



**HAL**  
open science

## Des protéines de synthèse taillées sur mesure pour investiguer le vivant

Vincent Aucagne, Fabienne Burlina, Oleg Melnyk, Vladimir Torbeev

► **To cite this version:**

Vincent Aucagne, Fabienne Burlina, Oleg Melnyk, Vladimir Torbeev. Des protéines de synthèse taillées sur mesure pour investiguer le vivant. *L'Actualité Chimique*, 2021, 468, pp.26-28. hal-02959387

**HAL Id: hal-02959387**

**<https://hal.science/hal-02959387v1>**

Submitted on 6 Oct 2020

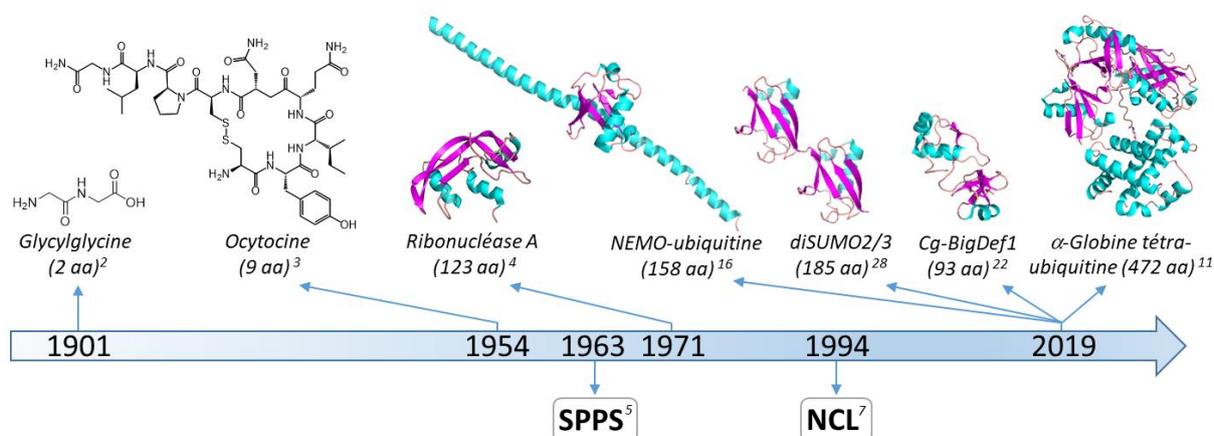
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

