

Université de Lille
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, CNRS UMR 9017, INSERM U1019
Institut de Biologie de Lille
Institut Pasteur de Lille
École Doctorale Biologie - Santé de Lille

THÈSE

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université de Lille

Spécialité : Chimie organique

Présentée par

Florent KERDRAON

**UNE APPROCHE DE CHIMIE-BIOLOGIE POUR L'ÉTUDE DU
MÉCANISME D'ACTION DE LA GRANULYSINE 15 kDa**

Soutenue le 29 septembre 2021

Devant le jury composé de :

Président :	Dr Vladimir TORBEEV
Rapporteurs :	Dr Sandrine SAGAN Dr Didier BOTURYN
Examineur :	Dr Aurélie TASIEMSKI
Membre invité :	Dr Muriel PICHAVANT
Directeur de thèse :	Dr Oleg MELNYK

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premiers lieux à l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie le Dr Sandrine SAGAN et le Dr Didier BOTURYN d'avoir accepté d'en être les rapporteurs. Je tiens également à remercier le Dr Aurélie TASIEMSKI et le Dr Vladimir TORBEEV d'avoir accepté de siéger dans ce jury en tant qu'examineurs.

Je remercie le Dr Camille LOCHT et le Dr Jean DUBUISSON pour leur accueil au sein de l'UMR 9017.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier de l'Université de Lille et de l'Agence Nationale pour la Recherche. Je les remercie de m'avoir permis de me consacrer sereinement à ce projet de recherche.

Je remercie ensuite le Dr Oleg MELNYK pour son travail de supervision. Je le remercie pour sa confiance et l'autonomie dont il m'a laissé faire preuve.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr Vangelis AGOURIDAS pour sa confiance et le soutien précieux qu'il m'a témoigné déjà dans les premières années de mon parcours d'étudiant ; au Dr Jérôme VICOONE pour m'avoir guidé dans les expériences de biologie, pour sa disponibilité et ses explications toujours croustillantes ; au Dr Muriel PICHAVANT pour son implication sans faille dans ce projet, pour avoir conduit les nombreux tests d'activité biologique et pour avoir également accepté de faire partie du jury.

Ce travail n'aurait pas pu être mené à bien sans la disponibilité, la bienveillance et l'accueil chaleureux que m'ont témoigné Hervé DROBECQ, Benoît SNELLA, Jennifer BOUCHENNA et Stéphanie CABY. Merci ch'vieux pour la douceur de tes paroles et ta bonne humeur qui n'a d'égale que l'affection inconditionnelle que tu portes aux étudiants. Je mesure ma chance

d'avoir encore pu profiter de ton expérience et je te remercie sincèrement pour tout ce que j'ai pu apprendre à tes cotés. Merci min nin pour ton accueil, tes conseils, ton humour toujours « subtil », pour m'avoir ouvert les portes du Golden et pour ton tampon phosphate ! Niout, à toi aussi un grand merci pour ton accueil, ton aide et ta bienveillance. Allez Bousbecq !! Enfin Steph', un grand merci pour ta disponibilité, ton oreille attentive et tes coups de pouce dans les moments difficiles.

Je tiens également à remercier chacun des membres de l'équipe CBF pour leur participation directe ou indirecte à ce projet. Merci à Romain VAUQUELIN (Rom'Intavis) pour le kilo de segment B dont on ne sait plus que faire. Merci à Benjamin GRAIN, un jour tu feras un mot croisé force 3 tout seul, j'en suis convaincu ! Merci à Roland BOURETTE, Rémi DESMET, Vincent DIEMER, Olga FIRSTOVA, Vincent GIROD, Julien LANCELOT, Alexandra MOUGEL, Nathalie OLLIVIER, Magalie SENECHAL mais également à Reda MHIDIA et Julien DHEUR pour vos conseils, votre aide et votre écoute.

Je remercie également Gemma BOGARD et Teddy GRANDJEAN pour leur travail de caractérisation biologique ainsi que Sophie SLOMEZ-DESNOULEZ pour la formation à la microscopie confocale et sa disponibilité pour le traitement des images. Merci également à la team CBA : Ruben HARTKOORN, pour ses précieux conseils et sa relecture de mes lettres de motivation, mais aussi Thibault, Eva, Sushi, J-C, Ravil et Ernesto.

Enfin je terminerais par remercier mes proches et tous ceux dont la compagnie a contribué à rendre ces trois années plus douces : ma mère, Valentin, Julia, les D-mineurs (Jean, Philippe et Etienne), les copains de LEMCA et du vélo.

Table des matières

Liste des abréviations	6
Résumé	10
Abstract	12
Chapitre 1. La synthèse totale des protéines, un outil puissant au service de la compréhension des mécanismes biologiques.	13
1. La synthèse chimique des protéines, de la synthèse pas à pas à la ligation chimique....	14
2. La diversité des chimies de ligation pour la production de polypeptides linéaires.....	18
2.1. Aperçu des méthodologies existantes	18
2.2. La NCL	22
2.3. Quelques extensions récentes de la NCL	25
3. Stratégies d'assemblages des protéines via NCL	29
3.1. Assemblage de la direction N vers C	29
3.2. Assemblage de la direction C vers N	31
4. Repliement <i>in vitro</i> des protéines synthétisées par voie chimique.....	33
4.1. Repliement des protéines hydrosolubles.....	33
4.2. Repliement oxydant des protéines riches en cystéines	37
Chapitre 2. La granulysine, une protéine clé de l'immunité.....	42
1. Structure et localisation de la granulysine	42
2. Action cytotoxique de la granulysine	47
2.1. Activité antimicrobienne de la 9-GN	47
2.2. Action de la 9-GN sur les cellules tumorales	50
2.3. Débat sur l'activité cytotoxique de la 15-GN.....	52
3. Autres activités de la granulysine dans la réponse immunitaire	54
3.1. Induction de différenciation cellulaire provoquée par la 15-GN	54
3.2. Activité chimiotactique de la 9-GN.....	55
3.3. Activité chimiotactique de la 15-GN.....	55
3.4. Induction de l'expression de facteurs proinflammatoires par la 9-GN.....	56
3.5. Induction de l'expression de facteurs proinflammatoires par la 15-GN.....	56
4. La granulysine comme marqueur de plusieurs pathologies	60
4.1. Maladies infectieuses	60
4.2. Cancers	61

4.3.	Transplantations	62
4.4.	Maladies de peau	63
4.5.	Affections reproductives	63
5.	Intérêts thérapeutiques de la granulysine et limites	64
5.1.	La 9-GN comme agent anticancéreux	65
5.2.	Des peptides dérivés de la 9-GN comme agent antimicrobiens	65
5.3.	Limites.....	70
Chapitre 3. Développement d'un procédé de synthèse totale de la granulysine 15 kDa		73
1.	Intérêt du développement d'un procédé de synthèse chimique de la 15-GN	73
2.	Synthèse chimique du polypeptide 15-GN linéaire (15-GN-I)	79
2.1.	Découpage de la séquence et choix du sens de synthèse.....	79
2.2.	Optimisation de la synthèse sur support solide du segment B.....	81
2.3.	Description du procédé de synthèse de la 15-GN-I	82
3.	Repliement de la 15-GN linéaire	86
4.	Caractérisation structurale de la 15-GN synthétique	96
5.	Activités biologiques de la 15-GN synthétique	99
5.1.	Chimiotaxie	99
5.2.	Activité antibactérienne	103
Chapitre 4. Synthèse et caractérisation d'une chimiothèque d'analogues pour l'étude des relations structure-activité de la 15-GN.....		108
1.	Synthèse et caractérisation de fragments de la 15-GN	108
1.1.	Synthèse de la granulysine 9 kDa (9-GN)	109
1.1.1.	Synthèse et repliement	109
1.1.2.	Caractérisation structurale.....	114
1.1.3.	Activité biologique.....	115
1.2.	Synthèse de l'extrémité N-terminale de la 15-GN (N-ter _{15-GN})	117
1.3.	Synthèse de l'extrémité C-terminale de la 15-GN (C-ter _{15-GN})	121
1.4.	Etude en dichroïsme circulaire	122
1.5.	Activités biologiques.....	126
1.5.1.	Comparaison des activités chimiotactique de 15-GN-f , 9-GN-f et N-ter_{15-GN-f}126	
1.5.2.	Comparaison des activités immunomodulatrices de 15-GN-f , 9-GN-f et N-ter_{15-GN-f} 128	
2.	Synthèse et caractérisation d'analogues pour l'étude du repliement de la 15-GN et de l'implication des cystéines dans sa structure et ses fonctions.	132
2.1.	Synthèse et caractérisation de la granulysine 15 kDa Y66C (15-GN _{Y66C}).....	133
2.1.1.	Synthèse et repliement	133

2.1.2. Activité biologique.....	140
2.2. Synthèse et caractérisation de la granulysine 15 kDa C138A (15-GN _{C138A}).....	144
2.3. Synthèse et caractérisation de la granulysine 15 kDa APA (15-GN _{APA}).....	149
2.3.1. Synthèse et repliement	149
2.3.2. Activité biologique.....	153
Chapitre 5. Recherche d'un récepteur de la 15-GN.....	157
1. Synthèse et caractérisation d'un analogue biotinylé de la 15-GN.....	158
1.1. Synthèse et repliement	158
1.2. Caractérisation structurale	162
1.3. Activité biologique	163
2. Confirmation de l'existence d'un ou plusieurs partenaires de liaison.....	165
2.1. Cytométrie en flux	165
2.2. Fractionnement cellulaire.....	169
2.3. Microscopie confocale.....	171
3. Recherche de nouveaux partenaires d'interaction.....	179
Chapitre 6. Développement d'un nouveau catalyseur alkylséléniol pour la réaction d'échange thiol/thioester.....	187
1. Introduction.....	187
2. Synthèse des catalyseurs.....	190
3. Etude cinétique	190
4. Essais d'application à la synthèse de protéines en phase solide	196
5. Application à la synthèse de la granulysine 15 kDa	201
Conclusions et perspectives	206
Rappel des références bibliographiques.....	209
Annexes	221

Liste des abréviations

3D	Tridimensionnel
9-GN	Granulysine 9 kDa
15-GN	Granulysine 15 kDa
Ac.	Acide
AcA	Acétoacétyle
AcA-MTG	Acétoacétylmethylthioglycolate
ACKR	Récepteurs atypiques aux chimiokines
Acm	Acétamidométhyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Facteur d'induction de l'apoptose
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
biot	Biotine
BMC	Dithiol (\pm)-trans-1,2- <i>bis</i> (2-mercaptoacetamido)cyclohexane
BSA	Albumine de sérum bovin
CCL	Chimiokine à motif C-C
CCR	Récepteur aux chimiokines à motif C-C
CD	Dichroïsme circulaire
CFU	Unité formant colonie
CI	Inhibiteur de chymotrypsine
CPC	Motif Cys-Pro-Cys
C-ter	C-terminal
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CXCL	Chimiokine à motif C-X-C
CXCR	Récepteur aux chimiokines à motif C-X-C

DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DTT	Dithiothréitol
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with death domain</i>
Fas	Récepteur associé au fibroblast
Fas-ligand	Ligand du récepteur Fas
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbone
GFP	Protéine fluorescente verte
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes et de macrophages
GP	Groupement protecteur
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GPR	Récepteur orphelin aux chimiokines couplé aux protéines G
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfure
GST	Glutathion S-transférase
GZ	Granzymes
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen - DR isotype</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1</i>
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IFN	Interféron
IL	Interleukine
JNK	Kinase c-Jun N-terminales
K1	Domaine kringle 1
KAHA	Cétoacide-hydroxylamine
KO	<i>Knocked out</i> (Invalidé)
LC-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
LPS	Lipopolysaccharides
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight</i>
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>

MCT	Transporteur de monocarboxylate
MesNa	2-sulfanyléthanesulfonate de sodium
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MPA	Acide 3-mercaptopropionique
MPAA	Acide 4-mercaptophénylacétique
MUC	Mucine
MWR	Ellipticité moyenne par résidu
MyD88	Réponse primaire de différenciation myéloïde 88
Na/K ATPase	Pompe sodium-potassium
NCL	Ligation chimique native
NK	<i>Natural killer</i>
NRP2	Neuropiline 2
N-ter	N-terminal
p38 MAPK	Protéines kinases activées par les mitogènes p38
PBS	Tampon phosphate salin
PCS	<i>Protein Chemical Synthesis Database</i>
PDI	Protéine disulfure isomérase
PF	Perforine
pH	Potentiel hydrogène
pKa	Constante logarithmique d'acidité
PKC	Protéine kinase C
PMA	Paraméthoxyamphétamine
RAGE	<i>Advanced glycosylation end products receptor</i>
Red.	Réducteur
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RPMI	Milieu Roswell Park Memorial Institute
RTD-1	rhésus θ -defensine 1
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SEA	<i>bis(2-sulfanyléthyl)amido</i>
SEAoff	motif <i>bis(2-sulfanyléthyl)amido oxydé</i>

SEAon	motif <i>bis</i> (2-sulfanylethyl)amido réduit
siRNA	Petit ARN interférent
SPPS	Synthèse de peptides en phase solide
STL	Ligation sérine/thréonine
t-BuSH	<i>tert</i> -butylthiole
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TFA	Acide trifluoroacétique
Thz	Thiazolidine
TLR	Récepteur Toll-like
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TNF-R	Récepteur de TNF
tR	Temps de rétention
UPLC-MS	Chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse
UV	Ultraviolet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Résumé

La granulysine est une protéine sécrétée par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK en réponse à une infection chez l'humain. Elle est exprimée par ces cellules sous la forme d'une protéine de 15 kDa (15-GN) dont la maturation protéolytique conduit à une isoforme plus courte de 9 kDa (9-GN). La 9-GN est principalement cytotoxique et capable de tuer un grand nombre d'agents pathogènes comme les bactéries, les champignons, les virus ou les cellules tumorales. La 15-GN, longtemps considérée comme un simple précurseur de la 9-GN, est quant à elle dotée d'activités de type « alarmine immunitaire » et provoque l'activation, la maturation et la migration de différentes populations de cellules immunitaires. De nombreux travaux ont rapporté de précieuses informations sur la localisation, la structure et les fonctions de la 9-GN tandis que l'étude de la 15-GN est encore entourée de nombreuses zones d'ombre. De surcroît, cette protéine est extrêmement difficile à produire par les techniques recombinantes et toute entreprise de compréhension de ses propriétés structurales et biologiques s'en retrouve grandement compliquée. Face à cela, les méthodologies de synthèse chimique des protéines se révèlent être un atout précieux pour l'étude de la granulysine 15 kDa. En plus de rendre possible sa synthèse, les méthodes chimiques permettent l'introduction précise de modifications pour l'étude des relations structure-fonction de cette protéine et pour générer des outils moléculaires utiles pour élucider son mécanisme d'action.

Après un premier chapitre introductif présentant les grandes méthodes de synthèse chimique des protéines et leurs apports à l'étude de protéines d'intérêt biologique, un état des connaissances exhaustif sur la granulysine sera dressé. S'en suivront quatre chapitres rapportant les résultats collectés au cours de cette étude. Le premier chapitre présentera les différentes optimisations qui ont conduit au développement d'un procédé de synthèse chimique de la 15-GN. Le deuxième chapitre présentera la synthèse d'une série d'analogues de la 15-GN pour l'étude des relations structure-fonction de cette protéine. Le troisième chapitre détaillera l'approche adoptée pour la recherche de partenaires d'interaction de la

15-GN au moyen d'un analogue biotinylé. Enfin, le dernier chapitre se focalisera sur le développement d'un catalyseur de la réaction d'échange thiol/thioester ; un outil précieux pour la synthèse de la 15-GN et plus largement pour le domaine de la chimie de ligation.

Abstract

Granulysin is a human protein secreted by cytotoxic T lymphocytes and NK cells in response to infections. It is expressed by these cells as a 15 kDa protein (15-GN) whose proteolytic processing leads to a shorter 9 kDa isoform (9-GN). 9-GN is broadly cytotoxic and capable of killing various bacteria, fungi, viruses and cancer cells. Originally thought as a 9-GN precursor, 15-GN actually features alarmine properties and causes activation, maturation and migration of different immune cells. Number of studies have reported precious information on the localization, the structure and the functions of 9-GN while many grey areas remain on 15-GN study. In addition, the production of this protein in recombinant systems is extremely difficult and every attempt to understand its structural and biological properties is thus complicated. In this context, chemical protein synthesis proves to be a valuable asset for the study of 15 kDa granulysin. Furthermore, chemical methods allow the precise introduction of modifications to study the structure-function relationships of this protein and to generate molecular tools to elucidate its mechanism of action.

Following an opening chapter on main methods for chemical protein synthesis and their contribution to the study of biologically relevant proteins, an exhaustive state of knowledge on granulysin will be drawn up. Four chapters will follow, reporting the results collected during this study. A first one will present the various optimizations conducted toward the development of a chemical process for native 15-GN synthesis. A second will present the synthesis of an analog library designed to study the structure-function relationships of this protein. In a third chapter the search for interaction partners of 15-GN by means of a biotinylated analog will be reported. Finally, the last chapter will focus on the development of a catalyst for the thiol/thioester exchange reaction; a valuable tool for the synthesis of 15-GN and for the field of ligation chemistry.

Chapitre 1. La synthèse totale des protéines, un outil puissant au service de la compréhension des mécanismes biologiques.

Déchiffrer les mécanismes moléculaires qui contrôlent la structure des protéines, leurs fonctions, la dynamique de leur repliement ainsi que leurs interactions constitue l'un des défis les plus ambitieux de l'ère post-génomique. La compréhension précise des propriétés des protéines contribue à mettre ces macromolécules biologiques au service des scientifiques, leur apprenant à utiliser les règles de la nature pour concevoir de nouvelles protéines aux propriétés et fonctions spécifiques. Notre capacité à synthétiser des protéines par voie chimique et à modifier leur structure constitue un outil puissant dans la poursuite de cet objectif. Jusqu'à présent, les techniques recombinantes se sont illustrées dans la préparation d'un grand nombre de protéines naturelles et modifiées, permettant l'étude de leurs propriétés et de leur comportement. Cependant, le génie biologique connaît certaines limites principalement dues à la barrière du code génétique qui ne tolère que l'introduction d'acides aminés canoniques et peine à contrôler l'introduction de modifications sur des sites spécifiques. De façon complémentaire, la synthèse chimique apparaît comme une alternative viable pour la préparation et la modification des protéines. Elle présente l'avantage d'assurer un contrôle strict de leur composition et de fournir un niveau unique de spécificité pour l'introduction de modifications.

1. La synthèse chimique des protéines, de la synthèse pas à pas à la ligation chimique

Depuis la première synthèse d'un peptide en solution accomplie par Emil Fisher au début du XX^{ème} siècle,¹ la synthèse chimique de peptides et de protéines a connu des avancées considérables et apparaît comme une approche puissante pour la préparation de ces biomolécules. Un tournant majeur dans le développement de stratégies chimiques pour la synthèse totale de protéines est l'introduction en 1963 par Bruce Merrifield de la synthèse pas à pas de peptides sur support solide (SPPS).²

En SPPS, le peptide est élongué sur une bille de polymère insoluble. La chaîne latérale et l'amine - α de chaque acide aminé utilisé sont protégées (Figure 1). La synthèse est conduite de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale et débute par l'ancrage covalent du résidu C-terminal du peptide cible au support polymérique insoluble. Des cycles répétés de déprotection de l'amine - α du dernier résidu introduit et de couplage avec une forme activée de l'acide aminé suivant permettent l'assemblage complet du peptide sur le support. Après élongation, tous les groupes protecteurs des chaînes latérales sont retirés en même temps que le lien entre le peptide et son support est clivé conduisant au peptide complètement déprotégé en solution. Comme la chaîne en croissance reste liée à la résine durant l'intégralité de la synthèse, de simples étapes de filtration et de lavage avec un solvant organique à l'issue de chaque étape facilitent grandement les purifications intermédiaires. Les réactions sont conduites avec un large excès de réactif et sont donc rapides et leur rendement est généralement élevé. De nombreux exemples de synthèse de protéines employant cette méthode ont été rapportés comme celle de la ribonucléase A (124 résidus)³, de l'aspartyle protéase du VIH-1 (99 résidus par chaîne)^{4,5,6,7}, de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique

¹ Fischer, E.; Fourneau, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2868-2877.

