté} = 100 \times \frac{96.7}{100}$$

$$\text{Pureté} = 96.7 \%$$

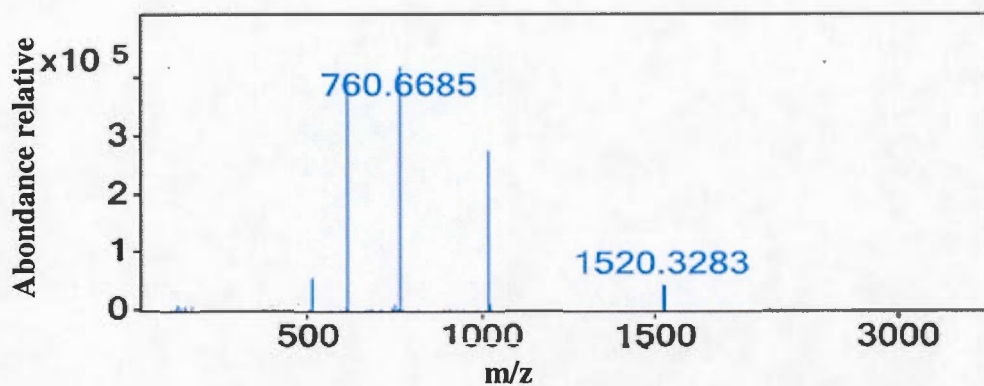


Figure A.1 Spectre de masse ESI – MS TOF de la secrétine.

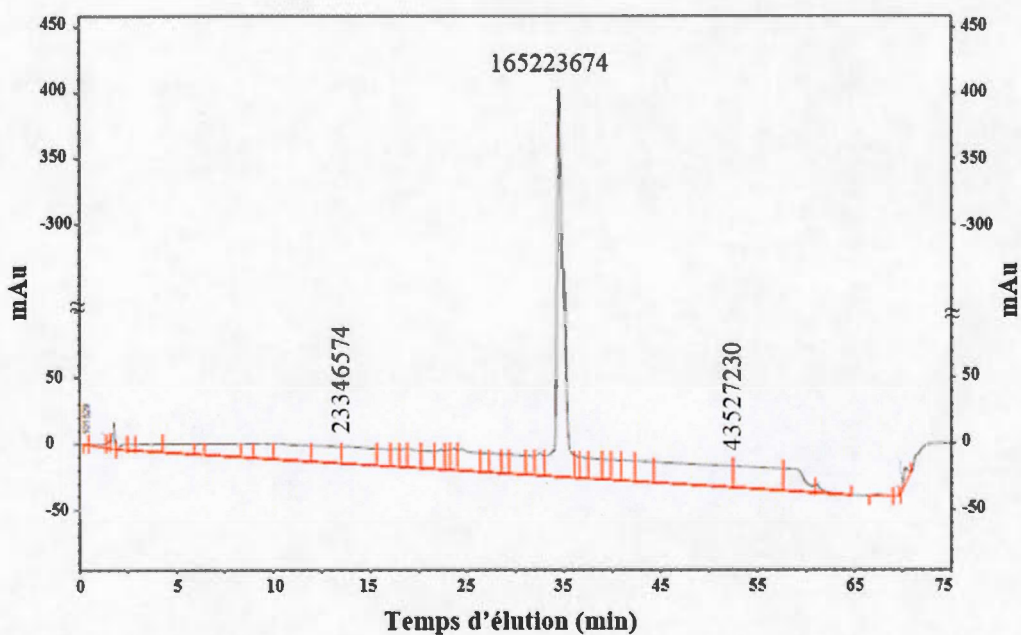


Figure A.2 Chromatogramme de la secrétine. La secrétine est élue de la colonne en fonction d'un gradient de concentration en acétonitrile compris entre 0 et 60 % pendant 30 minutes.