# Des protéines de synthèse taillées sur mesure pour investiguer le vivant

Vincent Aucagne, Fabienne Burlina, Oleg Melnyk, Vladimir Torbeev

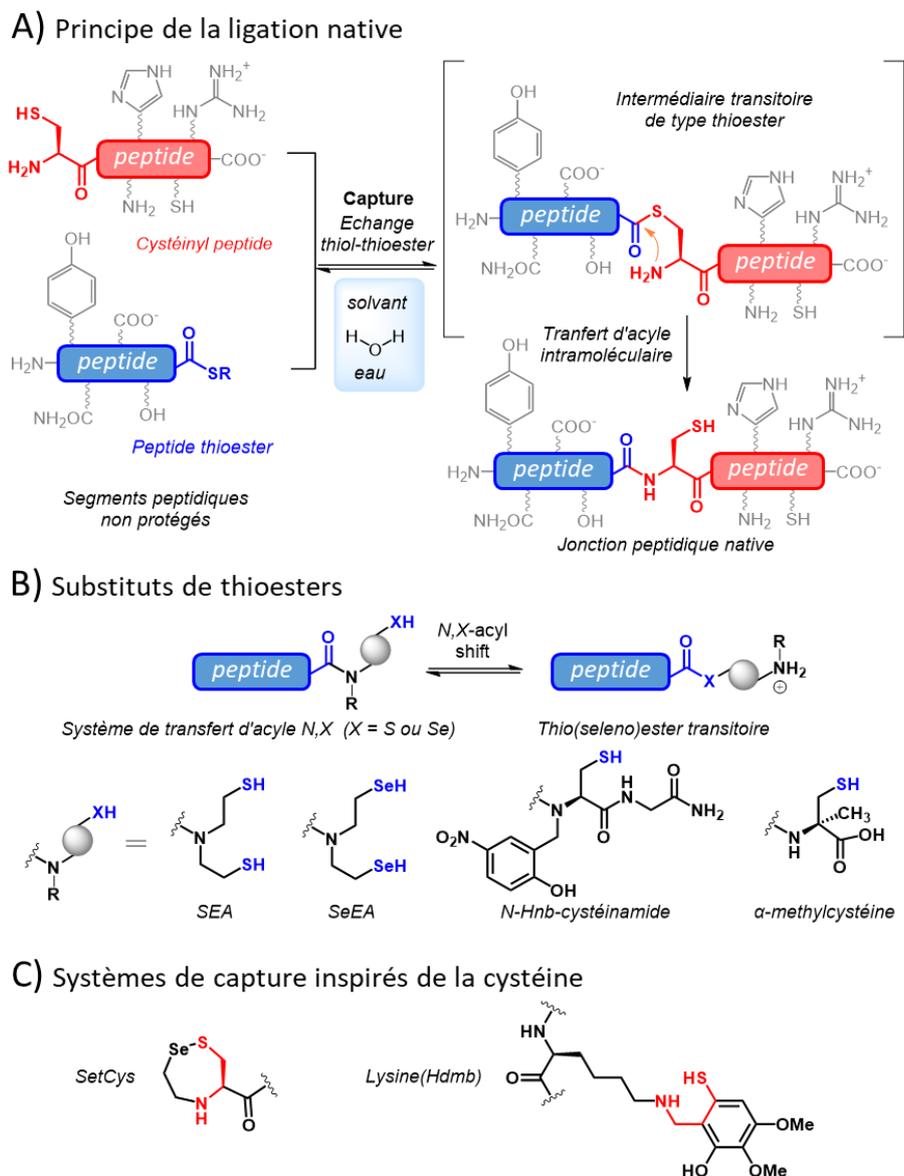
Depuis la synthèse des premiers dipeptides par Curtius<sup>1</sup> et Fisher<sup>2</sup>, les protéines ont constitué un objectif fascinant pour des générations de chimistes. Cinquante ans de développements méthodologiques ont été nécessaires pour aboutir en 1954 à la synthèse d'une hormone bioactive de 9 acides aminés (aa), l'ocytocine (Fig. 1).<sup>3</sup> En 1971, la synthèse d'une enzyme, la ribonucléase A (123 aa), a été réalisée par Merrifield<sup>4</sup> en enchaînant 246 réactions sur un support insoluble.<sup>5</sup> Ce tour de force a démontré la grande efficacité de la synthèse de peptides en phase solide (SPPS), qui est aujourd'hui un outil classique pour la synthèse automatisée de peptides composés de quelques dizaines d'acides aminés. Le dernier jalon marquant de cette épopée scientifique est l'invention du concept de « ligation chimique », ou des réactions chimiques sélectives sont mises en œuvre en milieu aqueux pour lier des segments non-protégés obtenus par SPPS ou biotechnologie. Introduit en 1992 pour la synthèse d'une protéine dont le squelette est modifié,<sup>6</sup> il est adapté deux ans plus tard à une version « native » où une liaison peptidique est formée au site de jonction (*Native Chemical Ligation*, NCL,<sup>7,8</sup> Fig. 2A). 25 ans après sa découverte, cette réaction reste la plus utilisée pour la synthèse de protéines.<sup>9</sup> Elle a permis l'accès à des cibles de plus de 300 acides aminés<sup>10,11</sup> et a ouvert une voie inédite pour la synthèse parfaitement contrôlée de protéines natives ou modifiées spécifiquement au niveau de leur squelette ou de certaines chaînes latérales. En ce sens, l'approche « chimique » de la synthèse de protéines vient compléter les méthodes biotechnologiques exploitant des systèmes vivants, avec l'avantage de pouvoir créer des outils sur-mesure pour décrypter le vivant à une résolution atomique.