² Merrifield, B. R. *J Am Chem Soc* **1963**, *85*, 2149-2154.

³ Gutte, B.; Merrifield, B. R. *J Biol Chem* **1971**, *246*, 1722-1741.

⁴ Schneider, J.; Kent, S. B. *Cell* **1988**, *54*, 363-368.

⁵ Nutt, R. F.; Brady, S. F.; Darke, P. L.; Ciccarone, T. M.; Colton, C. D.; Nutt, E. M.; Rodkey, J. A.; Bennett, C. D.; Waxman, L. H.; Sigal, I. S.; Anderson, P. A.; Veber, D. F. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**, *85*, 7129-7133.

⁶ Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskolski, M.; Sathyanarayana, B. K.; Baldwin, E.; Weber, I. T.; Selk, L. M.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S. B. *Science* **1989**, *245*, 616-621.

⁷ Milton, R. C.; Milton, S. C.; Kent, S. B. *Science* **1992**, *256*, 1445-1448.

bovine et ses analogues (58 résidus).^{8,9,10} Notre capacité à assembler des protéines entières par SPPS est cependant limitée par l'efficacité de chacune des réactions mises en jeu. Bien que chaque étape soit créditée d'un haut rendement, l'inévitable accumulation de sous-produits oblige à limiter la taille de la chaîne à environ 50 acides aminés pour garantir une pureté élevée à l'issue de sa synthèse. Pour outrepasser cette limite et accéder à des chaînes polypeptidiques plus longues, la SPPS peut se combiner avec une approche synthétique complémentaire.

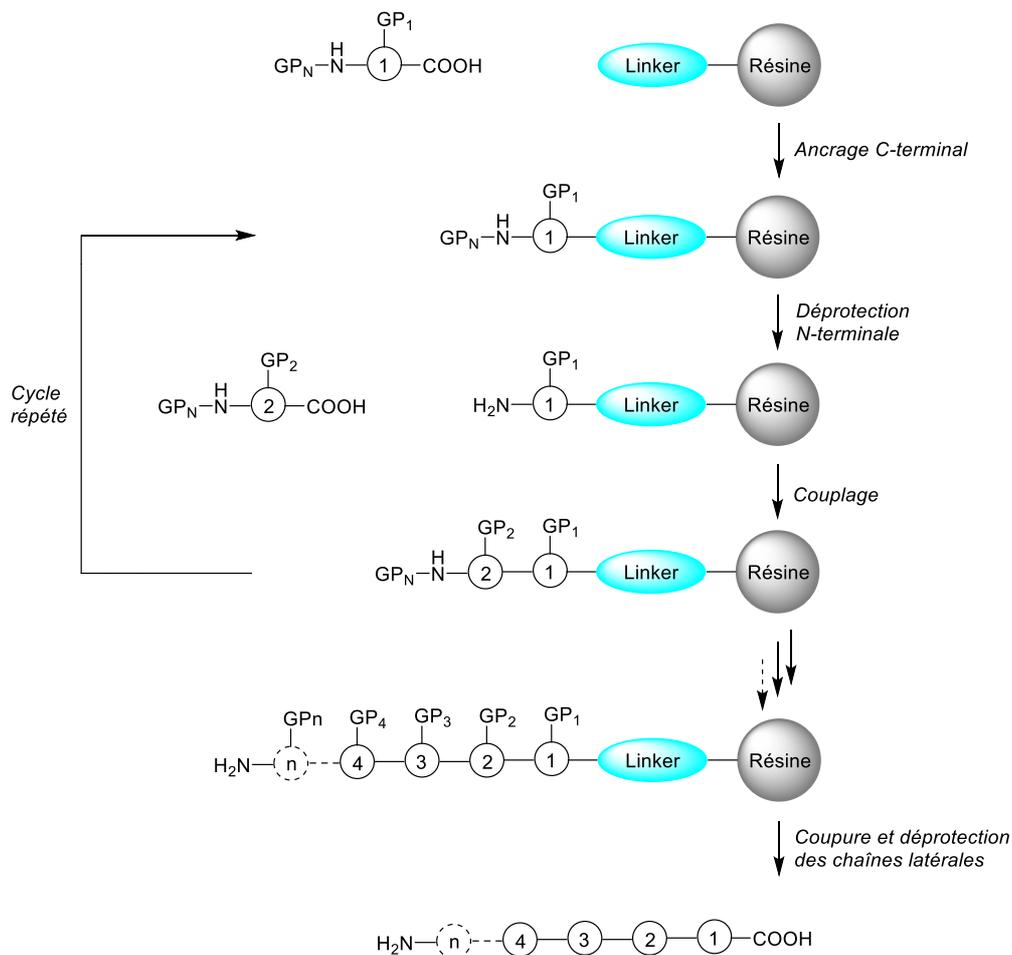


Figure 1. Représentation schématique de la synthèse de peptides sur support solide. GP = groupe protecteur

La synthèse convergente consiste en la condensation séquentielle de petits segments peptidiques protégés en solvant organique pour obtenir une chaîne polypeptidique plus

⁸ Ferrer, M.; Barany, G.; Woodward, C. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13974-13981.

⁹ Pan, H.; Barbar, E.; Baranay, G.; Woodward, C. *Nat Struct Biol* **1995**, *2*, 211-217.

¹⁰ Ferre, M.; Woodward, C.; Barany, G. *Int J Pept Protein Res* **1992**, *40*, 194-207.

longue (Figure 2). L'insuline humaine (51 résidus) et une série d'analogues,¹¹ la ribonucléase A (124 résidus)¹² et un analogue d'un lysozyme aviaire (129 résidus)¹³ ont été quelques-unes des premières protéines préparées chimiquement par synthèse convergente. Bien que la synthèse convergente permette la préparation de nombreuses protéines, elle s'avère ardue et laborieuse. En effet, cette stratégie souffre de sa technicité et du faible rendement de préparation des segments protégés, de leur purification et de leur condensation. Le haut niveau de compétence requis, l'absence d'homogénéité chirale et la faible solubilité des peptides entièrement protégés ont conduit à l'abandon de la synthèse convergente en solution. Une solution alternative est arrivée au début des années 90 avec l'apparition d'une première méthodologie nouvelle et révolutionnaire de ligation chimique.¹⁴

¹¹ Sieber, P.; Eisler, K.; Kamber, B.; Riniker, B.; Rittel, W.; Marki, F.; de Gasparo, M. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1978**, 359, 113-123.

¹² Yajima, H.; Fujii, N. *Biopolymers* **1981**, 20, 1859-1867.

¹³ Kenner, G. W. *Proc R Soc Lond Biol Sci* **1977**, 197, 237-253.

¹⁴ Schnolzer, M.; Kent, S. B. *Science* **1992**, 256, 221-225.

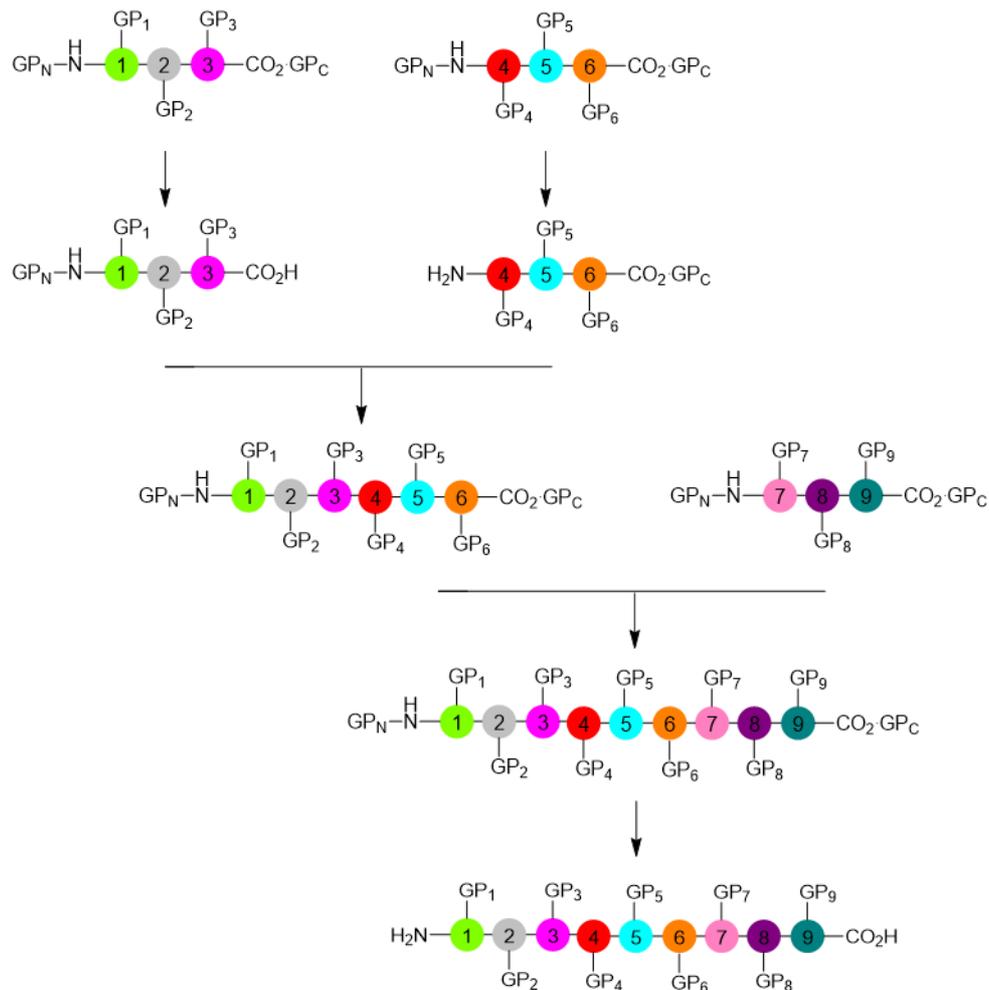


Figure 2. Préparation d'un polypeptide par synthèse chimique convergente en solution

L'approche fondée sur la ligation chimique consiste en la préparation d'un polypeptide par assemblage séquentiel de courts segments peptidiques complètement déprotégés. Dans ce but, elle exploite une réaction chimiosélective entre deux fonctions réactives placées l'une à l'extrémité C-terminale d'un premier peptide et l'autre à l'extrémité N-terminale de son partenaire de ligation. Ces fonctions réagissent entre elles et forment un lien chimique stable sans réagir avec aucune des autres fonctions présentes sur la chaîne. L'utilisation de peptides déprotégés permet aux réactions de ligation d'être conduites en conditions douces et généralement en milieu aqueux. Ce stratagème synthétique a permis un essor considérable de la synthèse et de la modification chimique des protéines. Les peptides synthétiques peuvent porter pléthore de modifications chimiques et permettre l'introduction sélective d'éléments non naturels dans les protéines. Synthétisées par voie chimique, les protéines sont plus facilement caractérisables et permettent d'approfondir l'étude de leurs fonctions. Les

protéines synthétiques trouvent de nombreuses applications en biochimie, biotechnologie, biophysique et chimie-biologie. En pharmacologie, la synthèse chimique de protéines thérapeutiques offre pour bénéfice majeur l'homogénéité et la pureté des échantillons.^{15,16} Historiquement, les premières méthodologies de ligation développées ne conduisaient pas à la formation d'un lien peptidique natif mais autorisaient déjà la préparation de macromolécules isostères et d'intérêt biologique comme la protéase du VIH-1¹⁴, son dimère¹⁷, l'hétérodimère covalent du facteur de transcription b/HLH/Z cMyc-Max¹⁸, une protéine synthétique « template-assembled » constituée de 4 hélices α ¹⁹ et un domaine modèle de la fibronectine replié en β -sandwich.²⁰ Ces travaux sont rapportés ici à titre d'exemple. Dans la suite de ce manuscrit, seules les méthodologies permettant l'accès à un lien peptidique natif et développées ultérieurement seront discutées.

2. La diversité des chimies de ligation pour la production de polypeptides linéaires

2.1. Aperçu des méthodologies existantes

Le répertoire des méthodologies de ligation chimique constitue une excellente plateforme pour la préparation de protéines et de conjugués avec une excellente pureté. La chimie de ligation idéale se doit d'être hautement sélective, compatible avec tous les groupes fonctionnels présents dans les protéines et doit pouvoir être mise en œuvre en milieu aqueux et en conditions douces. Des efforts considérables ont conduit au développement d'un portfolio de ligations chimiosélectives. Ces ligations chimiques se différencient avant tout par la nature du lien chimique qui unit les deux partenaires de ligation à l'issue de la réaction. Bien que les chimies permettant la formation d'un lien amide soient traditionnellement préférées, celles qui conduisent à un lien non-peptidique au site de ligation sont également des approches attractives lorsqu'un lien non naturel n'affecte pas la structure de la protéine.

¹⁵ Walsh, G.; Jefferis, R. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 1241-1252.

¹⁶ Walsh, G. *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 992-100.

¹⁷ Baca, M.; Muir, T. W.; Schnolzer, M.; Kent, S. B. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 10797-10798.

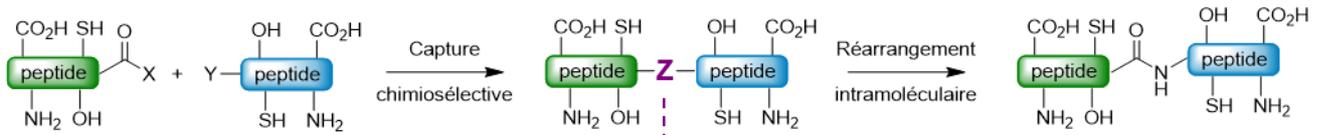
¹⁸ Canne, L. E.; Ferredamare, A. R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H. *J Am Chem Soc* **1995**, *117*, 2998-3007.

¹⁹ Dawson, P. E.; Kent, S. B. H. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 7263-7266.

²⁰ Williams, M. J.; Muir, T. W.; Ginsberg, M. H.; Kent, S. B. H. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 10797-10798.

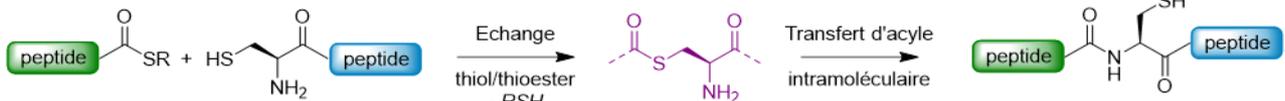
Les méthodes décrites ci-après conduisent exclusivement à la formation d'un lien peptidique natif. La clé de ces réactions réside dans la capacité du lien amide à être formé par un réarrangement intramoléculaire à la suite d'une étape de capture chimiosélective. (Figure 3) Une classification de ces méthodes en trois catégories est ici proposée. Elle s'appuie sur la position du ou des groupes fonctionnels impliqués dans l'étape de capture. Les méthodes de type I impliquent la participation de la chaîne latérale dans l'étape de capture (Figure 3 B) tandis que les méthodes de type II s'appuient sur la réactivité d'un groupement localisé sur l'azote α (Figure 3 C). Les méthodes de type III impliquent quant à elles à la fois l'azote α et la chaîne latérale (Figure 3 D).

A) Principe général des réactions de ligation pour la formation chimiosélective d'un lien peptidique



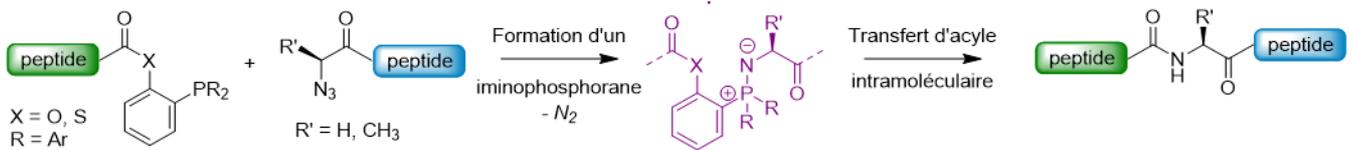
B) Type I (chaîne latérale)

Ligation chimique native (NCL)

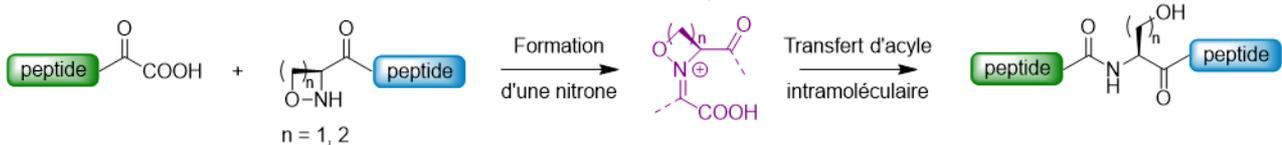


C) Type II (azote- α)

Ligation Traceless Staudinger



Ligation cétoacétique-hydroxylamine (KAHA)



D) Type III (azote- α et chaîne latérale)

Ligation Sérine/Thréonine (STL)

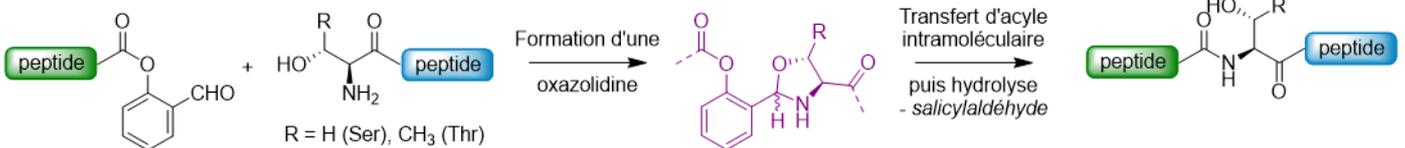


Figure 3. Principe de la formation d'un lien peptidique par capture chimiosélective puis réarrangement intramoléculaire. Les méthodes sont classées en fonction de la position des groupes fonctionnels impliqués dans l'étape de capture : type I, chaîne latérale, type II, azote α , type II azote α et chaîne latérale. A) Type I, NCL. B) Type II, KAHA, traceless Staudinger. C) Type III STL.

La ligation chimique native (NCL) est une ligation de type I (Figure 3 B).^{21,22} Introduite en 1994 par Kent et ses collaborateurs, cette réaction entraîne le couplage d'un peptide thioester C-terminal avec un peptide fonctionnalisé par un résidu cystéinyle à l'extrémité N-terminale. Pour la NCL, l'étape de capture est une réaction d'échange thiol-thioester impliquant la fonction thioester et la fonction thiol en chaîne latérale du résidu de cystéine. L'intermédiaire

²¹ Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, *266*, 776-779.

²² Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Diemer, V.; Cargoët, M.; Monbaliu, J. M.; Melnyk, O. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 7328-7443.

thioester ainsi généré se réarrange spontanément par transfert d'acyle intramoléculaire de l'atome de soufre vers l'atome d'azote (*S* vers *N*) pour former un lien peptidique natif à la cystéine.

La ligation traceless Staudinger, rapportée en 2000, appartient à la catégorie des ligations de type II (Figure 3).^{23,24} Dans ce cas, l'étape de capture s'appuie sur la réaction chimiosélective d'une phosphine avec un segment azoture pour produire un intermédiaire iminophosphorane. Ce dernier évolue spontanément vers un lien peptidique natif par migration du groupement acyle suivi d'une hydrolyse. La ligation cétoacide-hydroxylamine (KAHA) est aussi de type II et a été introduite en 2006.²⁵ Le groupe cétoacide C-terminal et l'hydroxylamine N-terminale se combinent chimiosélectivement pour produire un intermédiaire nitroène. Celui-ci subit un processus de réarrangement/décarboxylation qui conduit à la formation du lien peptidique natif.

La ligation serine/thréonine (STL) appartient, elle, aux méthodes de type III et a été décrite en 2013.²⁶ La STL s'inspire de la ligation pseudoproline développée par l'équipe de Tam dans les années 90.^{27,28,29} Elle procède *via* la formation chimiosélective d'un intermédiaire oxazolidine par réaction d'un aldéhyde avec le groupe β -amino alcool d'une sérine ou d'une thréonine N-terminale. Le transfert d'acyle intramoléculaire et l'hydrolyse de l'oxazolidine conduisent au peptide cible avec un lien natif à la sérine ou à la thréonine.