RÉFÉRENCES

- Afroze, S., Meng, F., Jensen, K., McDaniel, K., Rahal, K., Onori, P., Gaudio, E., Alpini, G., Glaser, S.S., 2013. The physiological roles of secretin and its receptor. *Annals of translational medicine* 1, 29.
- Al-Taei, S., Penning, N.A., Simpson, J.C., Futaki, S., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., 2006. Intracellular traffic and fate of protein transduction domains HIV-1 TAT peptide and octaarginine. Implications for their utilization as drug delivery vectors. *Bioconjugate chemistry* 17, 90-100.
- Allen, S.J., Crown, S.E., Handel, T.M., 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology* 25, 787-820.
- Amand, H.L., Rydberg, H.A., Fornander, L.H., Lincoln, P., Norden, B., Esbjorner, E.K., 2012. Cell surface binding and uptake of arginine- and lysine-rich penetratin peptides in absence and presence of proteoglycans. *Biochimica et biophysica acta* 1818, 2669-2678.
- Balkwill, F., 2004. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in cancer biology* 14, 171-179.
- Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y., Burlina, F., Alves, I.D., Lequin, O., Sagan, S., 2013. Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27, 738-749.
- Bechara, C., Sagan, S., 2013. Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS letters* 587, 1693-1702.
- Bishop, J.R., Schuksz, M., Esko, J.D., 2007. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446, 1030-1037.
- Bjarnadottir, T.K., Fredriksson, R., Schioth, H.B., 2005. The gene repertoire and the common evolutionary history of glutamate, pheromone (V2R), taste(1) and other related G protein-coupled receptors. *Gene* 362, 70-84.

- Bockaert, J., Pin, J.P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal* 18, 1723-1729.
- Bourgault, S., Chatenet, D., Wurtz, O., Doan, N.D., Leprince, J., Vaudry, H., Fournier, A., Vaudry, D., 2011. Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Current pharmaceutical design* 17, 1002-1024.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Guilhaudis, L., Raoult, E., Couvineau, A., Laburthe, M., Segalas-Milazzo, I., Vaudry, H., Fournier, A., 2008. Biological and structural analysis of truncated analogs of PACAP27. *Journal of molecular neuroscience : MN* 36, 260-269.
- Bourgault, S., Vaudry, D., Segalas-Milazzo, I., Guilhaudis, L., Couvineau, A., Laburthe, M., Vaudry, H., Fournier, A., 2009. Molecular and conformational determinants of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) for activation of the PAC1 receptor. *Journal of medicinal chemistry* 52, 3308-3316.
- Bradshaw, A.C., Parker, A.L., Duffy, M.R., Coughlan, L., van Rooijen, N., Kahari, V.M., Nicklin, S.A., Baker, A.H., 2010. Requirements for receptor engagement during infection by adenovirus complexed with blood coagulation factor X. *PLoS pathogens* 6, e1001142.
- Brugidou, J., Legrand, C., Mery, J., Rabie, A., 1995. The retro-inverso form of a homeobox-derived short peptide is rapidly internalised by cultured neurones: a new basis for an efficient intracellular delivery system. *Biochemical and biophysical research communications* 214, 685-693.
- Caltabiano, G., Campillo, M., De Leener, A., Smits, G., Vassart, G., Costagliola, S., Pardo, L., 2008. The specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 2484-2492.
- Cardin, A.D., Weintraub, H.J., 1989. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* 9, 21-32.
- Chapter, M.C., White, C.M., DeRidder, A., Chadwick, W., Martin, B., Maudsley, S., 2010. Chemical modification of class II G protein-coupled receptor ligands: frontiers in the development of peptide analogs as neuroendocrine pharmacological therapies. *Pharmacology & therapeutics* 125, 39-54.
- Chen, Y., Mant, C.T., Hodges, R.S., 2002. Determination of stereochemistry stability coefficients of amino acid side-chains in an amphipathic alpha-helix. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 59, 18-33.