**Figure 1 :** La synthèse de peptides et de protéines a connu un essor considérable depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, et notamment depuis 1994, avec la découverte de la NCL.

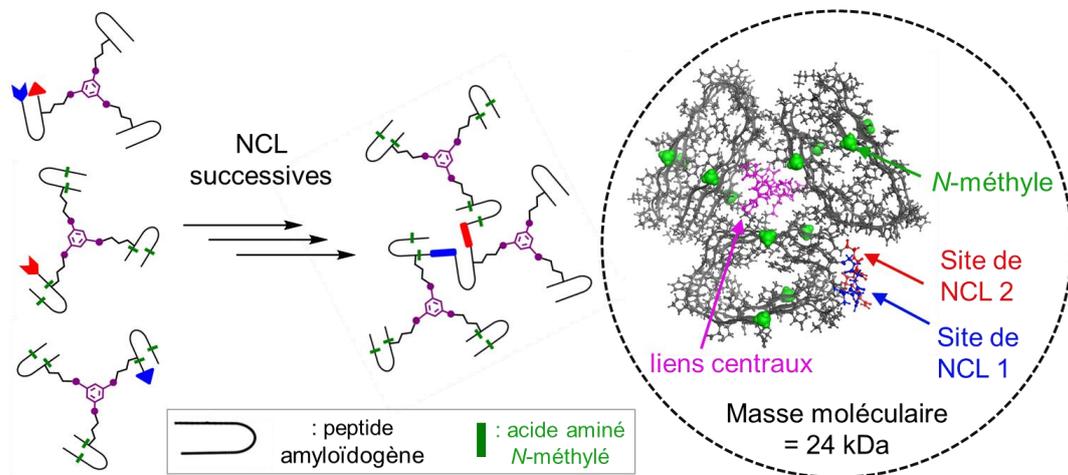
Aujourd'hui, l'accès par synthèse totale à des protéines arborant diverses structures, linéaires, cycliques ou branchées, est facilitée par une riche palette d'outils chimiques qui sont venus élargir la portée de la réaction de NCL. D'importants développements méthodologiques ont porté sur la mise au point de substituts de thioesters, dont la synthèse est restée longtemps problématique. Durant la dernière décennie, les équipes françaises ont été particulièrement actives dans la conception d'amides ayant la capacité de se réarranger spontanément dans l'eau et dans des conditions très douces en thioester transitoire, et donc de jouer le rôle de donneur d'acyle dans des réactions de NCL (Fig. 2B).<sup>12-14</sup> Ce processus a pu être

considérablement favorisé par catalyse intramoléculaire ou effet Thorpe-Ingold, pour aboutir, par un jeu de déplacements d'équilibres, à des réactions de NCL efficaces et rapides. Des travaux récents portent également sur la conception de systèmes de capture qui permettent soit de faciliter l'assemblage des segments peptidiques (e.g. le système redox contrôlé SetCys,<sup>15</sup> Fig. 2C), soit l'accès à des protéines ubiquitinées *via* un lien isopeptidique natif (e.g. l'auxiliaire de ligation Hdmb<sup>16</sup> greffé sur une lysine, Fig. 2C). Par ailleurs, des approches alternatives à la NCL ont été élaborées, exploitant la cycloaddition alcyne/azoture catalysée par le cuivre (I) qui conduit à un 1,2,3-triazole, excellent mime de liaison amide.<sup>17-19</sup> Enfin, le développement de méthodes pour la synthèse supportée de protéines par assemblage itératif de segments peptidiques vient en complément des méthodes en solution.<sup>18-21</sup> Collectivement, ces techniques simplifient l'accès à des protéines complexes.



**Figure 2** : A) Principe de la réaction de NCL montrant l'intermédiaire de capture thioester. B) Certains amides arborant sur l'azote un groupement beta-mercaptoéthyle peuvent servir de donneur d'acyle *in situ* durant la NCL. C) Les systèmes de capture étendent la portée de la NCL en facilitant l'assemblage des segments peptidiques et l'accès à des structures cycliques ou branchées.