Une revue récente de la littérature a mis en avant l'augmentation importante du nombre de protéines synthétisées par voie chimique depuis 2010 (Figure 4).³⁰ Il convient également de remarquer qu'une très large majorité des jonctions réalisées pour l'assemblage de protéines entre 2011 et 2020 l'ont été grâce à la NCL et les méthodes apparentées.

²³ Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.

²⁴ Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941.

²⁵ Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D.. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248-1252.

²⁶ Zhang, Y.; Xu, C.; Lam, H. Y.; Lee, C. L.; Li, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 6657-6662.

²⁷ Liu, C. F.; Tam, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 6584-6588.

²⁸ Tam, J. P.; Miao, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9013-9022.

²⁹ Tam, J. P.; Rao, C.; Liu, C. F.; Shao, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 209-216.

³⁰ Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Cargoët, M.; Melnyk, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4938-4945.

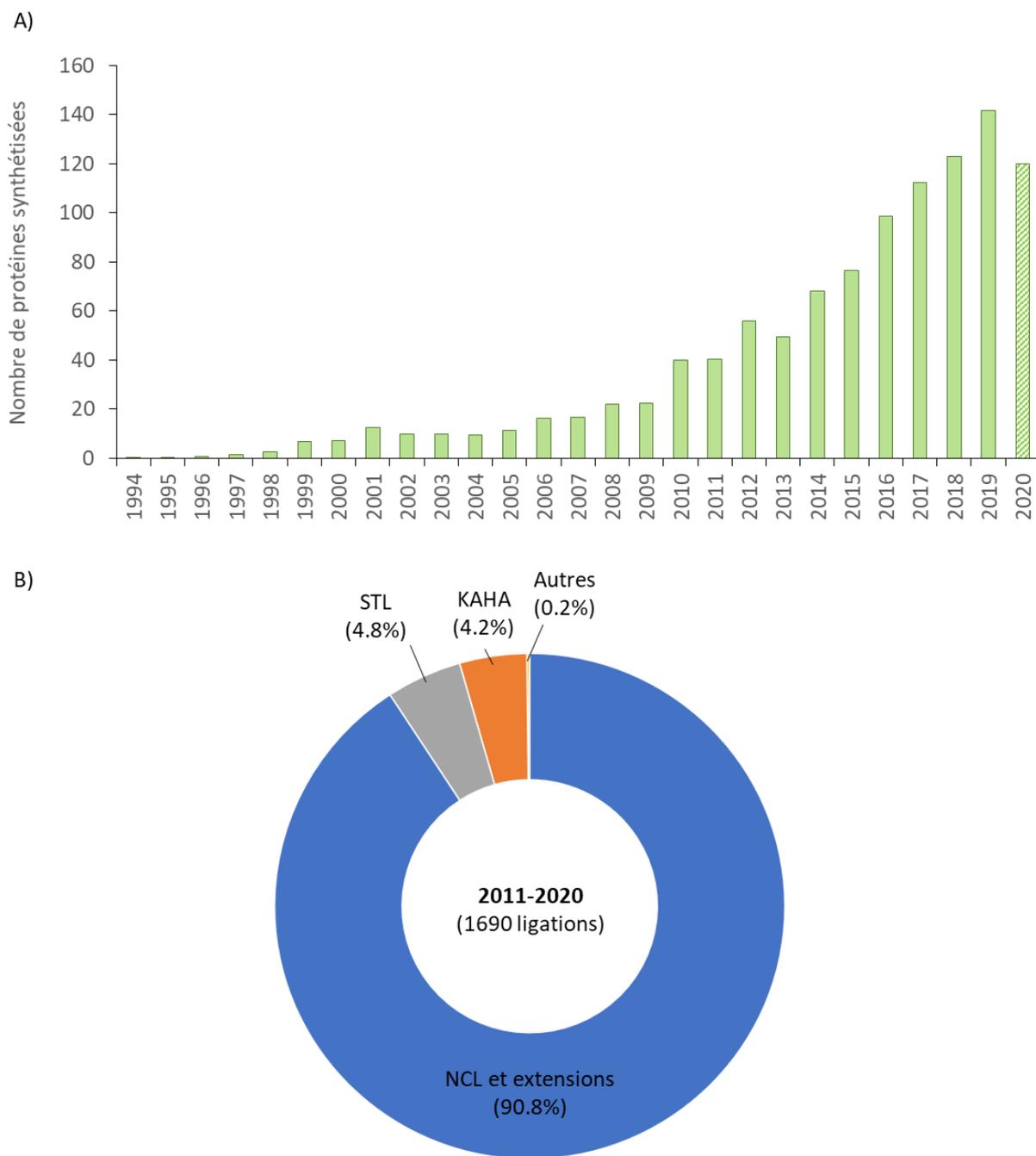


Figure 4. A) Nombre de protéines préparées par synthèse chimique par an depuis 1994. B) Usage des différentes ligations chimiosélectives pour la préparation de protéines (% des jonctions formées entre 2011 et 2020). Adapté de Agouridas, V. et al. *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 15140-15152.

2.2. La NCL

La découverte de la NCL découle de plus de 50 années d'efforts intenses à travers le monde visant à élucider le rôle des thioesters en biochimie et à étendre leur utilisation en synthèse organique. Un important jalon a été la mise en évidence du rôle clé de la chimie des thioesters

chez les organismes vivants. En 1951 et alors qu'ils étudiaient la biosynthèse des lipides³¹, Lynen et Reichert découvrent la structure thioester du S-acétyl coenzyme A.³² Le fait que ces molécules soient utilisées par les cellules comme des intermédiaires riches en énergie a stimulé des efforts considérables pour comprendre les propriétés structurales et chimiques des thioesters. En particulier, l'utilisation par les cellules du S-acétyl coenzyme A comme donneur d'acyl incite Wieland à étudier la formation de liens amides en conditions biomimétiques et exploitant la réactivité unique d' α -aminoacide thiophénylesters.^{33,34,35} De tels thioesters d'acides aminés permettent le couplage peptidique en conditions très douces. De plus, Wieland réalise que la réaction en solution aqueuse et à pH > 7 est particulièrement efficace avec la cystéine en comparaison à celle réalisée en présence d'autres aminoacides (Schéma 1).³⁶ Il attribue l'excellente réactivité de la cystéine à la formation rapide d'un intermédiaire thioester par échange thiol-thioester suivi d'un transfert intramoléculaire du groupe aminoacyle de l'atome de soufre vers l'atome d'azote.

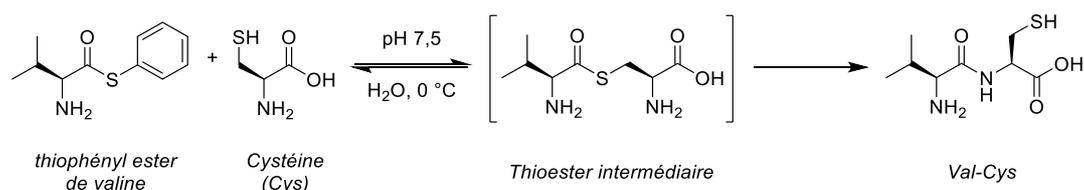


Schéma 1 Synthèse du dipeptide Val-Cys par réaction du thiophényl ester de valine et de la cystéine dans l'eau par Wieland et al..³⁶

À la suite des travaux pionniers de Wieland³⁶ et Brenner^{37,38} sur la formation de liens peptidiques par transfert d'acyl intramoléculaire induit par proximité spatiale, les travaux

³¹ Kresge, N.; Simoni, R. D.; Hill, R. L. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, e6-e7.

³² Lynen, F.; Reichert, E. *Angew. Chem.* **1951**, *63*, 47-48.

³³ Wieland, T.; Schäfer, W. *Angew. Chem.* **1951**, *63*, 146-147.

³⁴ Wieland, T.; Schäfer, W.; Bokelmann, E. *Liebigs Ann.* **1951**, *573*, 99-104.

³⁵ Wieland, T.; Schäfer, W. *Liebigs Ann.* **1952**, *576*, 104-109.

³⁶ Wieland, T.; Bokelmann, E.; Bauer, L.; Lang, H. U.; Lau, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-148.

³⁷ Brenner, M.; Zimmermann, J. P.; Wehrmüller, J.; Quitt, P.; Photaki, I. *Experientia* **1955**, *11*, 397-399.

³⁸ Brenner, M.; Zimmermann, J. P. *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 467-470.

révolutionnaires des équipes de Kemp,^{39,40,41} Kent^{42,43} et Tam ^{44,45} ont approfondi le développement de la capture sélective et du transfert d'acyle établissant ainsi les principes de base impliqués dans la NCL et dans toutes les autres ligations chimiosélectives qui ont ensuite émergé.

Depuis 1994, la NCL a trouvé un vaste éventail d'applications synthétiques en chimie-biologie, en chimie médicinale et en science des matériaux. Plus spécifiquement, la synergie entre la NCL et la SPPS a largement contribué à orienter son utilisation vers la synthèse chimique de peptides et de protéines.⁴⁶ D'après la base de données PCS, plus de 1000 protéines d'intérêt biologique ont été synthétisées en utilisant la NCL et les méthodologies apparentées. Les avancées continues et significatives dans le domaine ont récemment atteint un sommet avec la description d'objets synthétiques de taille exceptionnelle comme des analogues fonctionnels de polymérases bactériennes (env. 350 résidus).^{47,48} Au-delà de leur taille, la diversité des cibles reflète également le caractère polyvalent des approches chimiques fondées sur la NCL pour accéder à des protéines qui ne peuvent être produites par les systèmes recombinants qu'avec de grandes difficultés. Parmi elles, les peptides cycliques ont fait l'objet de nombreuses études synthétiques.²² Par exemple, Li *et al.* ont balayé l'intégralité de la séquence de la θ -défensine RTD-1 en construisant une chimiothèque de plus de 100 variants grâce à la NCL.⁴⁹ En parallèle, la synthèse d'architectures branchées (poly)ubiquitylées et sumoylées peut être facilitée par des approches de ligation fournissant un contrôle total du nombre d'unités connectées et de leur site de liaison.²² D'autres modifications post-traductionnelles sont également accessibles et bien documentées dans la littérature. On y trouve des exemples de protéines glycosylées, phosphorylées, acétylées,

³⁹ Kemp, D. S.; Vellaccio, F., Jr. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3003-3004.

⁴⁰ Kemp, D. S.; Grattan, J. A.; Reczek, J. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3465-3466.

⁴¹ Fotouhi, N.; Bowen, B. R.; Kemp, D. S. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 141-147.

⁴² Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, *266*, 776-779.

⁴³ Schnolzer, M.; Kent, S. B. H. *Science* **1992**, *256*, 221-225.

⁴⁴ Liu, C. F.; Tam, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 6584-6588.

⁴⁵ Tam, J. P.; Lu, Y. A.; Liu, C. F.; Shao, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 12485-12489.

⁴⁶ *Topics in Current Chemistry. Protein Ligation and Total Synthesis*; Liu, L., Ed.; Springer International Publishing: New York, 2015; Vol. I & II.

⁴⁷ Pech, A.; Achenbach, J.; Jahnz, M.; Schulzchen, S.; Jarosch, F.; Bordusa, F.; Klussmann, S. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 3997-4005.

⁴⁸ Xu, W.; Jiang, W.; Wang, J.; Yu, L.; Chen, J.; Liu, X.; Liu, L.; Zhu, T. F. *Cell Discov.* **2017**, *3*, No 17008.

⁴⁹ Li, Y.; Gould, A.; Aboye, T.; Bi, T.; Breindel, L.; Shekhtman, A.; Camarero, J. A. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1916-1927.

méthylées ou sulfatées qui ont été synthétisées grâce à la NCL tout au long des deux dernières décennies.²² Des travaux plus récents résultent de l'émergence de nouvelles applications telles que la préparation de protéines-D (ne contenant que des aminoacides D) pour la cristallographie de protéines racémiques⁵⁰ ou l'identification de protéines thérapeutiques.⁵¹ Les protéines-D ne pouvant être produites par des organismes vivants, il s'agit d'approches totalement synthétiques qui illustrent au mieux la force de la synthèse chimique des protéines.

2.3. Quelques extensions récentes de la NCL

La ligation chimique native requiert la présence de résidus cystéines avantageusement distribués le long de la séquence cible pour permettre son assemblage. Or, la faible occurrence des résidus cystéines dans les protéines naturelles (1,5%) a fait naître d'intenses efforts pour développer des mimes de cystéine N-terminaux permettant d'étendre l'applicabilité de la réaction en exploitant le même mécanisme mais pouvant être par la suite retirés ou manipulés pour générer un résidu protéinogène de jonction autre que la cystéine. Le début des années 2000 a vu s'épanouir l'étude des auxiliaires amovibles en position N-terminale ou en chaîne latérale pour l'assemblage de peptides et de protéines par ligation.⁵² Cependant, la volonté d'en étendre la portée et d'accroître les rendements lors de l'utilisation de tels auxiliaires de ligation ont fait converger les efforts vers l'utilisation de la chimie dite de ligation-désulfuration.^{53,54} Ce concept a initialement été introduit par Yan et Dawson. La désulfuration réductrice suivant l'étape de ligation leur permettait de générer une alanine en lieu et place de la cystéine ayant permis la ligation.⁵⁵ L'avantage d'une telle approche est la fréquence nettement plus élevée du résidu d'alanine dans les protéines par rapport à la cystéine (9%). Par la suite, le développement de conditions douces et sans intrant métallique de désulfuration radicalaire utilisant l'initiateur de radicaux hydrosoluble VA-044, la TCEP le

⁵⁰ Yan, B.; Ye, L.; Xu, W.; Liu, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4953-4965.

⁵¹ Zhao, L.; Lu, W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 56-61.

⁵² Dirksen, A.; Dawson, P. E. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 760-766.

⁵³ Rohde, H.; Seitz, O. *Biopolymers* **2010**, *94*, 551-559.

⁵⁴ Dawson, P.E. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 862-867.

⁵⁵ Yan, L. Z.; Dawson, P. E. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 526-533.

t -BuSH⁵⁶ ou encore le glutathion réduit⁵⁷ ont largement contribué à l'adoption des méthodologies de désulfuration post-ligation pour la synthèse totale de protéines (Schéma 2).

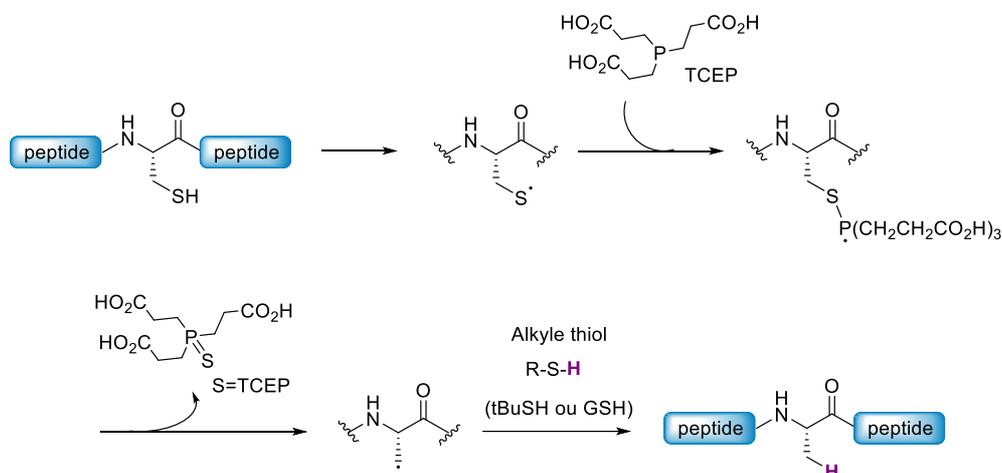


Schéma 2. Mécanisme de désulfuration de la cystéine induite par la TCEP

La ligation-désulfuration est récemment arrivée à maturité grâce à l'introduction d'une collection d'acides aminés non naturels portant un auxiliaire thiol avantageusement positionné pour la NCL et servant de précurseurs aux résidus naturels. La préparation de la β -mercapto phénylalanine et son application en ligation suivie d'une désulfuration réductrice en est l'exemple le plus ancien. S'en est suivie l'introduction de nombreux thio-aminoacides constituant la « boîte à outils » de l'approche synthétique par ligation-désulfuration. On y trouve des précurseurs de valine,^{57,58} lysine^{59,60,61} thréonine,⁶² leucine,^{63,64} proline,^{65,66}

⁵⁶ Wan, Q.; Danishefsky, S. *Angew Chem Int Ed* **2007**, *46*, 9248-9252.

⁵⁷ Haase, C.; Rohde, H.; Seitz, O. *Angew. Chem Int. Ed.* 2008, *47*, 6807-6810.

⁵⁸ Chen, J.; Wan, Q.; Yuan, Y.; Zhu, J. L.; Danishefsky, S. J. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, 8521-8524.

⁵⁹ Ajish Kumar, K. S.; Haj-Yahya, M.; Olschewski, D.; Lashuel, H. A.; Brik, A. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 8090-8094.

⁶⁰ Yang, R. L.; Pasunooti, K. K.; Li, F. P.; Liu, X. W.; Liu, C. F. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 13592-13593.

⁶¹ El Oualid, F.; Merx, R.; Ekkebus, R.; Hameed, D. S.; Smit, J. J.; de Jong, A.; Hilkmann, H.; Sixma, T. K.; Ovaas, H. *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*, 10149-10153.

⁶² Chen, J.; Wang, P.; Zhu, J. L.; Wan, Q.; Danishefsky, S. J. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2277-2283.

⁶³ Harpaz, Z.; Siman, P.; Kumar, K. S. A.; Brik, A. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1232-1235.

⁶⁴ Tan, Z. P.; Shang, S. Y.; Danishefsky, S. J. *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*, 9500-9503.

⁶⁵ Shang, S. Y.; Tan, Z. P.; Dong, S. W.; Danishefsky, S. J. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 10784-10786.