- Chey, W.Y., Chang, T.M., 2003. Secretin, 100 years later. *Journal of gastroenterology* 38, 1025-1035.
- Chey, W.Y., Chang, T.M., 2014. Secretin: historical perspective and current status. *Pancreas* 43, 162-182.
- Chidiac, P., Hebert, T.E., Valiquette, M., Dennis, M., Bouvier, M., 1994. Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Molecular pharmacology* 45, 490-499.
- Conn, P.J., Christopoulos, A., Lindsley, C.W., 2009. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nature reviews. Drug discovery* 8, 41-54.
- Conner, S.D., Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44.
- Console, S., Marty, C., Garcia-Echeverria, C., Schwendener, R., Ballmer-Hofer, K., 2003. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *The Journal of biological chemistry* 278, 35109-35114.
- De Carufel, C.A., Nguyen, P.T., Sahnouni, S., Bourgault, S., 2013. New insights into the roles of sulfated glycosaminoglycans in islet amyloid polypeptide amyloidogenesis and cytotoxicity. *Biopolymers* 100, 645-655.
- Doan, N.D., Chatenet, D., Letourneau, M., Vaudry, H., Vaudry, D., Fournier, A., 2012a. Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Biochimica et biophysica acta* 1823, 940-949.
- Doan, N.D., Letourneau, M., Vaudry, D., Doucet, N., Folch, B., Vaudry, H., Fournier, A., Chatenet, D., 2012b. Design and characterization of novel cell-penetrating peptides from pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 163, 256-265.
- Drin, G., Cottin, S., Blanc, E., Rees, A.R., Temsamani, J., 2003. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *The Journal of biological chemistry* 278, 31192-31201.
- Duchardt, F., Ruttekolk, I.R., Verdurmen, W.P., Lortat-Jacob, H., Burck, J., Hufnagel, H., Fischer, R., van den Heuvel, M., Lowik, D.W., Vuister, G.W., Ulrich, A., de Waard, M., Brock, R., 2009. A cell-penetrating peptide derived

- from human lactoferrin with conformation-dependent uptake efficiency. *The Journal of biological chemistry* 284, 36099-36108.
- Ellyard, J.I., Simson, L., Bezos, A., Johnston, K., Freeman, C., Parish, C.R., 2007. Eotaxin selectively binds heparin. An interaction that protects eotaxin from proteolysis and potentiates chemotactic activity in vivo. *The Journal of biological chemistry* 282, 15238-15247.
- Elmqvist, A., Lindgren, M., Bartfai, T., Langel, U., 2001. VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Experimental cell research* 269, 237-244.
- Esko, J.D., Lindahl, U., 2001. Molecular diversity of heparan sulfate. *The Journal of clinical investigation* 108, 169-173.
- Esko, J.D., Stewart, T.E., Taylor, W.H., 1985. Animal cell mutants defective in glycosaminoglycan biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 3197-3201.
- Esko, J.D., Weinke, J.L., Taylor, W.H., Ekborg, G., Roden, L., Anantharamaiah, G., Gawish, A., 1987. Inhibition of chondroitin and heparan sulfate biosynthesis in Chinese hamster ovary cell mutants defective in galactosyltransferase I. *The Journal of biological chemistry* 262, 12189-12195.
- Favretto, M.E., Wallbrecher, R., Schmidt, S., van de Putte, R., Brock, R., 2014. Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - bystanders or active players? *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 180, 81-90.
- Foord, S.M., 2002. Receptor classification: post genome. *Current opinion in pharmacology* 2, 561-566.
- Foord, S.M., Bonner, T.I., Neubig, R.R., Rosser, E.M., Pin, J.P., Davenport, A.P., Spedding, M., Harmar, A.J., 2005. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews* 57, 279-288.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* 63, 1256-1272.
- Fromm, J.R., Hileman, R.E., Caldwell, E.E., Weiler, J.M., Linhardt, R.J., 1995. Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic

- fibroblast growth factor. *Archives of biochemistry and biophysics* 323, 279-287.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y., 2001. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of biological chemistry* 276, 5836-5840.
- Gether, U., 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 21, 90-113.
- Gobeil, F., Fortier, A., Zhu, T., Bossolasco, M., Leduc, M., Grandbois, M., Heveker, N., Bkaily, G., Chemtob, S., Barbaz, D., 2006. G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84, 287-297.
- Goncalves, E., Kitas, E., Seelig, J., 2006. Structural and thermodynamic aspects of the interaction between heparan sulfate and analogues of melittin. *Biochemistry* 45, 3086-3094.
- Gremlich, H.U., Fringeli, U.P., Schwyzer, R., 1983. Conformational changes of adrenocorticotropin peptides upon interaction with lipid membranes revealed by infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Biochemistry* 22, 4257-4264.
- Gump, J.M., June, R.K., Dowdy, S.F., 2010. Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *The Journal of biological chemistry* 285, 1500-1507.
- Hamm, H.E., 1998. The many faces of G protein signaling. *The Journal of biological chemistry* 273, 669-672.
- Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Proudfoot, A.E., 2005. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annual review of biochemistry* 74, 385-410.
- Hoare, S.R., 2005. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug discovery today* 10, 417-427.
- Hruby, V.J., 2002. Designing peptide receptor agonists and antagonists. *Nature reviews. Drug discovery* 1, 847-858.

- Inooka, H., Ohtaki, T., Kitahara, O., Ikegami, T., Endo, S., Kitada, C., Ogi, K., Onda, H., Fujino, M., Shirakawa, M., 2001. Conformation of a peptide ligand bound to its G-protein coupled receptor. *Nature structural biology* 8, 161-165.
- Iozzo, R.V., 2005. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 646-656.
- Jackson, R.L., Busch, S.J., Cardin, A.D., 1991. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiological reviews* 71, 481-539.
- Jacoby, E., Bouhelal, R., Gerspacher, M., Seuwen, K., 2006. The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* 1, 761-782.
- Jiao, C.Y., Delaroché, D., Burlina, F., Alves, I.D., Chassaing, G., Sagan, S., 2009. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *The Journal of biological chemistry* 284, 33957-33965.
- Johnson, Z., Proudfoot, A.E., Handel, T.M., 2005. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 625-636.
- Jones, A.T., Sayers, E.J., 2012. Cell entry of cell penetrating peptides: tales of tails wagging dogs. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 161, 582-591.
- Kaplan, I.M., Wadia, J.S., Dowdy, S.F., 2005. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 102, 247-253.
- Katritch, V., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2013. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annual review of pharmacology and toxicology* 53, 531-556.
- Klocek, G., Seelig, J., 2008. Melittin interaction with sulfated cell surface sugars. *Biochemistry* 47, 2841-2849.
- Koelink, P.J., Overbeek, S.A., Braber, S., de Kruijf, P., Folkerts, G., Smit, M.J., Kraneveld, A.D., 2012. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review. *Pharmacology & therapeutics* 133, 1-18.
- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakanishi, S., Jingami, H., Morikawa, K., 2000. Structural basis of glutamate

recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407, 971-977.

Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., Wells, T.N., 1999. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38, 12959-12968.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R.A., Muzny, D.M., Scherer, S.E., Bouck, J.B., Sodergren, E.J., Worley, K.C., Rives, C.M., Gorrell, J.H., Metzker, M.L., Naylor, S.L., Kucherlapati, R.S., Nelson, D.L., Weinstock, G.M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D.R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H.M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R.W., Federspiel, N.A., Abola, A.P., Proctor, M.J., Myers, R.M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D.R., Olson, M.V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G.A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B.A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W.R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J.A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D.G., Burge, C.B., Cerutti, L., Chen, H.C., Church, D., Clamp, M., Copley, R.R., Doerks, T., Eddy, S.R., Eichler, E.E., Furey, T.S., Galagan, J., Gilbert, J.G., Harmon, C., Hayashizaki,

- Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L.S., Jones, T.A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.J., Kitts, P., Koónin, E.V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T.M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J.V., Mulder, N., Pollara, V.J., Ponting, C.P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A.F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y.I., Wolfe, K.H., Yang, S.P., Yeh, R.F., Collins, F., Guyer, M.S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K.A., Patrinos, A., Morgan, M.J., de Jong, P., Catanese, J.J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y.J., International Human Genome Sequencing, C., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Langelaan, D.N., Rainey, J.K., 2010. Membrane catalysis of peptide-receptor binding. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 88, 203-210.
- Li, S., Pettersson, U.S., Hoorelbeke, B., Kolaczowska, E., Schelfhout, K., Martens, E., Kubes, P., Van Damme, J., Phillipson, M., Opdenakker, G., 2014. Interference with glycosaminoglycan-chemokine interactions with a probe to alter leukocyte recruitment and inflammation in vivo. *PloS one* 9, e104107.
- Lundberg, P., Langel, U., 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *Journal of molecular recognition : JMR* 16, 227-233.
- MacArthur, J.M., Bishop, J.R., Stanford, K.I., Wang, L., Bensadoun, A., Witztum, J.L., Esko, J.D., 2007. Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members. *The Journal of clinical investigation* 117, 153-164.
- Massena, S., Christoffersson, G., Hjertstrom, E., Zcharia, E., Vlodaysky, I., Ausmees, N., Rolny, C., Li, J.P., Phillipson, M., 2010. A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils. *Blood* 116, 1924-1931.
- Miller, L.J., Dong, M., Harikumar, K.G., 2012. Ligand binding and activation of the secretin receptor, a prototypic family B G protein-coupled receptor. *British journal of pharmacology* 166, 18-26.
- Milletti, F., 2012. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug discovery today* 17, 850-860.
- Miyata, A., Arimura, A., Dahl, R.R., Minamino, N., Uehara, A., Jiang, L., Culler, M.D., Coy, D.H., 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic

- polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and biophysical research communications* 164, 567-574.
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., Nairn, A.V., 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 448-462.
- Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., Futaki, S., 2007. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* 46, 492-501.
- Neumann, J.M., Couvineau, A., Murail, S., Lacapere, J.J., Jamin, N., Laburthe, M., 2008. Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends in biochemical sciences* 33, 314-319.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L., 2006. How many drug targets are there? *Nature reviews. Drug discovery* 5, 993-996.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- Poole, A.R., 1986. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *The Biochemical journal* 236, 1-14.
- portal, E.B.R., 2013. ExPASy - ProtParam tool.
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., Shai, Y., 1992. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31, 12416-12423.
- Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., Kosco-Vilbois, M.H., 2003. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1885-1890.
- Rabenstein, D.L., 2002. Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Natural product reports* 19, 312-331.
- Ram, N., Aroui, S., Jaumain, E., Bichraoui, H., Mabrouk, K., Ronjat, M., Lortat-Jacob, H., De Waard, M., 2008. Direct peptide interaction with surface

- glycosaminoglycans contributes to the cell penetration of maurocalcine. *The Journal of biological chemistry* 283, 24274-24284.
- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., Chernomordik, L.V., 2005. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *The Journal of biological chemistry* 280, 15300-15306.
- Rullo, A., Qian, J., Nitz, M., 2011. Peptide-glycosaminoglycan cluster formation involving cell penetrating peptides. *Biopolymers* 95, 722-731.
- Sallusto, F., Baggiolini, M., 2008. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature immunology* 9, 949-952.
- Sargent, D.F., Schwyzer, R., 1986. Membrane lipid phase as catalyst for peptide-receptor interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5774-5778.
- Singer, S.J., Nicolson, G.L., 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Sze, K.H., Zhou, H., Yang, Y., He, M., Jiang, Y., Wong, A.O., 2007. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. *Endocrinology* 148, 5042-5059.
- Tam, J.K., Lee, L.T., Jin, J., Chow, B.K., 2014. Molecular evolution of GPCRs: Secretin/secretin receptors. *Journal of molecular endocrinology* 52, T1-14.
- Tautermann, C.S., Seeliger, D., Kriegl, J.M., 2015. What can we learn from molecular dynamics simulations for GPCR drug design? *Computational and structural biotechnology journal* 13, 111-121.
- Tchoumi Neree, A., Nguyen, P.T., Chatenet, D., Fournier, A., Bourgault, S., 2014. Secondary conformational conversion is involved in glycosaminoglycans-mediated cellular uptake of the cationic cell-penetrating peptide PACAP. *FEBS letters* 588, 4590-4596.
- Tunnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R.M., Stockl, M., Herrmann, A., Cardoso, M.C., 2008. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society* 14, 469-476.