En combinant SPPS et techniques de ligation, les chimistes accèdent à des protéines de structure native pour leur caractérisation biologique et structurale.<sup>22-25</sup> La synthèse d'une miniprotéine riche en ponts disulfure de la famille des big défensines (*Cg-BigDef1*, Fig. 1) a ainsi mis en évidence son activité bactéricide vis-à-vis de souches multi-résistantes.<sup>22</sup> L'étude a par ailleurs révélé le mode d'action original de ces composés, produits uniquement par des organismes invertébrés marins et qui se caractérisent par la présence d'un domaine hydrophobe ancestral leur permettant d'être actifs en milieu salin. Les protéines arborant des modifications post-traductionnelles et difficilement accessibles par biotechnologie sont des cibles de choix pour les chimistes (diSUMO2/3, NEMO-ubiquitine, Fig. 1).<sup>16,26-28</sup> Par exemple, la protéine NEMO joue un rôle central dans la réponse immunitaire innée. Son activation par liaison covalente de chaînes linéaires d'ubiquitine a été investiguée grâce à la synthèse d'un intermédiaire clé de ce processus, NEMO mono-ubiquitiné (Fig. 1). Cette étude a montré que l'ubiquitination linéaire de NEMO implique deux étapes distinctes d'amorçage et d'extension de chaîne, et permis d'identifier l'enzyme responsable de l'extension *in vivo*.<sup>16</sup> La synthèse chimique donne aussi l'opportunité d'élaborer des systèmes moléculaires non natifs présentant de nouvelles fonctionnalités.<sup>29-31</sup> La synthèse de dérivés multivalents du facteur de croissance des hépatocytes a conduit à la conception d'analogues présentant un potentiel thérapeutique dans le domaine de la régénération tissulaire.<sup>29</sup> Dans un autre domaine, l'ingénierie de protéines amyloïde ouvre la voie, *via* la synthèse d'analogues solubles, à une connaissance accrue de leur implication dans la maladie d'Alzheimer (Fig. 3).<sup>30</sup> Enfin, l'introduction d'acides aminés modifiés dans une protéine intrinsèquement désordonnée a permis d'augmenter sa structuration et son affinité pour son partenaire,<sup>31</sup> laissant espérer la conception de puissants inhibiteurs d'interactions protéine-protéine.



**Figure 3 :** Conception et synthèse d'un analogue soluble d'oligomère amyloïde. Neuf copies d'un bloc de construction peptidique amyloïdogène sont conjuguées *via* des liens centraux et des NCL successives. L'agrégation incontrôlée est empêchée par la *N*-méthylation d'acides aminés spécifiques.