⁶⁶ Ding, H.; Shigenaga, A.; Sato, K.; Morishita, K.; Otaka, A. *Org Lett* **2011**, *13*, 5588-5591.

glutamine,⁶⁷ arginine,⁶⁸ acide aspartique,^{69,70} acide glutamique⁷¹ ou encore tryptophane.⁷² La chimie de ligation désulfuration exploitant ces thio-aminoacides a permis la synthèse d'un grand nombre de cibles peptidiques et protéiques complexes comme l'hormone parathyroïde humaine⁷³ ou l'oligomère glycopeptidique MUC1.⁶⁸ Elle a également permis l'ubiquitination en chaîne latérale de l' α -synucléine.⁷⁴

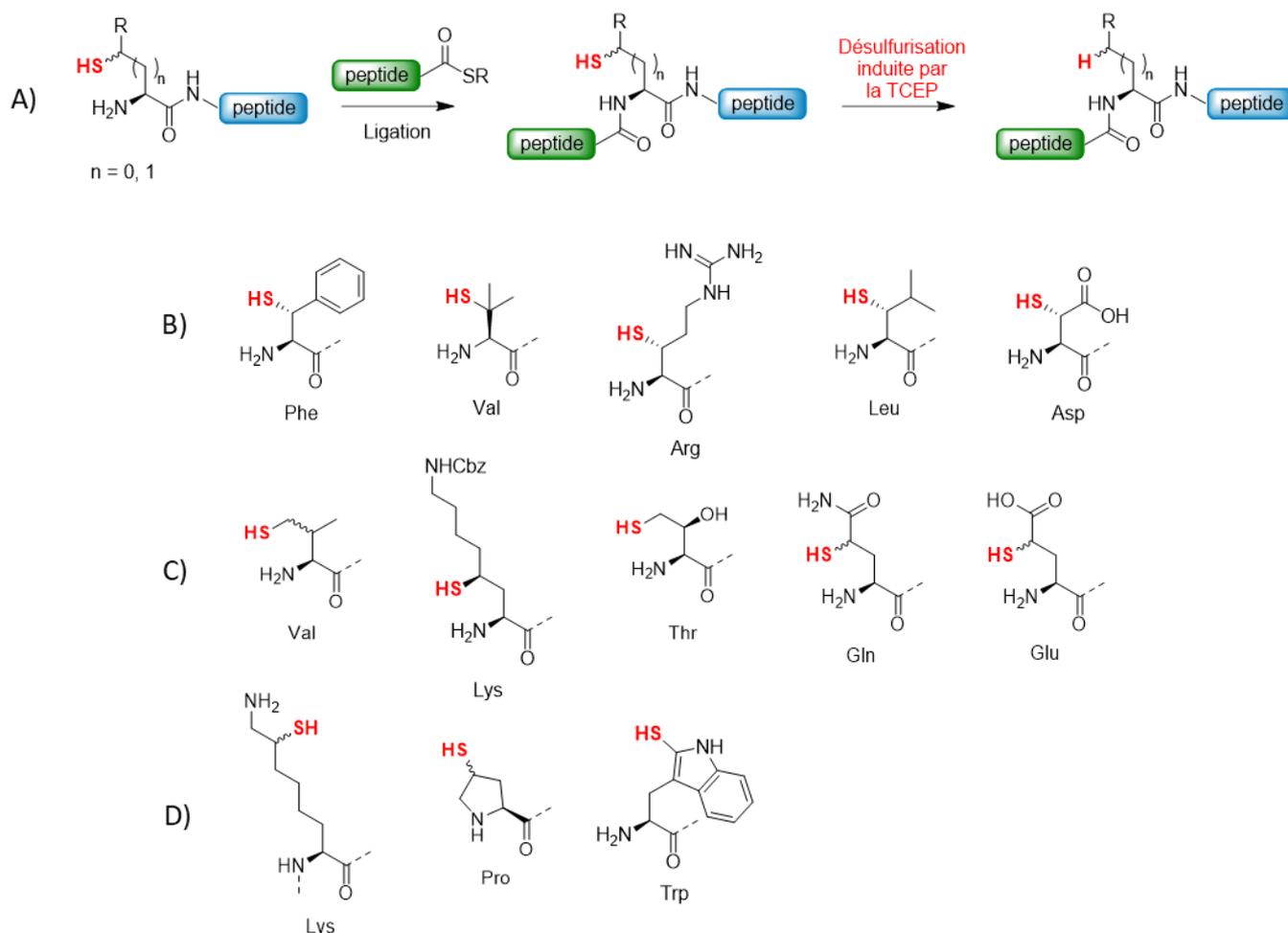


Figure 5. Substituts de cystéines utilisés pour la ligation chimique native. A) stratégie de ligation-désulfuration. B) β -thiolaminoacides. C) γ -thiolaminoacides. D) Autres thiolaminoacides.

Aujourd'hui, un nombre important de méthodes compatibles avec la chimie Fmoc pour la SPPS est disponible pour la synthèse de peptides thioesters C-terminaux. En particulier, l'utilisation

⁶⁷ Siman, P.; Karthikeyan, S. V.; Brik, A. *Org Lett* **2012**, *14*, 1520-1523.

⁶⁸ Malins, L. R.; Cergol, K. M.; Payne, R. J. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 559-563.

⁶⁹ Thompson, R. E.; Chan, B.; Radom, L.; Jolliffe, K. A.; Payne, R. J. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52*, 9723-9727.

⁷⁰ Guan, X.; Drake, M. R.; Tan, Z. *Org Lett* **2013**, *15*, 6128-6131.

⁷¹ Cergol, K. M.; Thompson, R. E.; Malins, L. R.; Turner, P.; Payne, R. J. *Org Lett* **2014**, *16*, 290-293.

⁷² Malins, L. R.; Cergol, K. M.; Payne, R. J. *Chem Sci* **2014**, *5*, 260-266.

⁷³ Shang, S.; Tan, Z.; Danishefsky, S. J. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **2011**, *108*, 5986-5989.

⁷⁴ Hejjaoui, M.; Haj-Yahya, M.; Kumar, K. S.; Brik, A.; Lashuel, H. A. *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50*, 405-409.

de stratégies s'appuyant sur le transfert d'acyle *N* vers *S* *in situ* a suscité un engouement particulier. On notera l'introduction en 2010 du groupement *bis*(2-sulfanylethyl)amido (SEA). Il possède une structure 1,7-dithiol oxydée en disulfure cyclique inerte mais facilement convertible en dithiol actif par simple action d'un agent réducteur fort comme le DTT ou la TCEP. Cette forme réduite SEA^{on} amide est alors en équilibre avec une forme thioester via un transfert d'acyle intramoléculaire *N* vers *S*. Cette dernière peut alors être facilement convertie en un thioester plus stable par réaction d'échange thiol/thioester avec un additif thiol exogène comme l'acide 3-mercaptopropionique (MPA). Liu *et al.* ont eux rapporté une voie d'accès aux peptides thioesters *via* un précurseur hydrazide lui aussi facilement accessible par SPPS.⁷⁵ Par l'action du nitrite de sodium, ils sont convertis en peptides acyle azotures peu stables et convertibles en thioesters par ajout dans le milieu d'un thiol exogène. Il s'agit là de la méthodologie la plus utilisée aujourd'hui pour l'accès aux peptides thioesters.

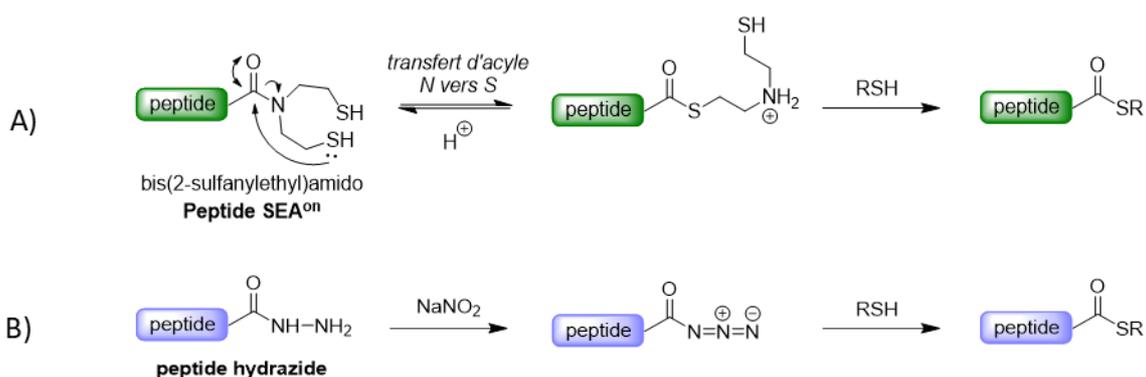


Schéma 3. A) Préparation de peptides thioester à partir de peptides SEA^{on}. B) Préparation de peptides thioesters à partir de peptides hydrazides.

⁷⁵ Fang, G. M.; Li, Y. M.; Shen, F.; Huang, Y. C.; Li, J. B.; Lin, Y.; Cui, H. K.; Liu, L. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2011**, *50*, 7645-7649.

3. Stratégies d'assemblages des protéines via NCL

3.1. Assemblage de la direction N vers C

L'assemblage séquentiel de protéines par ligation chimique native dans la direction N vers C a originellement été accomplie en exploitant les différences de réactivité entre thioesters pour construire une séquence d'assemblage cinétiquement contrôlée. Kent et ses collaborateurs ont fait la première démonstration de ce concept en mettant en réaction un thioester de thiophényle à l'extrémité C-terminale d'un premier fragment avec un segment bifonctionnel possédant une cystéine à son extrémité N-terminale et un thioester d'alkyle moins réactif en position C-terminale. Cette méthodologie a initialement été utilisée pour l'assemblage de la crambine à partir de 6 segments.⁷⁶

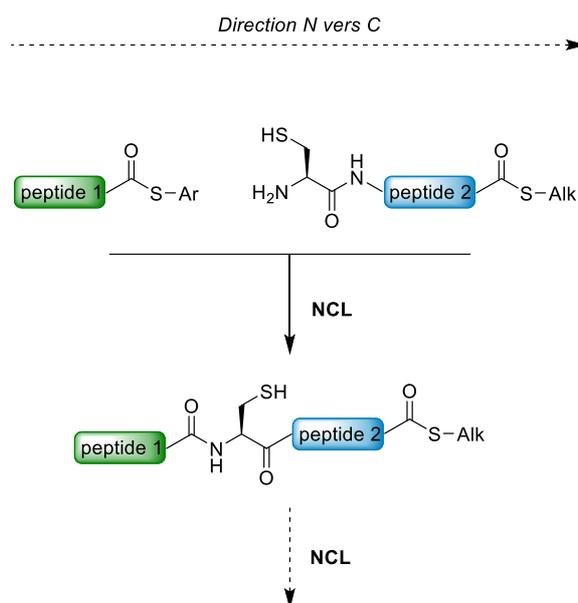


Schéma 4. Assemblage de segments peptidiques dans la direction N vers C cinétiquement contrôlé par la différence de réactivité entre thioester d'aryle et d'alkyle.

Plusieurs autres stratégies ont été développées pour l'assemblage de grandes protéines par ligation dans la direction N vers C. La plus utile d'entre elles s'appuie sur le développement de précurseurs de thioesters. Le groupement *bis*(2sulfanylethyl)amido (SEA) en est un exemple particulièrement intéressant pour sa capacité à générer un thioester à la demande. En effet, sous sa forme oxydée ou SEA^{off}, l'extrémité C-terminale d'un peptide portant ce groupement est

⁷⁶ Bang, D.; Pentelute, B. L.; Kent, S. B. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3985–3988.

complètement inerte. L'action d'un réducteur fort (DTT, TCEP) permet la transformation du disulfure cyclique en bis thiol puis en thioester par transfert d'acyle *N* vers *S*. De manière intéressante, le disulfure cyclique SEA^{off} est compatible avec les agents réducteurs doux tels que le MPAA qui est communément employé comme catalyseur de la NCL. La ligation SEA et la NCL sont donc orthogonales et peuvent être utilisées de concert pour mettre au point un schéma d'assemblage de protéines. Le bénéfice de cette méthode a été illustré à plusieurs reprises et notamment par l'assemblage du domaine Kringle 1 (K1) du facteur de croissance des hépatocytes (HGF).⁷⁷

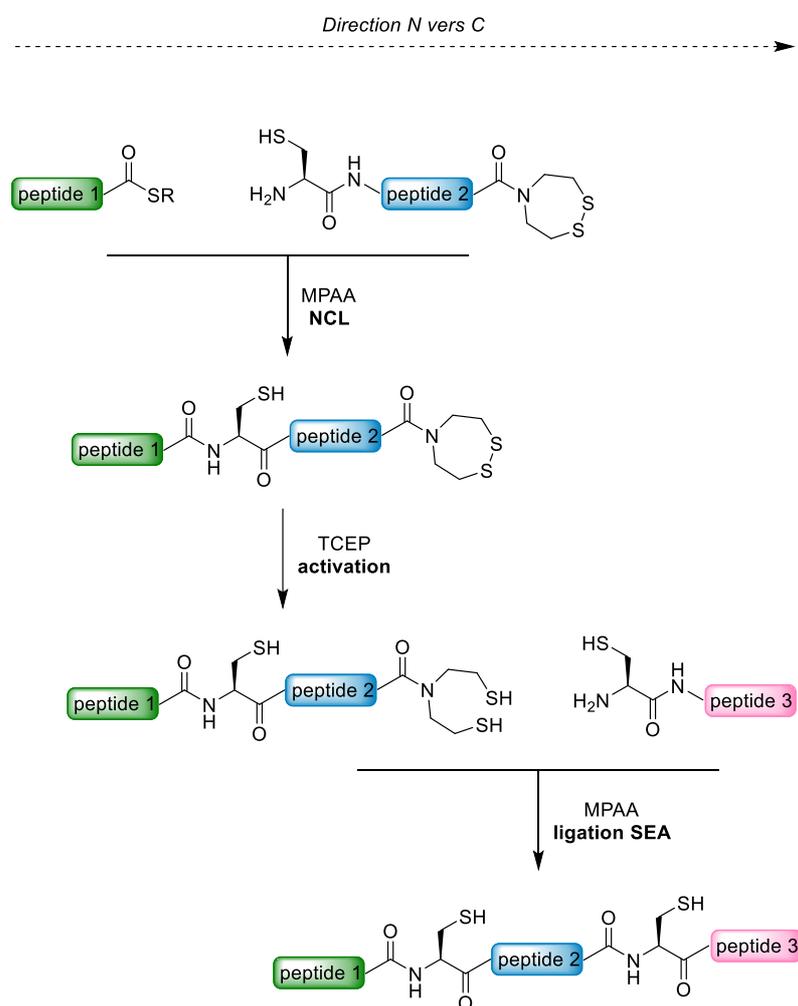


Schéma 5. Assemblage séquentiel de trois segments peptidiques dans la direction N vers C en exploitant la réactivité du groupement SEA.

⁷⁷ Ollivier, N.; Vicogne, J.; Vallin, A.; Drobecq, H.; Desmet, R.; El Mahdi, O.; Leclercq, B.; Goormachtigh, G.; Fafeur, V.; Melnyk, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 209–213.

Les peptides hydrazides ont eux aussi prouvé leur utilité en tant que précurseurs de thioesters pour l'assemblage N vers C de protéines par ligation.⁷⁵ Comme décrite plus haut, la conversion d'un peptide hydrazide C-terminal en thioester est facilement conduite par traitement au NaNO₂ suivie d'une thiolysse de l'acyl azide résultant. Surtout, la fonction hydrazide est inactive dans les conditions de la NCL et peut donc elle aussi jouer le rôle de précurseur de thioester dans un schéma d'assemblage de protéine N vers C. Cette méthode a été mise à profit pour la préparation de l' α -synucléine, une protéine impliquée dans la formation des corps de Lewy et dans la progression de plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson.⁷⁸

3.2. Assemblage de la direction C vers N

De façon similaire à l'assemblage dans la direction N vers C, plusieurs méthodes efficaces ont été développées pour l'assemblage de protéines dans la direction C vers N. Le cœur de ce concept réside dans le contrôle des étapes de ligation *via* l'utilisation de groupes protecteurs orthogonaux de la cystéine ou de thio-aminoacides N-terminaux. La conception et l'utilisation de tels groupements protecteurs est un axe de recherche très actuel pour lequel plusieurs stratégies viables ont déjà été rapportées.⁷⁹ L'utilisation des groupements thiazolidine (Thz),^{80,81} acétamidométhyle (Acm)⁸² ou encore N-acétoacétyle (AcA)⁸³ en sont de bons exemples.

⁷⁸ Zheng, J. S.; Tang, S.; Qi, Y. K.; Wang, Z. P.; Liu, L. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2483–2495.

⁷⁹ Jbara, M.; Maity, S. K.; Brik, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10644–10655.

⁸⁰ Huang, Y. C.; Chen, C. C.; Gao, S.; Wang, Y. H.; Xiao, H.; Wang, F.; Tian, C. L.; Li, Y. M. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7623.

⁸¹ Bang, D.; Kent, S. B. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534–2538.

⁸² Veber, D. F.; Milkowski, J. D.; Denkwalter, R. G.; Hirschmann, R. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *26*, 3057–3058.

⁸³ Di Bello, C.; Filira, F.; Giormani, V.; D'Angeli, F. *J Chem Soc C* **1969**, 350–352.

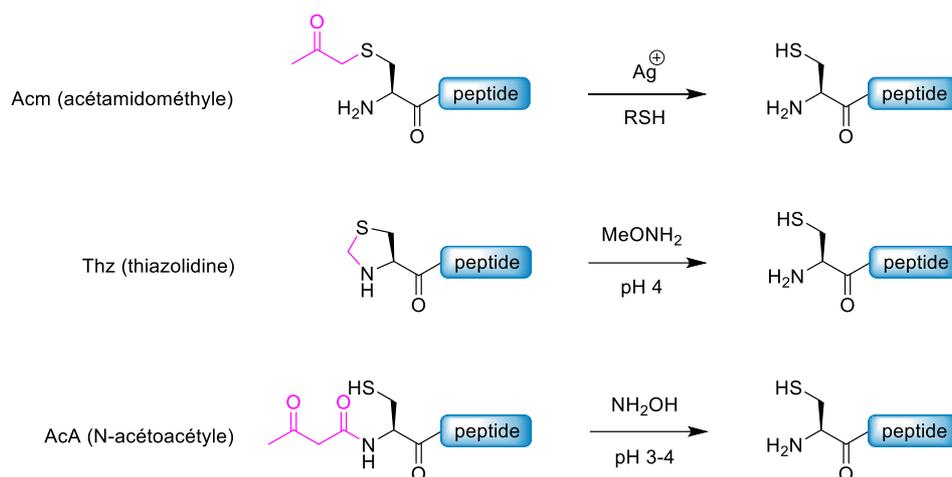


Figure 6. Groupes protecteurs pour l'assemblage séquentiel de plusieurs segments peptidiques dans la direction C vers N.

Brik et ses collaborateurs ont employé la protection par la thiazolidine pour l'assemblage d'une tetra-ubiquitine par trois ligations itératives dans la direction C vers N.⁸⁴ Les fragments ubiquitine utilisés ici disposent d'un résidu δ -thiolysine protégé sous forme de thiazolidine à leur extrémité N-terminale et portent une fonction thioester C-terminale. Par répétition de cycles de ligation puis déprotection par action de la méthoxyamine, quatre unités ubiquitine sont assemblées pour former le tétramère de 304 résidus. Une étape de désulfurisation finale permet la transformation des trois résidus δ -thiolysine en résidu Lys natif. Kajihara et al. ont eux démontré l'efficacité de l'assemblage C vers N pour la préparation d'un variant glycosylé de l'interféron β .⁸⁵ Leur approche s'appuie sur la protection thiazolidine de résidus Cys artificiellement introduits pour la ligation combinée à la protection par l'acétamidométhyle des trois cystéines natives.

La mise au point de ces outils qui permettent la conduite itérative de plusieurs réactions de ligation a grandement amélioré l'efficacité de la synthèse chimique des protéines. À l'aide de ces technologies, la limite en taille des objets synthétisables est sans cesse repoussée et des cibles composées de plus d'une centaine de résidus sont aujourd'hui facilement accessibles.

⁸⁴ Kumar, K. S.; Bavikar, S. N.; Spasser, L.; Moyal, T.; Ohayon, S.; Brik, A. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2011**, *50*, 6137-6141.

⁸⁵ Sakamoto, I.; Tezuka, K.; Fukae, K.; Ishii, K.; Taduru, K.; Maeda, M.; Ouchi, M.; Yoshida, K.; Nambu, Y.; Igarashi, J.; Hayashi, N.; Tsuji, T.; Kajihara, Y. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 5428-5431.

4. Repliement *in vitro* des protéines synthétisées par voie chimique

L'activité biologique d'un grand nombre de protéines s'appuie sur leur aptitude à adopter une structure tridimensionnelle précise ainsi qu'un patron de ponts disulfure unique lorsque des cystéines sont présentes dans leur séquence. D'ailleurs l'incapacité des protéines à adopter cette conformation peut avoir des conséquences dramatiques comme le prouve l'existence de maladies causées par le mauvais repliement ou l'agrégation de protéines.^{86,87} Pour achever la synthèse totale d'une protéine fonctionnelle, la chaîne polypeptidique synthétique doit absolument être repliée pour adopter sa structure tridimensionnelle native. Le repliement d'une protéine *in vitro* diffère de façon significative du repliement *in cellula* de la même protéine. L'environnement intracellulaire est complexe et dispose d'un grand nombre de protéines interagissant les unes avec les autres à des concentrations locales très élevées. Ainsi, il est aujourd'hui bien établi que les cellules disposent d'un appareillage sophistiqué de protéines chaperons dont le rôle est d'aider au repliement des protéines synthétisées et d'empêcher leur agrégation au cours de ce processus dynamique. Les chaînes polypeptidiques peuvent se conformer avant même la fin de leur biosynthèse grâce aux enzymes et chaperons associées au ribosome.⁸⁸ Enfin, le processus de repliement *in cellula* tire avantage de l'environnement intracellulaire et d'une compartimentalisation stricte. Le repliement des protéines et les éventuelles corrections se réalisent essentiellement dans des organelles spécialisées, et plus particulièrement dans le réticulum endoplasmique, et se poursuit dans l'ensemble des voies sécrétoires.⁸⁹

4.1. Repliement des protéines hydrosolubles

L'information nécessaire au repliement d'un polypeptide est principalement contenue dans sa séquence primaire comme le suggèrent les expériences d'Anfinsen sur la ribonucléase A.^{90,91} Anfinsen a montré que cette petite protéine globulaire complètement dépliée en milieu dénaturant réadoptait spontanément sa conformation native lors de sa dialyse. Cette

⁸⁶ Naeem, A.; Fazili, N. *Cell Biochem. Biophys.* **2011**, *61*, 237–250.