- Tyagi, M., Rusnati, M., Presta, M., Giacca, M., 2001. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *The Journal of biological chemistry* 276, 3254-3261.
- Vaudry, D., Falluel-Morel, A., Bourgault, S., Basille, M., Burel, D., Wurtz, O., Fournier, A., Chow, B.K., Hashimoto, H., Galas, L., Vaudry, H., 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacological reviews* 61, 283-357.
- Verdurmen, W.P., Bovee-Geurts, P.H., Wadhvani, P., Ulrich, A.S., Hallbrink, M., van Kuppevelt, T.H., Brock, R., 2011. Preferential uptake of L- versus D-amino acid cell-penetrating peptides in a cell type-dependent manner. *Chemistry & biology* 18, 1000-1010.
- Verdurmen, W.P., Wallbrecher, R., Schmidt, S., Eilander, J., Bovee-Geurts, P., Fanghanel, S., Burck, J., Wadhvani, P., Ulrich, A.S., Brock, R., 2013. Cell surface clustering of heparan sulfate proteoglycans by amphipathic cell-penetrating peptides does not contribute to uptake. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 170, 83-91.
- Vu, J.P., Larauche, M., Flores, M., Luong, L., Norris, J., Oh, S., Liang, L.J., Waschek, J., Pisegna, J.R., Germano, P.M., 2015. Regulation of Appetite, Body Composition, and Metabolic Hormones by Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP). *Journal of molecular neuroscience : MN*.
- Wadia, J.S., Stan, R.V., Dowdy, S.F., 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nature medicine* 10, 310-315.
- Wallbrecher, R., Verdurmen, W.P., Schmidt, S., Bovee-Geurts, P.H., Broecker, F., Reinhardt, A., van Kuppevelt, T.H., Seeberger, P.H., Brock, R., 2014. The stoichiometry of peptide-heparan sulfate binding as a determinant of uptake efficiency of cell-penetrating peptides. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 2717-2729.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., Rothbard, J.B., 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13003-13008.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Schumann, M., Krause, E., Beyermann, M., Bienert, M., 1996. Conformational and functional study of magainin 2 in model membrane

environments using the new approach of systematic double-D-amino acid replacement. *Biochemistry* 35, 10844-10853.

- Wray, V., Kakoschke, C., Nokihara, K., Naruse, S., 1993. Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 32, 5832-5841.
- Yu, Y., Sweeney, M.D., Saad, O.M., Crown, S.E., Hsu, A.R., Handel, T.M., Leary, J.A., 2005. Chemokine-glycosaminoglycan binding: specificity for CCR2 ligand binding to highly sulfated oligosaccharides using FTICR mass spectrometry. *The Journal of biological chemistry* 280, 32200-32208.
- Ziegler, A., Nervi, P., Durrenberger, M., Seelig, J., 2005. The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry* 44, 138-148.
- Ziegler, A., Seelig, J., 2004. Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophysical journal* 86, 254-263.
- Ziegler, A., Seelig, J., 2008. Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds. *Biophysical journal* 94, 2142-2149.
- Ziegler, A., Seelig, J., 2011. Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide WR9. *Biochemistry* 50, 4650-4664.