## Références :

- [1] Curtius, T., Ueber die Einwirkung von Chlorbenzoyl auf Glycocollfiber, *J. Prakt. Chem.* **1881**, 24, p. 239.
- [2] Fischer, E.; Fourneau, E., Ueber einige Derivate des Glykocolls. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, 34, p. 2868.
- [3] du Vigneaud V., Ressler C., Swan J. M., Carleton W., Katsoyannis P. G., The Synthesis of Oxytocin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, p. 3115.
- [4] Gutte B., Merrifield R. B., The Synthesis of Ribonuclease A, *J. Biol. Chem.*, **1971**, 246, p. 1922.
- [5] Merrifield R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, p. 2149.
- [6] Schnölzer M., Kent S. B., Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease, *Science*, **1992**, 256, p. 221.
- [7] Dawson P. E., Muir T. W., Clark-Lewis I., Kent S. B., Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science*, **1994**, 266, p. 776.
- [8] Agouridas V., El Mahdi O., Diemer V., Cargoët M., Monbaliu J.-C. M., Melnyk O., Native Chemical Ligation and Extended Methods: Mechanisms, Catalysis, Scope, and Limitations, *Chem. Rev.*, **2019**, 119, p. 7328.
- [9] Agouridas V., El Mahdi O., Cargoët M., Melnyk O., A statistical view of protein chemical synthesis using NCL and extended methodologies, *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, 25, p. 4938.
- [10] Zhang B., Li Y., Shi W., Wang T., Zhang F., Liu L., Chemical Synthesis of Proteins Containing 300 Amino Acids, *Chem. Res. Chinese Universities*, **2020**, 36, DOI: 10.1007/s40242-020-0150-y.
- [11] Sun H., Mali S. M., Singh S. K., Meledin R., Brik A., Kwon Y. T., Kravtsova-Ivantsiv Y., Bercovich B., Ciechanover A., Diverse fate of ubiquitin chain moieties: The proximal is degraded with the target, and the distal protects the proximal from removal and recycles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2019**, 116, p. 7805.
- [12] Ollivier N., Dheur J., Mhidia R., Blanpain A., Melnyk O., Bis(2-sulfanylethyl)amino Native Peptide Ligation, *Org. Lett.*, **2010**, 12, p. 5238.
- [13] Burlina F., Papageorgiou G., Morris C., White P. D., Offer J., In situ thioester formation for protein ligation using  $\alpha$ -methylcysteine, *Chem. Sci.*, **2014**, 5, p. 766.
- [14] Terrier V. P., Adihou H., Arnould M., Delmas A. F., Aucagne V., A straightforward method for automated Fmoc-based synthesis of bio-inspired peptide crypto-thioesters, *Chem. Sci.*, **2016**, 7, p. 339.
- [15] Diemer V., Ollivier N., Leclercq B., Drobecq H., Vicogne J., Agouridas V., Melnyk O., A cysteine selenosulfide redox switch for protein chemical synthesis, *Nat. Commun.*, **2020**, 11, 2558.
- [16] Burlina F., Abdel-Aal A.-B. M., Raz R., Pinzuti I., Papageorgiou G., Li J., Antrobus R., Martin S. R., Kunzelmann S., Stieglitz B., Offer J., Auxiliary-Assisted Chemical Ubiquitylation of NEMO and Linear Extension by HOIP, *Commun. Chem.*, **2019**, 2, 111.
- [17] Valverde I., Lecaille F., Lalmanach G., Aucagne V., Delmas A. F., Synthesis of a biologically active triazole-containing analogue of cystatin A through successive peptidomimetic alkyne–azide ligations, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, p. 718
- [18] Aucagne V., Valverde I. E., Marceau P., Galibert M., Dendane N., Delmas A. F., Towards the simplification of protein synthesis: iterative solid-supported ligations with concomitant purifications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, p. 11320.
- [19] Galibert M., Piller V., Piller F., Aucagne V., Delmas A. F., Combining triazole ligation and enzymatic glycosylation on solid phase simplifies the synthesis of very long glycoprotein analogues, *Chem. Sci.*, **2015**, 6, p. 3617.
- [20] Raibaut L., Adihou H., Desmet R., Delmas A. F., Aucagne V., Melnyk O., Highly efficient solid phase synthesis of large polypeptides by iterative ligations of bis(2-sulfanylethyl)amido (SEA) peptide segments, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, p. 4061.