⁸⁷ Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a010454.

⁸⁸ Hingorani, K. S.; Gierasch, L. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *24*, 81-90.

⁸⁹ Gidalevitz, T.; Stevens, F.; Argon, Y. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1833*, 2410-2424.

⁹⁰ Anfinsen, C. B.; Haber, E.; Sela, M.; White, F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1961**, *47*, 1309–1314.

⁹¹ Anfinsen, C. B. *Science* **1973**, *181*, 223–230.

conclusion simple en apparence est suivie de plusieurs décennies de recherche pour comprendre comment la seule séquence primaire d'une protéine peut contenir l'information lui permettant d'accéder à sa structure native.

Si le repliement ne procédait que par essais aléatoires de toutes les conformations possibles de la chaîne polypeptidique, l'adoption de la conformation native prendrait un temps astronomiquement long. Cependant les protéines se replient à l'échelle du temps biologique.⁹² Levinthal a suggéré que ce paradoxe apparent peut être résolu si les protéines se replient *via* des chemins prédéfinis.⁹³ Par la suite, plusieurs mécanismes ont été proposés pour décrire les différentes voies empruntées par une protéine en route vers son état natif. L'analyse des cinétiques de re-repliement de la ribonucléase A a révélé deux phases distinctes⁹⁴ suggérant que les éléments de structure secondaire se forment avant leur rapprochement pour former la structure tertiaire.^{95,96,97} L'approfondissement des recherches sur le re-repliement de la ribonucléase A a aussi révélé qu'une des phases observées découlait de l'isomérisation cis-trans d'une proline.⁹⁸ Plus tard, la caractérisation du repliement de l'inhibiteur de chymotrypsine 2 (CI2) a montré une cinétique de repliement simple à deux états et sans accumulation d'intermédiaires.^{99,100,101} Pour expliquer l'absence d'intermédiaires détectables, le mécanisme de nucléation-condensation a été proposé par Fersht et ses collaborateurs.⁹⁹ Ce mécanisme implique la formation spontanée de petits noyaux de structure stables qui grandissent et qui, par des interactions faibles et à longue distance, se rapprochent et s'organisent pour former l'état natif.^{97,99} Il s'agit donc d'un mécanisme pour lequel les structures secondaires et tertiaires se forment simultanément. Une combinaison d'études *in sillico* et d'approches expérimentales sur la super famille de protéines homeodomain-like a montré que ces deux mécanismes (en deux phases et de nucléation-condensation) peuvent être considérés comme les deux extrêmes d'un unique mécanisme.

⁹² Levinthal, C. *Univ. Illinois Bull.* **1969**, *67*, 22–24.

⁹³ Levinthal, C.; *Chim. J. Phys.* **1968**, *65*, 44–45.

⁹⁴ Tsong, T. Y.; Baldwin, R. L.; Elson, E. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 1809–1812.

⁹⁵ Ptitsyn, O. B. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1973**, *210*, 1213–1215.

⁹⁶ Kim, P. S.; Baldwin, R. L. *Ann. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 459–489.

⁹⁷ Fersht, A. R. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 650–654.

⁹⁸ Brandts, J. F.; Halvorson, H. R.; Brennan, M. *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953–4963.

⁹⁹ Itzhaki, L.S.; Otzen, D. E.; Fersht, A. R. *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 260–288.

¹⁰⁰ Jackson, S. E.; Fersht, A. R. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10428–10435.

¹⁰¹ Jackson, S. E.; Fersht, A. R. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10436–10443.

Dans ce modèle unifié, la stabilité relative des structures secondaires et tertiaires détermine si ces éléments se forment en série ou en parallèle.¹⁰²

Plus récemment, il a été réalisé que les protéines se replient en suivant une multitude de chemins parallèles qui forment un paysage d'énergies en forme d'entonnoir (Figure 7).¹⁰³ Au sommet de l'entonnoir, l'état non replié représente un large ensemble de conformations de la chaîne polypeptidique à haute entropie. Quoique non structurée, la chaîne polypeptidique peut être déformée par des interactions faibles qui initient le repliement.¹⁰⁴ À mesure que celui-ci progresse, le polypeptide subit de nombreuses réorganisations facilitant l'apparition d'interactions stabilisantes entre chaînes latérales, entre motifs du squelette peptidique et avec le solvant.¹⁰⁵ Cette approche mécanistique présente l'avantage de ne pas prendre en compte la priorité d'apparition d'un type de structure par rapport à l'autre. De plus, le paysage en forme d'entonnoir permet de comprendre la robustesse du processus de repliement face à d'éventuelles mutations.¹⁰⁵ Si la forme repliée finale constitue toujours l'état le plus stable alors une mutation peut bloquer certains chemins qui mènent à l'état natif mais des voies alternatives peuvent être utilisées.

¹⁰² Gianni, S.; Guydosh, N. R.; Khan, F.; Caldas, T. D.; Mayor, U.; White, G. W. N.; DeMarco, M. L.; Daggett, V.; Fersht, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13286–13291.

¹⁰³ McMorran, L. M.; Brockwell, D. J.; Radford, S. E. *Arch Biochem Biophys* **2014**, *564*, 265–280.

¹⁰⁴ Smith, L. J.; Fiebig, K. M.; Schwalbe, H.; Dobson, C. M. *Fold Des.* **1996**, *1*, R95–R106.

¹⁰⁵ Onuchic, J. N.; Wolynes, P. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 70–75.

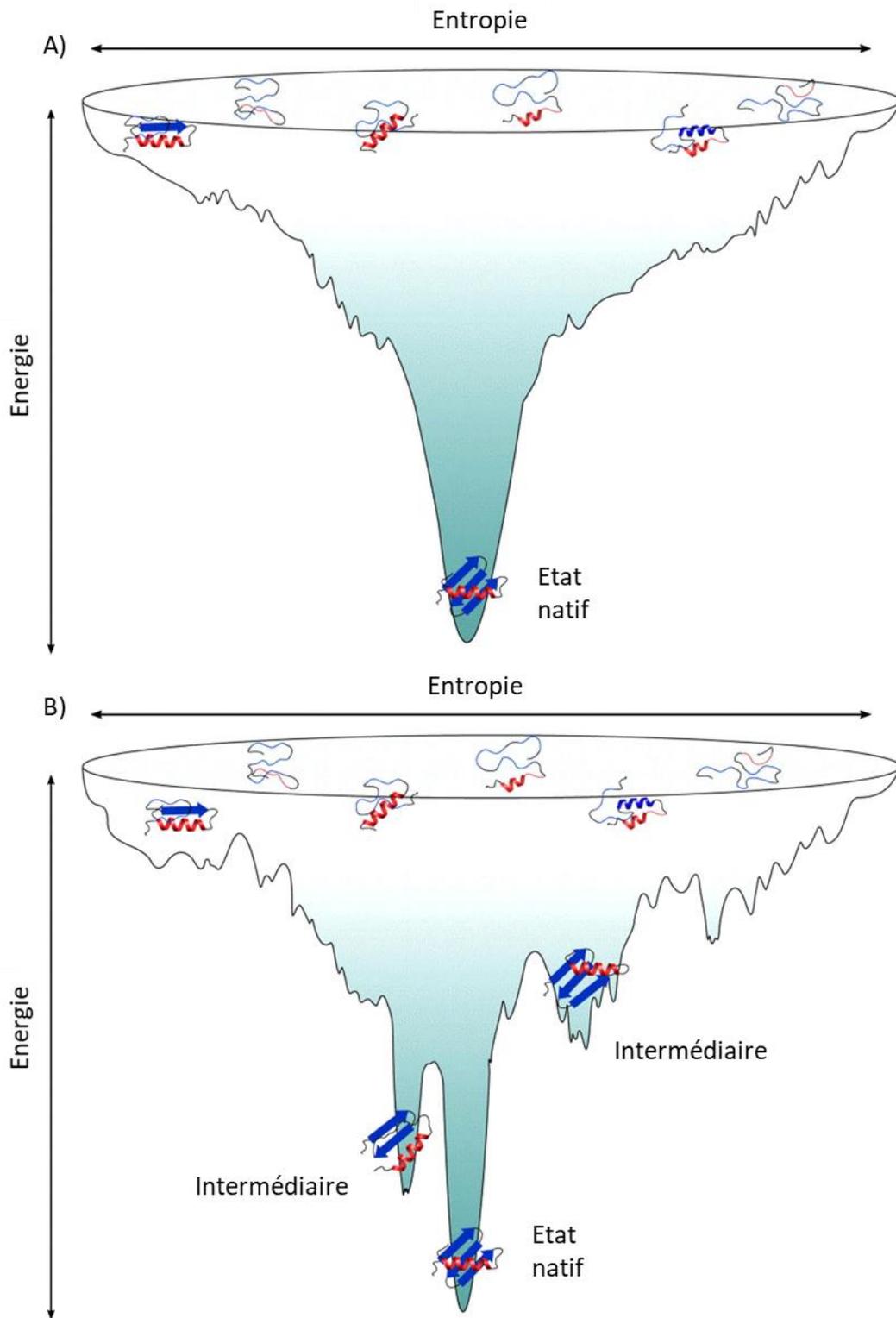


Figure 7. Représentation schématique d'un paysage de repliement en forme d'entonnoir. A) Exemple d'un paysage de repliement lisse espéré pour un repliement simple où l'état natif est l'unique état stablement peuplé. B) Paysage de repliement rugueux obtenu lorsque des conformations du polypeptide peuplent des états intermédiaires. Ces structures constituent des minima locaux d'énergie. Adaptée de McMorran, L. M.; Brockwell, D. J.; Radford, S. E. *Arch Biochem Biophys* **2014**, 564, 265–280.

4.2. Repliement oxydant des protéines riches en cystéines

La formation de ponts disulfure est la plus importante des quelques modifications post-traductionnelles covalentes qui se produisent lors du repliement d'une protéine. La formation de ces liens est essentielle non seulement pour le repliement en lui-même mais également pour la stabilité et l'activité de la protéine. *In vivo*, l'incapacité à obtenir le patron correct des ponts disulfure est susceptible de causer l'agrégation des protéines et leur dégradation par les protéases cellulaires. Le terme « repliement oxydant » décrit le processus selon lequel une protéine réduite et non repliée acquiert à la fois ses ponts disulfure natifs et sa structure tridimensionnelle native.¹⁰⁶

La plupart des liens covalents unissant deux résidus cystéines ont pour principale fonction de stabiliser la structure de la protéine. Il est communément admis que les ponts disulfure stabilisent la conformation native d'une protéine en déstabilisant les formes non repliées. En effet, ils diminuent l'entropie de l'état non replié, le rendant ainsi moins favorable en comparaison avec la forme repliée.¹⁰⁷ D'après des études théoriques, l'augmentation de la stabilité de la structure native due à la formation de liens disulfure particuliers est directement proportionnelle au nombre de résidus qui séparent les cystéines liées : plus il y a de résidus entre les cystéines liées, plus stable est la structure native.^{108,109} La cinétique du repliement d'une protéine est aussi grandement affectée par la localisation des ponts disulfure par rapport aux noyaux de repliement. Les liens disulfure au sein ou proche de noyaux accélèrent le repliement tandis que des liens ailleurs dans la séquence peuvent le ralentir considérablement.¹¹⁰ La formation de ponts disulfure est thermodynamiquement couplée au processus de repliement des protéines. La conformation repliée stabilise le lien disulfure autant que la conformation est stabilisée par la formation d'un disulfure particulier.¹¹¹

¹⁰⁶ Narayan, M.; Welker, E.; Wedemeyer, W. J.; Scheraga, H. A. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 805-812.

¹⁰⁷ Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* 1981, *151*, 261-287.

¹⁰⁸ Flory, P. Ithaca : Cornell Univ. Press 1953.

¹⁰⁹ Pace, C. N.; Grimsley, G. R.; Thompson, J. A.; Barnett, B. J. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11820-11825.

¹¹⁰ Abkevich, V. I.; Shakhnovich, E. I. *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 975-985.

¹¹¹ Creighton, T. E. in *Methods in Enzymology*, 1986, ed. CHW Hirs, Timasheff, T. N., 131, 83-106. San diego : Academic

Au-delà de leur effet stabilisant et de leur impact sur la vitesse de repliement, une population minoritaire de ponts disulfure joue un rôle fonctionnel. Ces disulfures fonctionnels peuvent être classés en deux catégories : les disulfures catalytiques et les disulfures allostériques. Les disulfures catalytiques sont généralement localisés au site actif d'enzymes qui catalysent les échanges thiol-disulfures (oxydoréductases). Ces dithiols/disulfures sont transférés à la protéine substrat conduisant à la formation, à la réduction ou à l'isomérisation de liens disulfure. Les disulfures allostériques, quant à eux, régulent les fonctions de manière non-enzymatique en induisant des changements conformationnels dans la protéine.^{112,113}

Le patron natif des ponts disulfure est le résultat final d'un processus complexe fondé sur la seule réaction d'échange thiol/disulfure (Schéma 6).¹¹⁴ Au cours de l'échange thiol-disulfure, le thiolate nucléophile (S^-) attaque l'atome de soufre d'un disulfure (-S-S-). Le lien disulfure original est rompu et un nouveau lien disulfure est formé entre le thiolate attaquant et l'atome de soufre attaqué. La forme thiolate (S^-) est la seule à pouvoir former un disulfure puisque le thiol protoné est peu nucléophile. L'échange thiol disulfure est donc dépendant de la concentration en espèce réactive thiolate par rapport au thiol et par conséquent dépend grandement de son pK_a et du pH du milieu de repliement.¹¹⁵ Le pK_a des cystéines dans les protéines dénaturées est environ égal à 8,7. Par conséquent, des réactions de repliement rapides apparaissent lorsque le pH est supérieur à 9 et le repliement ralentit progressivement à mesure que le pH de la solution diminue. Par ailleurs, puisque la vitesse de l'échange thiol-disulfure est largement dépendante de la réactivité des thiolates, le moindre changement dans son environnement électrostatique notamment induit par la formation de structures secondaires va automatiquement influencer la formation des disulfures.^{116,117} Enfin, la vitesse de formation des ponts disulfure est également influencée par l'accessibilité des réactifs. L'échange thiol-disulfure ne peut avoir lieu que lorsqu'un thiolate et un disulfure entrent en contact.¹¹⁷ Ainsi, l'enfouissement des fonctions réactives par la formation des structures tertiaires tend à ralentir ou inhiber la formation de certains ponts disulfure. De tout ceci se

¹¹² Hogg, P. J. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 210-214.

¹¹³ Schmidt, B.; Ho, L.; Hogg, P. J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7429-7433.

¹¹⁴ Creighton, T. E.; Zapun, A.; Darby, N. J. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 18-23

¹¹⁵ Scheraga, H. A.; Wedemeyer, W. J. dans *Methods in Enzymology* 2001, ed AW Nicholson, 341, 189-221, San Diego Academic.

¹¹⁶ Arolas, J. L.; Aviles, F. X.; Chang, J. Y.; Ventura, S. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 292-301.

¹¹⁷ Wedmeyer, W. J.; Welker, E.; Narayan, M.; Scheraga, H. A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4207-4216.

dégage donc quatre facteurs principaux qui influencent le repliement d'une protéine : la concentration en anion thiolate et l'accessibilité, la proximité et la réactivité des fonctions thiol et des disulfures.

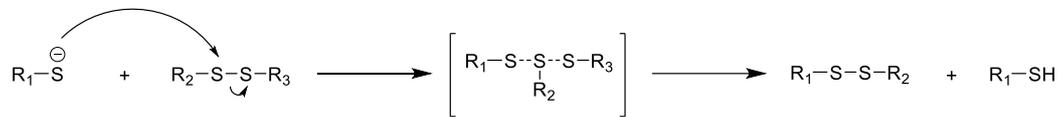


Schéma 6. Mécanisme de la réaction d'échange thiol/disulfure

Dans les études classiques de repliement oxydant *in vitro*, les protéines sont initialement réduites et dénaturées. Les agents réducteurs et dénaturants sont retirés ou dilués et la protéine est mise au contact d'un agent oxydant. Il peut s'agir du dioxygène de l'air ou d'un système plus complexe composé généralement d'un mélange de réactifs oxydants et réducteurs. Le couple glutathion disulfure (GSSG)/glutathion réduit (GSH) est le système oxydant/réducteur le plus utilisé pour le repliement *in vitro* de protéines disposant de ponts disulfure.^{118,119} Le glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) est en effet le thiol le plus abondant dans une cellule et joue un rôle majeur dans la formation des liens disulfure dans le réticulum endoplasmique.¹²⁰ La forme oxydée (GSSG) agit en tant qu'oxydant et donc forme les ponts disulfure de la protéine tandis que la forme réduite (GSH), en tant que réducteur, réduit les mauvais appariements. Ensemble, ces deux réactions conduisent à la formation du patron de ponts disulfure le plus stable sur le plan thermodynamique. Des réactions d'échanges thiol/disulfure entre les cystéines de la protéine et ce couple oxydant/réducteur résulte l'oxydation (formation du lien S-S), la réduction (coupure du lien S-S) et l'isomérisation (réarrangement du lien S-S) des ponts disulfure (Schéma 7).

¹¹⁸ Konishi, Y.; Ooi, T.; Scheraga, H. A. *Biochemistry* **1982**, *21*, 4734–4740.

¹¹⁹ Lyles, M. M.; Gilbert, H. F. *Biochemistry* **1991**, *30*, 613–619.

¹²⁰ Gilbert, H. F. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1990**, *63*, 69–172.

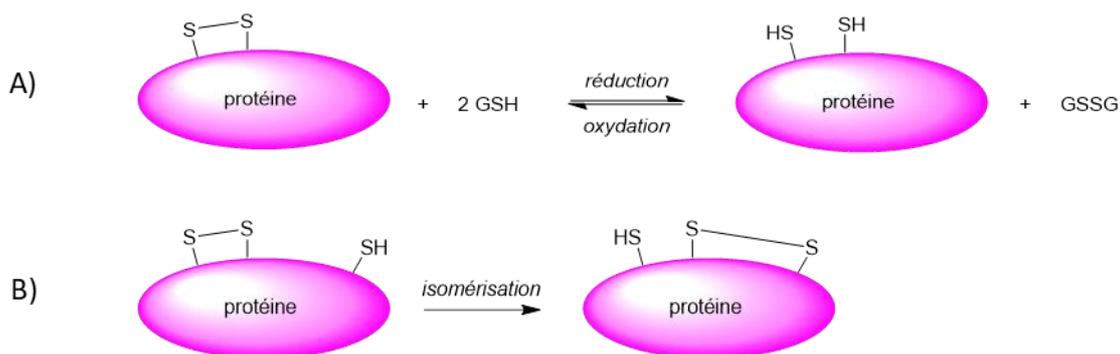


Schéma 7. A) Equilibre d'oxydoréduction d'un lien disulfure sous l'effet du couple oxydant réducteur GSSG/GSH. B) Isomérisation d'un lien disulfure.

Dans les années 2000, des efforts intenses ont conduit au développement de nouveaux agents redox pour le repliement oxydant des protéines. Parmi eux, on retrouve des *bis*(cystéinyl)peptides,¹²¹ des thiols aromatiques *ortho*- et *meta*- substitués,¹²² le sélénoglutathion (GSeH), un analogue du glutathion qui contient un pont disélénaire à la place du disulfure naturel,¹²³ et le dithiol (\pm)-*trans*-1,2-*bis*(2-mercaptoacetamido)cyclohexane (BMC) dont le rôle est de mimer l'activité des protéines disulfure isomérases.¹²⁴

La composition optimale d'un tampon redox pour le repliement *in vitro* des protéines est empirique et unique à chaque protéine. Il est le reflet des différents environnements de repliement *in cellula* et du fait que chaque protéine dispose de son propre chemin de repliement. En règle générale, le repliement optimal est mené dans des conditions redox minimisant l'accès à des voies sans issue comme l'acquisition de conformations ou de ponts disulfure peu réversibles.¹²⁵

Le besoin de comprendre la biologie des peptides et des protéines a entraîné l'apparition de différentes techniques qui rendent possible la synthèse de protéines à l'échelle du milligramme. Les méthodes modernes de synthèse totale de protéines s'appuient sur les chimies de ligation, des réactions chimiosélectives entre peptides déprotégés et équipés de

¹²¹ Cabrele, C.; Fiori, S.; Pegoraro, S.; Moroder, L. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 731-740.

¹²² Gough, J. D.; Barrett, E. J.; Silva, Y.; Lees, W. J. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 39-47.

¹²³ Beld, J.; Woycechowsky, K. J.; Hilvert, D. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5382-5390.

¹²⁴ Woycechowsky, K. J.; Wittrup, K. D.; Raines, R. T. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 871-879.

¹²⁵ Kibria, F. M.; Lees, W. J. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 796-797.

groupes fonctionnels uniques et mutuellement réactifs. Ces chimies, couplées à d'astucieuses stratégies de repliement *in vitro* ont permis la synthèse d'un grand nombre de protéines, de séquences et de structures définies, sans impacter l'activité biologique ou biochimique. Toutes ces techniques chimiques contribuent à étendre l'horizon de notre compréhension des protéines en rendant possible leur étude à l'échelle atomique même lorsque les techniques recombinantes ont atteint leurs limites.

Chapitre 2. La granulysine, une protéine clé de l'immunité

1. Structure et localisation de la granulysine

La granulysine a été découverte chez l'homme en 1987 par Jongsta *et al.* alors qu'ils tentaient d'identifier des gènes et leurs produits d'expression impliqués dans les mécanismes moléculaires d'activation des lymphocytes T.¹²⁶ En utilisant la technique de l'hybridation soustractive, la granulysine a initialement été identifiée chez les lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4+ et CD8+ pour lesquels l'expression apparaissait 3 à 5 jours après leur activation. Plusieurs années plus tard, la granulysine a également été identifiée chez les lymphocytes NK qui l'exprime de manière constitutive.¹²⁷ Récemment, d'autres recherches ont montré que la granulysine est exprimée de façon similaire par tous les sous-groupes de lymphocytes NK alors que son expression est plus hétérogène chez les lymphocytes T (un pourcentage plus élevé a été retrouvé chez le lymphocyte T CD8+ par rapport au CD4+). De plus, l'expression de la granulysine est principalement limitée au sous-groupe des lymphocytes T effecteurs à mémoire.¹²⁸ La granulysine a également été détectée chez une grande variété d'autres cellules immunitaires cytotoxiques telles que les lymphocytes NKT, les lymphocytes T CD1 restreint et V δ 2+ $\gamma\delta$.^{129,130,131} Enfin, la granulysine a également été identifiée chez le lymphocyte T régulateur Tr-1 et participe à son activité cytotoxique qui lui permet d'éliminer les cellules myéloïdes et chez les lymphocytes T effecteurs.¹³²

¹²⁶ Jongstra, B.; Schall, T. J.; Dyer, B. J.; Clayberger, C.; Jorgensen, J.; Davis, M. M. *J. Exp. Med.* **1987**, *165*, 601-614.

¹²⁷ Peña, S. V.; Krensky A. M. *Semin. Immunol.* **1997**, *9*, 117-125

¹²⁸ Bengsch, B.; Ohtani, T.; Herati, R. S.; Bovenschen, N.; Chang, K. M.; Wherry, E. J. *J. Immunol. Methods* **2018**, *453*, 3-10.

¹²⁹ Stenger, S.; Dewan, P.; Niazi, K. R.; Froelich, C. J. *Science* **1998**, *282*, 121-125.

¹³⁰ Spada, F. M.; Grant, E. P.; Peters, P. J.; Sugita, M.; Melián, A.; Leslie, D. S.; Lee, H. K.; van Donselaar, E.; Hanson, D. A.; Krensky, A. M.; Majdic, O.; Porcelli, S. A.; Morita, C. T.; Brenner, M. B. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 937-948.

¹³¹ Costa, G.; Guenot, M.; Mocan, I.; Halary, F.; Saint-basile, D.; Pitard, V.; Déchanet-Merville, J.; Moreau, J.; Troye-Blomberg, M.; Mercereau-Puijalon, O.; Behr, C. *Blood* **2011**, *118*, 6952-6962.

¹³² Guipouy, D.; Gertner Dardenne, J.; Pfajfer, L.; German, Y.; Belmonte, N.; Dupré, L. *Int. Immunol.* **2019**, *31*, 239-250.

Les lymphocytes cytotoxiques produisent deux granulysines de 15 kDa (15-GN) et 9 kDa (9-GN) à partir d'un transcrit unique (Figure 8). La 9-GN résulte d'une maturation protéolytique de la 15-GN aux extrémités N- et C-terminales.¹³³

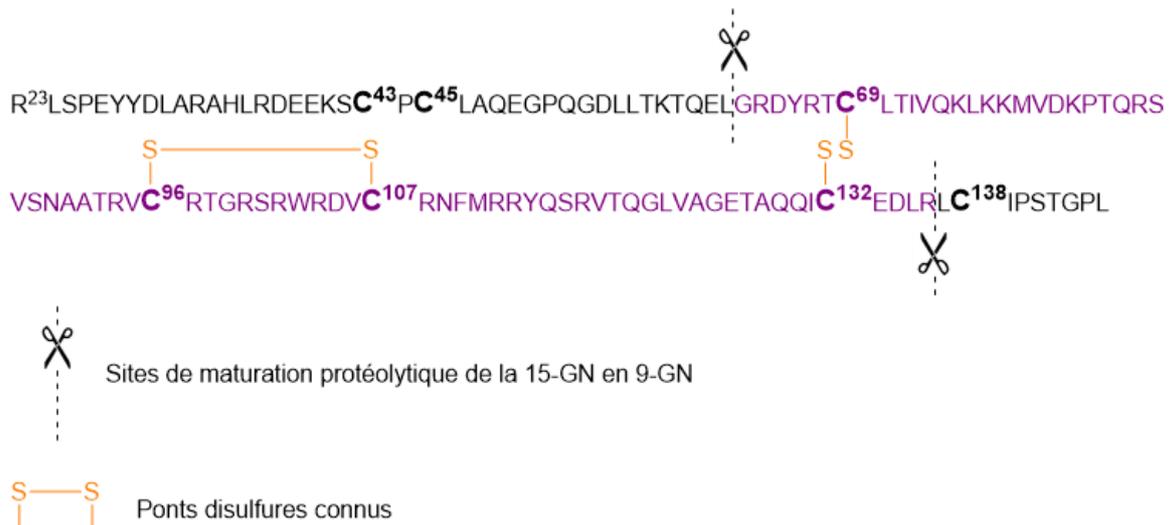


Figure 8. Séquences de la 15-GN (noir + violet) et de la 9-GN (violet).

La granulysine 9 kDa appartient à une famille de protéines appelée saposin-like (SAPLIP).¹²⁷ Ce nom provient des saposines, des protéines impliquées dans le métabolisme des sphingolipides au sein du système nerveux. Chez les mammifères, les membres de cette famille regroupent la protéine B du surfactant pulmonaire, des hydrolases de lipides, l'acyloxyacyl hydrolase et la sphingomyélinase acide. Les amoebapores A, B, C, produites par *Entamoeba histolytica* et la NK-lysine, issue de l'intestin du cochon, sont les plus étroitement apparentées au niveau structural. La NK-lysine est à 43% identique et à 67% similaire à la 9-GN. Elle est exprimée par les lymphocytes NK porcins et est capable de tuer une multitude de microbes.¹³⁴ Linde *et al.* ont d'ailleurs montré la conservation des résidus lysine et arginine entre la NK-lysine et la granulysine. La présence de ces résidus revêtant un caractère crucial pour l'activité antimicrobienne de la NK-lysine suggère que la granulysine dispose des mêmes fonctions.¹³⁵ Les amoebapores, quant à elles, sont présentes dans des granules cytolytiques

¹³³ Hanson, D.; Kaspar, A.; Poulain, F. R.; Krensky, A. M. *Mol. Immunol.* **1999**, *36*, 413-422.

¹³⁴ Andersson, M.; Gunne, J.; Agerberth, B.; Boman, A.; Bergman, T.; Sillard, R.; Jörnvall, H.; Mutt, V.; Olsson, B.; Wigzell, H.; Dagrlind, A.; Boman, H. G.; Gudmundsson, G. H. *EMBO J.* **1995**, *14*, 1615-1625.

¹³⁵ Linde, C. M. A.; Grundström, S.; Nordling, E.; Refai, E.; Brennan, P. J.; Andersson, M. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 6332-6339.

chez l'amibe et montrent également une activité bactéricide.^{136,137} Bien que des homologues de la granulysine existent chez beaucoup d'autres espèces, il est intéressant de noter qu'aucun homologue fonctionnel n'est présent chez la souris. L'étude *in vivo* des fonctions de cette molécule pourrait s'en retrouver facilitée.¹³⁸

Membre de la famille	Fonction	Identité à la 9-GN (%)	Similarité à la 9-GN (%)
Saposine A ¹³⁹	Activateur de sphingolipide hydrolase	21	46
Saposine B ¹³⁹	Activateur de sphingolipide hydrolase	19	50
Saposine C ¹³⁹	Activateur de sphingolipide hydrolase	19	53
Saposine D ¹³⁹	Activateur de sphingolipide hydrolase	20	46
Protéine B du surfactant pulmonaire ¹⁴⁰	Organisation des lipides du surfactant pulmonaire	19	53
Acyloxyacyl hydrolase ¹⁴¹	Lipase des phagocytes	22	50
Sphingomyélinase acide ¹⁴²	Sphingolipide hydrolase	13	42
Amoebapore A ¹⁴³	Protéine de <i>E. histolytica</i> formant de pores	16	47
Amoebapore B ¹⁴⁴	Protéine de <i>E. histolytica</i> formant de pores	13	42
Amoebapore C ¹⁴⁴	Protéine de <i>E. histolytica</i> formant de pores	18	47
NK-lysine ¹³⁴	Protéine porcine lytique des lymphocytes NK	43	67
Granulysine ¹⁴⁵	Protéine humaine lytiques des lymphocytes T cytotoxiques et NK	100	100

Tableau 1. Comparaison des séquences des membres de la famille des SAPLIP avec la 9-GN

La famille des SAPLIP dispose de résidus cystéines conservés. Tous les membres en possèdent 6 à l'exception des 9-GN et 15-GN qui en possèdent respectivement 4 et 7. Ces cystéines

¹³⁶ Krensky, A. M. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 317-320.

¹³⁷ Andreu, D.; Carreno, C.; Linde, C.; Boman, H. G.; Andersson, M. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 845-849.

¹³⁸ Krensky, A. M.; Clayberger, C. *Tissue Antigens* **2009**, *73*, 193-198.

¹³⁹ O'Brien, J. S. *FASEB J.* **1991**, *5*, 301-308.

¹⁴⁰ Jacobs, K. A.; Phelps, D. S.; Steinbrink, R.; Fisch, J.; Kriz, R.; Mitscock, L.; Dougherty, J. P.; Taesch, H. W.; Floros, J. J. *Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9808-9811.

¹⁴¹ Hagen, F. S.; Grant, F. J.; Kuijper, J. L.; Slaughter, C. A.; Moomaw, C. R.; Orth, K.; O'Hara, P. J.; Munford, R. S. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 8415-8423.

¹⁴² Schuchman, E. H.; Suchi, M.; Takahishi, T.; Sandhoff, K.; Desnick, R. J. *Biol. Chem.* **1991**, *266*, 8531-8539.

¹⁴³ Leippe, M.; Andra, J.; Nickel, R.; Tannich, E.; Muller-Eberhard, H. J. *Mol. Microbiol.* **1994**, *14*, 895-904.

¹⁴⁴ Leippe, M. *Toxicology* **1994**, *87*, 5-18.

¹⁴⁵ Pena, S. V.; Krensky, A. M. *Semin. Immunol.* **1997**, *9*, 117-125.

s'apparient pour former des ponts disulfure qui sont importants pour la structure et les fonctions de ces protéines. La structure aux rayons X de la granulysine confirme la présence de ces motifs structuraux (Figure 9).¹⁴⁶ Toutefois, en comparaison avec la NK-lysine dont la réduction des ponts disulfure entraîne une perte de l'activité cytolytique envers bactéries et cellules tumorales,¹⁴⁷ la réduction de la 9-GN augmente son activité lytique envers les cellules tumorales par un facteur 25.¹⁴⁸ Par conséquent, l'activité cytolytique de la 9-GN dans cette expérience ne semble pas dépendante de la présence des ponts disulfure.

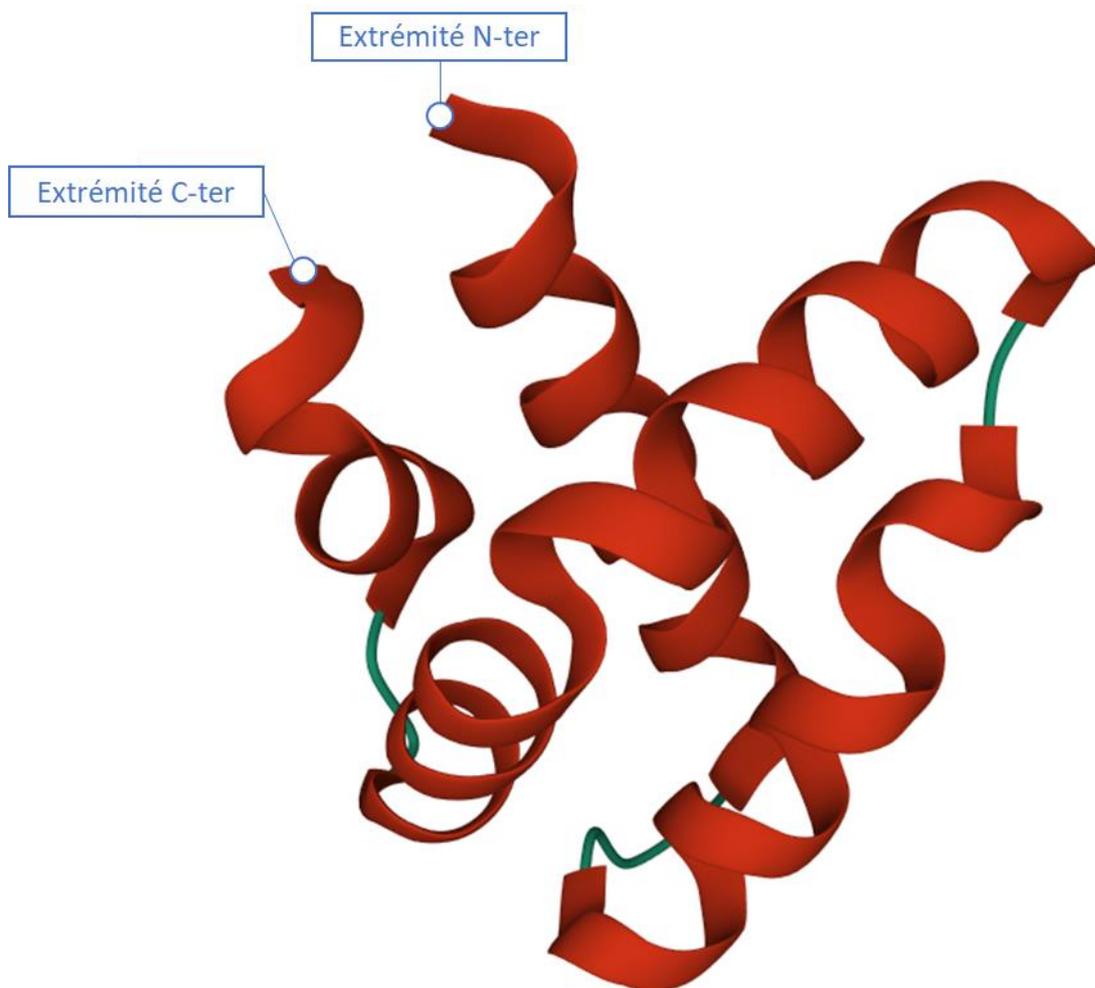


Figure 9. Structure cristallographique de la granulysine 9 kDa obtenue par diffraction des rayons X (code PDB 1L9L)¹⁴⁶

¹⁴⁶ Anderson, D.H.; Sawaya, M.R.; Cascio, D.; Ernst, W.; Modlin, R.; Krensky, A. M.; Eisenberg, D. J. *Mol. Biol.* **2003**, 325, 355.

¹⁴⁷ Andersson, M.; Jornvall, H.; Johansson, J.; *FEBS Lett.* **1995**, 362, 328-332.

¹⁴⁸ Wang, Z.; Choice, E.; Kespar, A.; Hanson, D.; Okada, S.; Lyu, S. C.; Krensky, A. M.; Clayberger, C. J. *Immunol.* **2000**, 165, 1486-1490.

Initialement, la 15-GN était considérée comme un simple précurseur de son isoforme cytotoxique de 9 kDa, probablement en raison de la difficulté à la produire en quantité suffisante pour son étude. Cependant, de récentes avancées suggèrent que la granulysine 15 kDa pourrait jouer un rôle bien plus important dans le système immunitaire que cela a pu être imaginé à l'origine. Les différences de localisation et de fonction des deux isoformes sont résumées dans le Tableau 2.

	<i>Granulysine 9 kDa</i>	<i>Granulysine 15 kDa</i>
Localisation subcellulaire	Séquestrée dans des granules cytotoxiques avec les granzymes et la perforine	Séquestrée dans ses propres granules
Mécanisme de libération	Libération par exocytose des granules, dépendant du calcium	Sécrétion spontanée, dépendante de la PKC
Fonction	Molécule antimicrobienne, cytotoxique, alarmine	Alarmine, inductrice de différenciation, chimioattractant, activité cytotoxique potentielle

Tableau 2 Comparaison des deux isoformes de la granulysine

Une découverte importante qui vient appuyer cette hypothèse réside dans le fait que 15- et 9-GN existent dans des granules différents au sein des cellules immunitaires et qu'elles requièrent l'activation de deux voies distinctes pour être libérées. Les recherches initiales de Clayberger *et al.* ont montré grâce à l'imagerie confocale de populations de lymphocytes NK que la 9-GN était colocalisée avec le marqueur lysosomal CD107a et les molécules cytotoxiques granzyme B et perforine. À l'activation de cellules NK, ces granules cytotoxiques sont libérés par un mécanisme d'exocytose.¹⁴⁹ À l'inverse, la 15-GN existe dans des granules distincts qui ne sont pas soumises à l'exocytose directe. Ces avancées ont été confirmées plus tard par Lettau *et al.*, qui ont séparé les granules contenant la granulysine 15 kDa de celles contenant l'isoforme de 9 kDa par centrifugation en gradient de densité.¹⁵⁰ Récemment, cette équipe a affiné ces résultats en montrant que la libération de la 15-GN repose sur une dégranulation dépendante de la protéine kinase C (PKC) tandis que la libération des granules

¹⁴⁹ Clayberger, C.; Finn, M. W.; Wang, T.; Saini, R.; Wilson, C.; Barr, V.; Sabatino, M.; Castiello, L.; Stroncek, D.; Krensky, A. M. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 6119-6126.

¹⁵⁰ Lettau, M.; Armbrust, F.; Dohmen, K.; Drews, L.; Poch, T.; Dietz, M.; Kabelitz, D.; Janssen, O. *Int. Immunol.* **2018**, *30*, 215-228.

contenant la 9-GN requiert la mobilisation de calcium.¹⁵¹ La cellule immunitaire peut ainsi mobiliser et relarguer séparément les deux isoforme de la granulysine selon l'activité qu'elle souhaite induire.