- [21] Ollivier N., Desmet R., Drobecq H., Blanpain A., Boll E., Leclercq B., Mougél A., Vicogne J., Melnyk O., A simple and traceless solid phase method simplifies the assembly of large peptides and the access to challenging proteins, *Chem. Sci.*, **2017**, *8*, p. 5362.
- [22] Loth K., Vergnes A., Barreto C., Voisin S. N., Meudal H., Da Silva J., Bressan A., Belmadi N., Bachère E., Aucagne V., Cazevielle C., Marchandin H., Rosa R. D., Bulet P., Touqui L., Delmas A. F., Destoumieux-Garzón D., The Ancestral N-Terminal Domain of Big Defensins Drives Bacterially Triggered Assembly into Antimicrobial Nanonets, *mBio*, **2019**, *10*, e01821.
- [23] Martinez G., Hograindeur J.-P., Voisin S., Abi Nahed R., Abd El Aziz T. M., Escoffier J., Bessonnat J., Fovet C.-M., De Waard M., Hennebicq S., Aucagne V., Ray P. F., Schmitt E., Bulet P., Arnoult C., Spermaurin, an La1-like Peptide from the Venom of the Scorpion *Scorpio Maurus Palmatus*, Improves Sperm Motility and Fertilization in Different Mammalian Species, *Mol. Hum. Reprod.*, **2016**, *23*, p116.
- [24] Zoukimian C., Meudal H., De Waard S., Ouares K. A., Nicolas S., Canepari M., Bérout R., Landon C., De Waard M., Boturn D., Synthesis by Native Chemical Ligation and Characterization of the Scorpion Toxin AmmTx3, *Bioorg. Med. Chem.*, **2019**, *27*, p. 247.
- [25] Giribaldi J., Wilson D., Nicke A., El Hamdaoui Y., Laconde G., Faucherre A., Moha Ou Maati A., Daly N. L., Enjalbal C., Dutertre S., Synthesis, Structure and Biological Activity of CIA and CIB, Two  $\alpha$ -Conotoxins from the Predation-Evoked Venom of *Conus catus*, *Toxins*, **2018**, *10*, p. 222.
- [26] Sanulli S., Justin N., Teissandier A., Ancelin K., Portoso M., Caron M., Michaud A., Lombard B., da Rocha S. T., Offer J., Loew D., Servant N., Wassef M., Burlina F., Gamblin S. J., Heard E., Margueron R., Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation, *Mol. Cell*, **2015**, *5*, p. 769.
- [27] Bouchenna J., Sénéchal M., Drobecq H., Stankovic-Valentin N., Vicogne J., Melnyk O., The Role of the Conserved SUMO-2/3 Cysteine Residue on Domain Structure Investigated Using Protein Chemical Synthesis, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, *30*, p. 2684.
- [28] Bouchenna J., Sénéchal M., Drobecq H., Vicogne J., Melnyk O., Total Chemical Synthesis of All SUMO-2/3 Dimer Combinations, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, *30*, p. 2967.
- [29] Simonneau C., Bérénice Leclercq B. L., Mougél A., Adriaenssens E., Paquet C., Raibaut L., Ollivier N., Drobecq H., Marcoux J., Cianférani S., Tulasne D., de Jonge H., Melnyk O., Vicogne J., Semi-Synthesis of a HGF/SF Kringle One (K1) Domain Scaffold Generates a Potent in Vivo MET Receptor Agonist, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, p. 2110.
- [30] Boehringer R., Kieffer B., Torbeev V., Total Chemical Synthesis and Biophysical Properties of a Designed Soluble 24 KDa Amyloid Analogue, *Chem. Sci.*, **2018**, *9*, p. 5594.
- [31] Bauer V., Schmidtgal B., Gógl G., Dolenc J., Osz J., Kostmann C., Cousido-Siah A., Mitschler A., Travé G., Kieffer B., Torbeev V., Enhancing Binding Affinity of an Intrinsically Disordered Protein by  $\alpha$ -Methylation of Key Amino Acid Residues, *ChemRxiv*, **2020**, DOI: 10.26434/chemrxiv.10113128.v1.

#### Présentation des auteurs :

**Vincent Aucagne** est directeur de recherche au CNRS et responsable de l'équipe « [Aspects Moléculaires du Vivant](#) » et du groupe « [Protéines de Synthèse et Chimie Bio-orthogonale](#) » au Centre de Biophysique Moléculaire (UPR CNRS 4301) à Orléans. **Fabienne Burlina** est directrice de recherche au CNRS et responsable de l'équipe « [Analyse, interactions moléculaires et cellulaires](#) » au Laboratoire des BioMolécules (UMR 7203) à Sorbonne Université, Paris. **Oleg Melnyk** est directeur de recherche au CNRS et responsable de l'équipe « [Biologie Chimique des Vers Plats](#) » au Centre d'infection et d'immunité de Lille (UMR CNRS 9017, INSERM U1019, CHR, Institut Pasteur de Lille). **Vladimir Torbeev** est maître de conférences à l'Université de Strasbourg et directeur du « [Laboratoire de Chimie des Protéines](#) » à l'Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (UMR 7006) de Strasbourg.