2. Action cytotoxique de la granulysine

2.1. Activité antimicrobienne de la 9-GN

La structure compacte organisée en 5 hélices α de la granulysine et son homologie avec des protéines antimicrobiennes connues comme la NK-lysine et les amoebapores suggèrent la fonction principalement cytotoxique de cette molécule. Les premiers travaux sur son activité antimicrobienne remontent à la fin des années 90. Stenger *et al.* ont ainsi montré que la 9-GN est capable, à l'échelle du micromolaire, de tuer une grande variété de bactéries Gram-positives et négatives comme *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* et *S. aureus*. La 9-GN tue également des champignons et des parasites comme *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* et *Leishmania major*.¹⁵²

De manière générale, les cellules cytotoxiques lysent leur cible *via* deux mécanismes distincts. Un premier mécanisme dit « non-sécrétoire » a été décrit par Chinnaiyan et ses collaborateurs impliquant des récepteurs de mort en surface (Figure 10). Fas et Fas-ligand, associé au TNF et à son récepteur TNF-R interagissent comme un système ligand-récepteur. Fas est une glycoprotéine transmembranaire de 48 kDa structurellement liée au TNF-R. La liaison de Fas avec Fas-ligand conduit à l'activation des caspases et à la mort cellulaire grâce au recrutement de FADD (Fas-associated death domain).¹⁵³ Le second mécanisme est « sécrétoire » et implique la libération directionnelle, par les lymphocytes T cytotoxiques, de granules contenant de la perforine, une famille de protéases à sérine : les granzymes et la 9-GN. La dégranulation est calcium-dépendante et la perforine et les granzymes contribuent à la lyse

¹⁵¹ Lettau, M.; Dietz, M.; Dohmen, K.; Leippe, M.; Kabelitz, D.; Janssen, O. *Mol. Immunol.* **2019**, *107*, 44-53.

¹⁵² Stenger, S.; Hanson, D. A.; Teitelbaum, R.; Dewan, P.; Niazi, K. R.; Froelich, C. J.; Ganz, T.; Thoma-Uszynski, S.; Melian, A.; Bogdan, C.; Porcelli, S. A.; Bloom, B. R.; Krensky, A. M.; Modlin, R. L. *Science* **1998**, *282*, 121-125.

¹⁵³ Chinnaiyan, A. M.; O'Rourke, K.; Tewari, M.; Dixit, V. M. *Cell* **1995**, *81*, 505-512.

de la cellule cible. Les granzymes entrent dans la cible grâce aux pores de poly-perforine, activent les caspases et contribuent à la lyse osmotique.¹⁵⁴

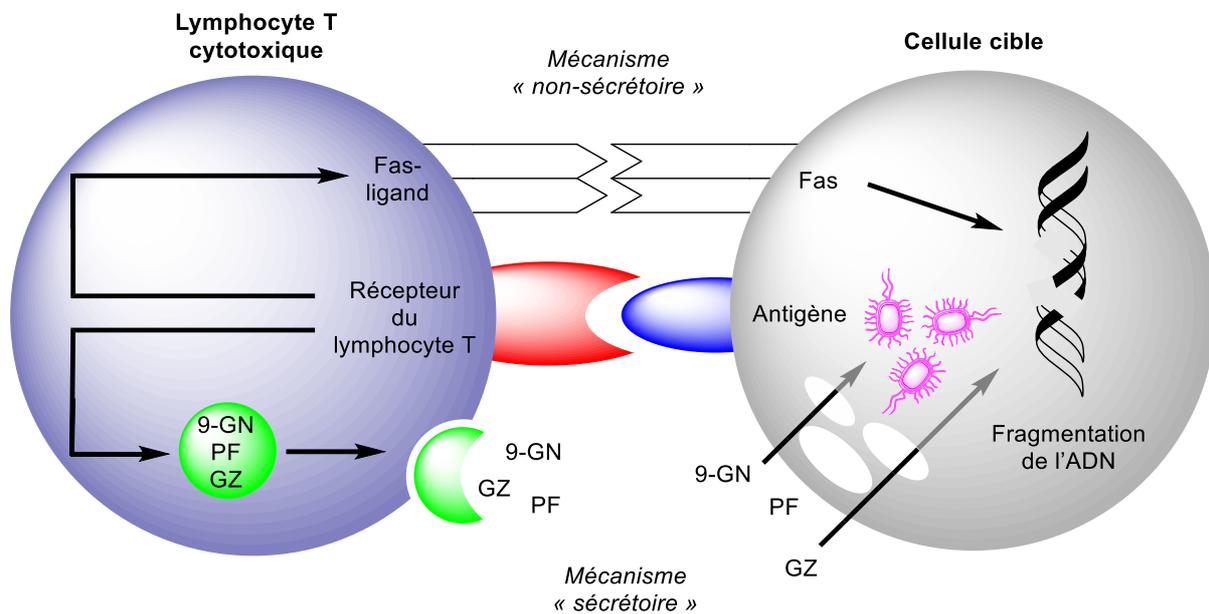


Figure 10. Cytolyse induite par le lymphocyte T cytotoxique. Le mécanisme « non sécrétoire » est induit par une liaison ligand-récepteur. Fas-ligand à la surface du lymphocyte interagit avec Fas à la surface de la cellule cible pour initier l'apoptose. Le mécanisme « sécrétoire » procède via l'exocytose de granules contenant la perforine (PF), les granzymes (GZ) et la granulysine 9 kDa (9-GN).

Le large spectre d'activité antimicrobienne de la 9-GN est similaire à d'autres peptides antimicrobiens comme les défensines.¹⁵⁵ La capacité des défensines à tuer *Mycobacterium tuberculosis* a conduit Stenger *et al.* à évaluer son activité contre ce pathogène. Ces travaux autour *M. tuberculosis* leur ont permis de mettre en avant le rôle critique de la granulysine dans la cytolyse induite par le lymphocyte T cytotoxique. *M. tuberculosis* peut être lysé par les CTLs CD8+ et CD4-CD8-.¹⁵⁶ Les CTLs CD8+ utilisent le mécanisme d'exocytose des granules pour tuer les macrophages infectés et éradiquer le pathogène intracellulaire. En revanche, les CTLs CD4-CD8- exercent leur cytotoxicité via le mécanisme Fas-Fas-ligand. Celui-ci ne permet cependant pas la mort du *M. tuberculosis* intracellulaire. Une des différences majeures entre ces deux types de lymphocytes est que les CTLs CD8+ expriment la granulysine et pas les CTLs

¹⁵⁴ Dotiwala, F.; Sen Santara, S.; Binker-Cosen, A. A.; Li, B.; Chandrasekaran, S.; Lieberman, J. *Physiol. Behav.* **2017**, *176* (5), 139–148.

¹⁵⁵ Boman, H. G. *Ann. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 61-92.

¹⁵⁶ Stenger, S.; Mazzaccaro, R. J.; Ujemura, K.; Cho, S.; Barnes, P. F.; Rosat, J. P.; Sette, A.; Brenner, M. B.; Porcelli, S. A.; Bloom, B. R.; Modlin, R. L. *Science* **1997**, *276*, 1684-1687.

CD4-CD8-. Lorsque les CTLs CD8+ sont prétraités au Sr²⁺ pour provoquer la dégranulation, ils perdent leur aptitude à tuer *M. tuberculosis*, assurant que cette activité procède *via* le mécanisme sécrétoire.¹⁵²

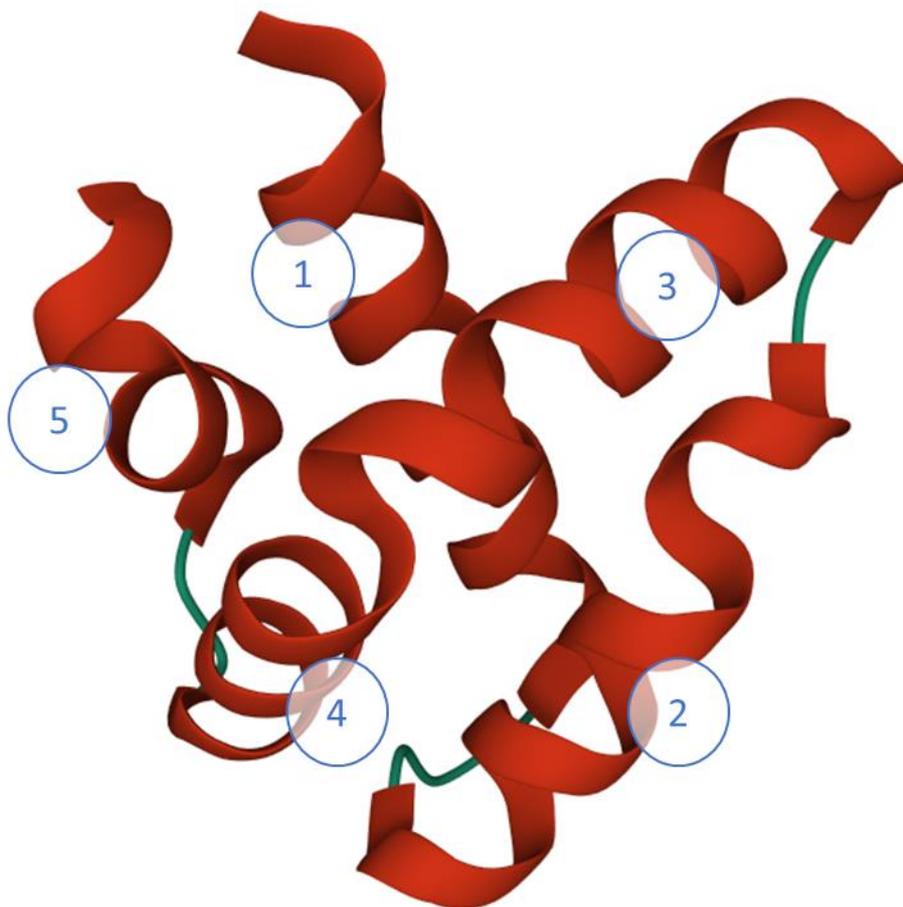
La 9-GN recombinante est capable de tuer *M. tuberculosis* en culture de manière dose-dépendante.¹⁵² Cependant, la protéine n'est pas capable de tuer le pathogène intracellulaire lorsqu'elle est ajoutée sur des macrophages infectés. La perforine seule est également incapable de tuer *M. tuberculosis* intracellulaire mais l'ajout combiné de 9-GN recombinante et de perforine purifiée sur des macrophages infectés conduit à la mort du pathogène intracellulaire. La granulysine et la perforine agissent donc de manière synergique pour lyser les pathogènes intracellulaires.

Les travaux de Wang *et al.* ont montré que les hélices 2 et 3 de la 9-GN sont particulièrement importantes pour cette activité (Figure 11).¹⁵⁷ Les auteurs ont produit des peptides dérivés de la 9-GN et ont ainsi montré que les peptides correspondant aux hélices 2 et 3 lysent des bactéries tandis que l'hélice 3 seule lyse des cellules humaines et des liposomes. Ceci suggère que différentes parties de la molécule interagissent avec différentes cibles. Cependant, Dotiwala et ses collaborateurs ont récemment mis en avant le fait que l'action lytique de la granulysine 9 kDa est 1000 fois plus importante lorsqu'elle est dirigée contre une paroi cellulaire bactérienne en comparaison avec des cellules de mammifère.¹⁵⁴ Notons toutefois que le mécanisme de sécrétion de la 9-GN par les cellules immunitaires cytotoxiques reste encore à clarifier. Des recherches ont montré qu'un petit lipopeptide présent chez *Mycobacterium leprae* est capable d'induire l'expression de la granulysine chez les lymphocytes T.¹⁵⁸ Un mécanisme de reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes pourrait être à l'origine de l'expression de la 9-GN par ces cellules.

¹⁵⁷ Wang, Z.; Choice, E.; Kaspar, A.; Hanson, D.; Okada, S.; Lyu, S. C.; Krensky, A. M.; Clayberger, C. J. *Immunol.* **2017**, *165*, 1486-1490.

¹⁵⁸ Maeda, Y.; Tamura, T.; Fukutomi, Y.; Mukai, T.; Kai, M.; Makino, M. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, 1-10.

A)



B)

DYRTCLTIVQKLKMMVDKPTQRSVSNAATRVCRTGRSRWRDVCNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLR



Figure 11. A) Annotation des hélices α sur la structure cristallographique de la 9-GN. B) Aperçu de la position des hélices α dans la séquence de la 9-GN. Les hélices α sont représentées en rouge.

2.2. Action de la 9-GN sur les cellules tumorales

En règle générale, l'isoforme de 9kDa de la granulysine est considéré comme responsable de la mort de pathogènes, de cellules infectées ou malignes de par sa nature cytotoxique. Le chemin par lequel la 9-GN entre dans la cellule cible reste à élucider et le récepteur de cette molécule, s'il existe, n'a pas encore été identifié. Bien qu'il soit communément admis que la granulysine 9 kDa entre dans la cellule cible grâce aux pores formés par la perforine, de récentes études suggèrent un mécanisme différent. L'hypothèse est que la 9-GN se replie d'une telle manière qu'elle présente une poche chargée positivement et qui peut interagir

avec les régions chargées négativement des cellules infectées ou cancéreuses ciblées par les cellules immunitaires cytotoxiques.^{146,159}

Les premiers travaux portant sur la mort cellulaire induite par la 9-GN relataient la capacité de la 9-GN recombinante à causer une augmentation des céramides chez les cellules Jurkat et une diminution simultanée de la sphingomyéline.¹⁶⁰ Ces effets résulteraient de la capacité de la 9-GN à activer la sphingomyélinase qui décompose la sphingomyéline en céramide et phosphorylcholine. L'activation de cette enzyme induirait la formation de pores au sein des membranes plasmiques contenant de la sphingomyéline et par conséquent provoquerait la lyse de la cellule cible.¹⁶⁰ Cependant, la mort de la cellule prend plus de 16 heures et d'autres études ont montré la capacité de la 9-GN recombinante à induire l'apoptose de cellules beaucoup plus rapidement. De plus, la concentration en granulysine nécessaire pour tuer ces cellules (50 µM) est largement supérieure aux concentrations rencontrées chez l'homme. Ce mécanisme d'apoptose apparaît donc comme un mode d'action secondaire de la granulysine 9 kDa.

Le mécanisme d'action de la 9-GN passe par une augmentation du calcium au sein de la cellule cible. Des études menées par Kaspar *et al.* ont montré que l'augmentation intracellulaire du calcium endommage les mitochondries, cause une augmentation de la concentration en cytochrome c et l'éventuelle activation de la caspase 3 provoquant l'apoptose de la cellule.¹⁵⁹ Des recherches complémentaires ont confirmé l'accroissement de la concentration intracellulaire en calcium en présence de 9-GN recombinante et ceci au sein du cytosol et des mitochondries. Cette augmentation est couplée à la diminution de la concentration en potassium et à l'augmentation de la concentration en protéine AIF (apoptosis induction factor) ; tous deux marqueurs de l'initiation de l'apoptose.^{161,162} Il a également été montré que la granulysine 9 kDa recombinante et les cellules qui la délivrent induisent l'apoptose par différents chemins. Saini *et al.* rapportent que la 9-GN recombinante induit l'apoptose en

¹⁵⁹ Kaspar, A.; Okada, S.; Kumar, J.; Poulain, F. R.; Drouvalakis, K.; Kelekar, A.; Hanson, D. A.; Kluck, R. M.; Hitoshi, Y.; Johnson, D. E.; Froelich, C. J.; Thompson, C. B.; Newmeyer, D. D.; Anel, A.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 350–356.

¹⁶⁰ Gamen, S.; Hanson, D.; Kaspar, A.; Naval, J.; Krensky, A. M.; Anel, A. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 1758–1764.

¹⁶¹ Okada, S.; Li, Q.; Whitin, J. C.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 2556–2562.

¹⁶² Pardo, J.; Perez-Galan, P.; Gamen, S.; Marzo, I.; Monleon, I.; Kaspar, A. A.; Susín, S. A.; Kroemer, G.; Krensky, A. M.; Naval, J.; Anel, A. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 1222–1229.

endommageant les mitochondries et en activant les caspases 3 ou 9.¹⁶³ En même temps, les auteurs montrent également que la 9-GN produite et délivrée par les lymphocytes NK endommage le réticulum endoplasmique, conduisant à l'apoptose, cette fois-ci *via* l'activation des caspases 7 et 12 et sans activation de la caspase 3. Ce phénomène serait provoqué par l'absence des molécules cytotoxiques (perforine, granzymes) lorsque la 9-GN recombinante est utilisée seule. La 9-GN compenserait plus particulièrement dans ce cas, l'absence des granzymes par ce mécanisme.¹⁶³

Plusieurs études ont montré que l'isoforme de 9 kDa de la granulysine est responsable de la mort de cellules tumorales selon les mécanismes présentés ci-avant. Une augmentation par un facteur 2,5 de la fragmentation de l'ADN et une réduction importante de la prolifération est observée lorsque des cellules MC-26 (cellules murines d'adénocarcinome du colon) sont cultivées en présence de 9-GN recombinante, suggérant l'initiation de l'apoptose.¹⁶⁴ Ces découvertes ont été postérieurement corroborées par des expériences menées sur des souris « nude » athymiques transfectées par des lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome du sein ou de myélome multiple. Le traitement par la 9-GN recombinante de ces souris a permis l'arrêt de la croissance des tumeurs et même leur complète éradication.¹⁶⁵ L'apoptose de ces cellules tumorales déclenchée par la 9-GN semble due à la diminution du potentiel membranaire mitochondrial au sein des cellules, menant à la libération d'AIF et de cytochrome c.¹⁶⁶

2.3. Débat sur l'activité cytotoxique de la 15-GN

Tous les travaux présentés jusqu'ici ont démontré le caractère principalement cytotoxique de l'isoforme de 9 kDa de la granulysine agissant envers différents types de pathogènes et de cellules tumorales. Le rôle de la granulysine 15 kDa est quant à lui encore mal compris. Initialement cette isoforme de la granulysine était considérée comme un précurseur inactif. Cependant, différents travaux ont montré qu'elle joue un rôle important dans la réponse

¹⁶³ Saini, R. V.; Wilson, C.; Finn, M. W.; Wang, T.; Krensky, A. M.; Clayberger, C. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 3497–3504.

¹⁶⁴ Sekiya, M.; Ohwada, A.; Katae, M.; Dambara, T.; Nagaoka, I. *Respirology* **2002**, *7*, 29–35.

¹⁶⁵ Al-Wasaby, S.; de Miguel, D.; Aporta, A.; Naval, J.; Conde, B.; Martínez-Lostao, L.; Anel, A. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, 1–13.

¹⁶⁶ Yi, Z.; Fu, Y.; Jin, G.; Li, M.; Zhang, X.; Song, W. *Cell. Immunol.* **2009**, *255*, 76–81.

immunitaire à travers diverses activités.^{138,167} La chimiotaxie, l'immunomodulation et l'induction de différenciation sont les activités biologiques communément admises de la 15-GN aujourd'hui, mais sa cytotoxicité reste quant à elle extrêmement controversée. Chung *et al.* ont montré que la 15-GN, et non la 9-GN, présente dans le fluide des cloques de patients atteints du syndrome de Stevens-Johnson ou du syndrome de Lyell peut exercer une activité cytotoxique envers les kératinocytes accroissant ainsi la sévérité de ces maladies de la peau.¹⁶⁸

Cependant, Clayberger *et al.* ont placé une grande variété de cellules tumorales et de bactéries en présence de 15-GN recombinante et n'ont détecté aucune cytotoxicité.¹⁴⁹ La différence majeure entre ces deux études tient au mode d'expression de la protéine. En effet, Chung *et al.* ont utilisé une granulysine recombinante contenant un tag de 6 histidines. Comme l'ont détaillé Finn et ses collaborateurs, la 15-GN disponible commercialement dispose toujours de tags et ceux-ci peuvent altérer significativement ses fonctions.¹⁶⁹ La granulysine produite par Clayberger *et al.* est exprimée dans des cellules d'insectes et récupérée exempte de toute contamination. Cette dernière a même été testée pour d'autres fonctions connues de la 15-GN afin d'assurer aux auteurs sa fonctionnalité.

En 2016, Wei *et al.* relancent le débat en annonçant disposer d'une méthode simple pour exprimer et purifier la 15-GN et que celle-ci dispose d'une activité antimicrobienne envers *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁷⁰ Les auteurs mettent en avant un mode d'action basé sur l'hyperpolarisation des membranes microbiennes les rendant perméables et entraînant la formation de radicaux superoxydes. Toutefois, aucune expérience qui permettrait de justifier ce nouveau mécanisme n'est rapportée.

¹⁶⁷ Zitvogel, L.; Kroemer, G. *Blood* **2010**, *116*, 3379–3380.

¹⁶⁸ Chung, W. H.; Hung, S. I.; Yang, J. Y.; Su, S. C.; Huang, S. P.; Wei, C. Y.; Chin, S. W.; Chiou, C. C.; Chu, S. C.; Ho, H. C.; Yang, C. H.; Lu, C. F.; Wu, J. Y.; Liao, Y. D.; Chen, Y. T. *Nat Med.* **2008**, *14*, 1343–50.

¹⁶⁹ Finn, M. W.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *Protein Expr Purif.* **2011**, *75*, 70–74.

¹⁷⁰ Wei, H. M.; Lin, L. C.; Wang, C. F.; Lee, Y. J.; Chen, Y. T.; Liao, Y. D. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156321.

3. Autres activités de la granulysine dans la réponse immunitaire

Depuis sa découverte, de nombreux travaux ont montré que la granulysine 15 kDa joue un rôle d'alarmine immunitaire, que l'on peut définir comme toute molécule sécrétée par une cellule endommagée ou malade et qui stimule la réponse immunitaire.¹⁷¹ Les alarmines sont des médiateurs endogènes qui induisent le recrutement et l'activation de cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques, et qui activent le déclenchement d'une réponse immunitaire.

3.1. Induction de différenciation cellulaire provoquée par la 15-GN

Les travaux autour de la capacité de la 15-GN à agir comme une alarmine immunitaire ont, en premier lieu, révélé son implication dans la maturation de populations de cellules dendritiques.¹⁷¹ Clayberger *et al.* ont également montré l'aptitude de la 15-GN recombinante à provoquer la maturation des cellules dendritiques immatures humaines. Lorsque 10 nM de granulysine 15 kDa sont ajoutés au milieu de culture de cellules dendritiques immatures, les auteurs observent une augmentation de l'expression de CD80, CD86, HLA-DR et CD40 indiquant la maturation.¹⁴⁹ La maturation des cellules dendritiques en réponse à une infection ou à une tumeur est cruciale pour l'activation supplémentaire des cellules de l'immunité adaptative qui constituent le deuxième bras armé du système immunitaire.

La 15-GN recombinante a également démontré sa capacité à provoquer la différenciation de monocytes en cellules dendritiques en plus de la maturation des cellules dendritiques immatures. Les recherches de Clayberger et ses collaborateurs ont montré que lorsqu'ils sont cultivés en présence de 10 nM de 15-GN recombinante, des monocytes humains CD14⁺ augmentent leur expression de CD80, CD83 et CD86 qui sont des marqueurs de la différenciation des cellules dendritiques.¹⁴⁹ Cette découverte a été renforcée par Castiello *et al.* qui ont montré que la culture de monocytes humains avec 10 nM de 15-GN recombinante cause l'augmentation de l'expression de gènes liés à la réponse immunitaire, à la chimiotaxie et à l'adhésion cellulaire chez ces monocytes. De plus, ils ont observé l'activation de chemins

¹⁷¹ Tewary, P.; Yang, D.; de la Rosa, G.; Li, Y.; Finn, M. W.; Krensky, A. M.; Clayberger, C.; Oppenheim, J. J. *Blood* **2010**, *116*, 3465–3474.

associés aux fonctions fondamentales des cellules dendritiques chez ces même monocytes et parmi eux les chemins pour l'activation des lymphocytes T et pour le développement des lymphocytes T auxiliaires Th1.¹⁷²

3.2. Activité chimiotactique de la 9-GN

De manière analogue aux défensines, qui disposent à la fois d'activités cytolytique et proinflammatoire, la granulysine 9 kDa est également un chimioattractant pour une grande variété de cellules.¹⁷³ La 9-GN recombinante attire les lymphocytes T, des lignées tumorales de monocytes et de lymphocytes NK. La protéine montre une activité chimiotactique maximale pour les lymphocytes T CD4+, CD8+ et les monocytes à une concentration de 10 nM. Par ailleurs, ces mêmes cellules traitées par la toxine pertussique ne migrent pas en présence de la 9-GN ce qui suggère l'implication d'un récepteur couplé aux protéines G mais dont l'identité reste pour l'heure inconnue.

L'étude menée par Tewary *et al.* a également montré la capacité de la 9-GN à recruter *in vivo* des cellules immunitaires de souris.¹⁷¹ Injectée dans la cavité péritonéale de souris C57BL/6, la protéine permet une augmentation substantielle du taux de leucocytes intrapéritonéaux inflammatoires 4 h et 24 h après l'injection. Les populations cellulaires recrutées après 4 h sont avant tout des neutrophiles et des monocytes inflammatoires. Après 24 h, les monocytes inflammatoires sont remplacés par une sous-population de macrophages. D'autres cellules comme des cellules dendritiques sont également recrutées.

3.3. Activité chimiotactique de la 15-GN

La 15-GN est également connue pour disposer d'une activité chimiotactique. Tewary et ses collaborateurs ont en effet rapporté la migration des cellules dendritiques immatures humaines et murines lorsqu'elles sont mises en présence de 10 nM de 15-GN recombinante ou d'un surnageant contenant de la granulysine issue de la culture de lymphocyte NK et de

¹⁷² Castiello, L.; Stroncek, D. F.; Finn, M. W.; Wang, E.; Marincola, F. M.; Clayberger, C.; Krensky, A. M.; Sabatino, M. J. *Transl. Med.* **2011**, *9*, 41.

¹⁷³ Deng, A.; Chen, S.; Li, Q.; Lyu, S. C.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *J Immunol.* **2005**, *174*, 5243–5248.

lymphocytes T HuT78 transfectés avec le gène de la granulysine.¹⁷¹ Lorsque la 15-GN présente dans les surnageants est inhibée par un anticorps bloquant spécifique de cette isoforme, la migration des cellules immunitaires est réduite suggérant l'implication de la granulysine 15 kDa dans le processus de migration.¹⁷¹

3.4. Induction de l'expression de facteurs proinflammatoires par la 9-GN

En plus de ses activités d'induction de différenciation et de chimiotaxie, la 9-GN active l'expression et la sécrétion de cytokines proinflammatoires chez les cellules immunitaires. Elle est connue pour augmenter la production de TNF- α chez les monocytes stimulés par des liposaccharides.¹⁷⁴ Ce résultat a conduit Deng et ses collaborateurs à examiner plus en détails l'effet de la granulysine sur l'expression de cytokines proinflammatoires. Ils rapportent que la culture de monocytes humains U-937 en présence 9-GN recombinante entraîne une augmentation de la transcription des gènes codant pour MCP-1, MCP-3, MIP-1, RANTES, IL-1, IL-6, IL-10 et IFN- α .¹⁷³ Les auteurs supposent que la production de cytokines/chimiokines en réponse à la granulysine pourrait permettre aux monocytes de recruter d'autres cellules immunitaires à proximité du site d'infection. Afin de tester cette hypothèse, ils ont comparé, chez les monocytes U-937 et des monocytes purifiés de sang humain, l'effet de la 9-GN sur la production de MCP-1 et RANTES, deux protéines connues pour leur activité chimiotactique envers différentes cellules immunitaires. Dans les deux cas, les cellules cultivées avec la 9-GN recombinante présentent un taux d'expression de MCP-1 et de RANTES significativement supérieur.

3.5. Induction de l'expression de facteurs proinflammatoires par la 15-GN

L'induction par la granulysine 15 kDa de l'expression de facteurs proinflammatoires a été révélée par les travaux de Castiello et ses collaborateurs. En cherchant à montrer l'activité d'induction de différenciation des monocytes en cellules dendritiques par la 15-GN, les auteurs ont comparé son action à celle du facteur de stimulation des colonies de granulocytes

¹⁷⁴ Mander, T.; Hill, S.; Hughes, A.; Rawlins, P.; Clark, C.; Gammon, G.; Foxwell, B.; Moore, M. *Int. J. Immunopharmacol.* **1997**, *19*, 451.

et de macrophages (GM-CSF). Contrairement au traitement par le GM-CSF, le traitement par la 15-GN de monocytes humains purifiés régule positivement l'expression de signaux de costimulation (CD80, CD83, CD86, HLA-DR), entraîne une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires et permet aux cellules dendritiques de stimuler la prolifération de lymphocytes.¹⁷² Plus particulièrement, la granulysine 15 kDa induit chez les monocytes l'expression d'un large ensemble de chimiokines capables d'attirer les neutrophiles (CXCL1, CXCL3),¹⁷⁵ les lymphocytes T à mémoire (CXCL11, CCL20, CCR7),^{176,177} les monocytes (CCL2, CCL20),¹⁷⁸ les macrophages et les cellules dendritiques (NRP2).¹⁷⁹ Plusieurs études ont montré que les chimiokines agissent en synergie,^{180,181} et renforcent ainsi leur signal en limitant l'action d'éventuels facteurs antagonistes sécrétés par les pathogènes.^{182,183} Toutes considérées, ces observations indiquent que la granulysine 15 kDa joue un rôle important dans l'activation du système immunitaire en réponse à une infection, en induisant le recrutement par les monocytes d'autres cellules immunitaires.

Comme pour la 9-GN, Tewary et ses collaborateurs ont également mis en évidence l'action proinflammatoire de la 15-GN envers des cellules humaines et murines les poussant à rechercher un récepteur potentiel à cette molécule.¹⁷¹ Ils ont examiné l'implication de la protéine MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) dans la réponse à la 15-GN. Il s'agit d'une protéine adaptatrice qui joue le rôle de connecteur entre les récepteurs TLRs (Toll like receptors) et les protéines qui transduisent le signal à l'intérieur de la cellule.¹⁸⁴ Des macrophages murins de type naturel et d'autres pour lesquels le gène codant pour MyD88 a été invalidé ont été traités à la 15-GN et la présence d'IL-6 a été quantifiée dans les surnageants. L'absence d'IL-6 dans le surnageant des macrophages n'exprimant pas MyD88 a

¹⁷⁵ Scimone, M. L.; Lutzky, V. P.; Zittermann, S. I.; Maffia, P.; Jancic, C.; Buzzola, F.; Issekutz, A. C.; Chuluyan, H. E. *Immunology*. **2005**, *114*, 375–385.

¹⁷⁶ Sallusto, F.; Schaerli, P.; Loetscher, P.; Schaniel, C.; Lenig, D.; Mackay, C. R.; Qin, S.; Lanzavecchia, A. *Eur J Immunol*. **1998**, *28*, 2760–2769.

¹⁷⁷ Schutysse, E.; Struyf, S.; Van, D. J. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2003**, *14*, 409–426.

¹⁷⁸ Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. E. *J Interferon Cytokine Res*. **2009**, *29*, 313–326.

¹⁷⁹ Rey-Gallardo, A.; Escribano, C.; Delgado-Martin, C.; Rodriguez-Fernandez, J. L.; Gerardy-Schahn, R.; Rutishauser, U.; Corbi, A. L.; Vega, M. A. *Glycobiology* **2010**, *20*, 1139–1146.

¹⁸⁰ Vanbervliet, B.; Bendriss-Vermare, N.; Massacrier, C.; Homey, B.; de Bouteiller, O.; Briere, F.; Trinchieri, G.; Caux, C. *J Exp Med*. **2003**, *198*, 823–830.

¹⁸¹ Gouwy, M.; Struyf, S.; Proost, P.; Van Damme, J. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2005**, *16*, 561–580.

¹⁸² Rosenkilde, M. M. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, 1–13.

¹⁸³ Alcamí, A.; Saraiva, M. *Adv Exp Med Biol*. **2009**, *666*, 167–179.

¹⁸⁴ Farrugia, M.; and Baron, B. *Int. J. Inflamm.* **2017**, 83912300

mis les auteurs sur la piste des récepteurs TLRs. Ils ont ensuite isolé des cellules dendritiques de souris de type naturel et porteuses d'une mutation rendant non fonctionnels leurs récepteurs TLR4. En réponse à la 15-GN, les cellules dendritiques de souris de type naturel ont acquis un phénotype mature avec la régulation positive de CD80 et l'expression des cytokines proinflammatoires IL-6 et TNF α . En revanche, les cellules mutantes n'ont pas été capables de réguler positivement leurs marqueurs de surface et n'ont produit aucune cytokine. Par conséquent, les auteurs concluent que l'effet activateur de la 15-GN procède *via* sa liaison au récepteur TLR4.

De manière collective, toutes ces études indiquent que les granulysines contribuent à la réponse immunitaire aux différentes échelles que sont le recrutement, la différenciation de cellules immunitaires et l'activation de la sécrétion de médiateurs proinflammatoires (Figure 12). À des concentrations nanomolaires, la 9-GN provoque la chimiotaxie d'un grand nombre de cellules immunitaires et active les monocytes pour qu'ils produisent une grande variété de molécules proinflammatoires. Dans cette même gamme de concentration, la 15-GN provoque la migration des cellules dendritiques immatures, la différenciation de ces dernières et des monocytes en cellules dendritiques ainsi que la maturation des lymphocytes T en lymphocytes T auxiliaires. Comme son isoforme de 9 kDa, la granulysine 15 kDa induit l'expression de facteurs proinflammatoires chez le monocyte. Une question importante reste toutefois en suspens, toutes ces activités d'alarmine procèdent-elles grâce à la liaison des granulysines 9 et 15 kDa à un récepteur unique ? Au travers d'observations menées dans les études citées ci-avant, les activités de ces protéines pourraient être régulées par un récepteur couplé aux protéines G. Les travaux de Deng *et al.* et Tewary *et al.* ont tous deux montré que l'exposition de cellules dendritiques immatures à la toxine pertussique avant leur traitement par la granulysine supprime l'activité chimiotactique de la molécule.^{171,173} Les seconds ont également démontré l'implication du récepteur TLR4 dans la maturation des cellules dendritiques par la 15-GN. La dualité de forme et pluralité des activités de la granulysine peuvent néanmoins laisser supposer qu'elles interagissent avec plusieurs cibles.

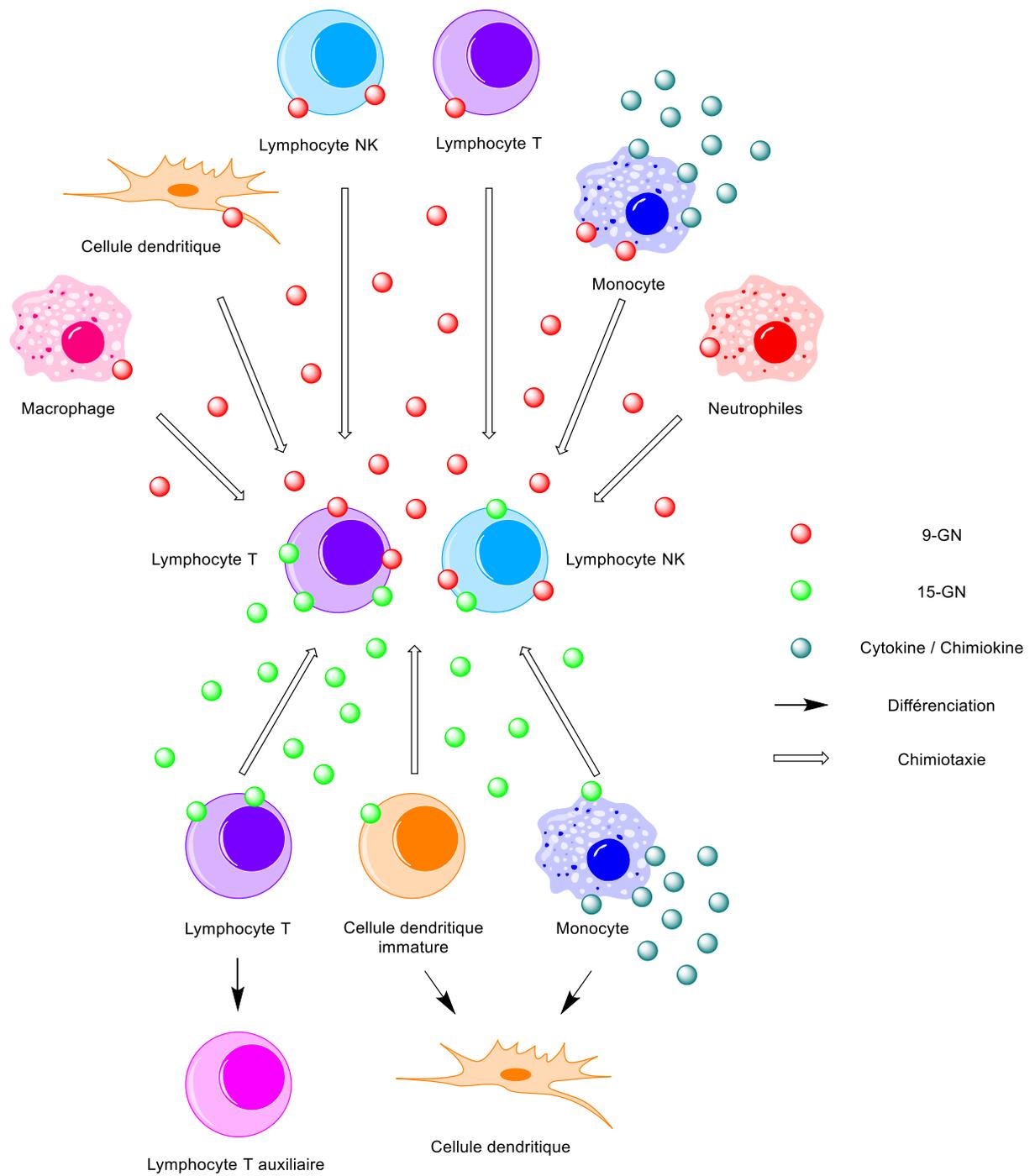


Figure 12. Résumé des activités d'alarme immunitaire des granulysines 9 et 15 kDa.

4. La granulysine comme marqueur de plusieurs pathologies

4.1. Maladies infectieuses

La 9-GN est impliquée dans la réponse immunitaire face à une grande diversité d'agents pathogènes comme les bactéries, les parasites, les champignons ou les protozoaires. Beaucoup de travaux se sont concentrés sur le rôle de la granulysine en réponse à une infection par *Mycobacterium tuberculosis*. Une corrélation forte a d'ailleurs été montrée entre l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et le faible taux des isoformes de la granulysine dans le plasma des sujets infectés.^{185,186} La 9-GN est capable de tuer à la fois les formes extra- et intracellulaires de ce pathogène. Les bactéries extracellulaires sont directement ciblées par la granulysine grâce à son aptitude à altérer l'intégrité de leur membrane et induisant leur lyse osmotique.^{129,187} L'action perforante de la perforine est toutefois indispensable à la lyse des bactéries intracellulaires par la 9-GN puisqu'elle lui permet l'accès à l'intérieur des cellules infectées.¹⁸⁸ La production de 9-GN *de novo* au sein des cellules cytotoxiques et en réponse à *M. tuberculosis* s'est révélée dépendante du contact entre ces deux cellules par l'intermédiaire de structures de type nanotube produites par les cellules immunitaires. Lu *et al.* ont montré que ce contact provoque la stimulation de voies de signalisation impliquant ERK, JNK et p38 MAPKs au sein des cellules NK. Ceci conduit à une augmentation par 2,2 fois de la production de granulysine 9 kDa dans ces cellules.¹⁸⁹

La granulysine est également impliquée dans la réponse immunitaire à un grand nombre d'autres pathogènes. En plus de *M. tuberculosis*, elle est impliquée dans la réponse à d'autres *Mycobacterium* dont *Mycobacterium leprae*. Ochoa *et al.* ont montré que les lymphocytes T

¹⁸⁵ Pitabut, N.; Sakurada, S.; Tanaka, T.; Ridruechai, C.; Tanuma, J.; Aoki, T.; Kantipong, P.; Piyaworawong, S.; Kobayashi, N.; Dhepakson, P.; Yanai, H.; Yamada, N.; Oka, S.; Okada, M.; Khusmith, S.; Keicho, N. *Int. J. Med. Sci.* **2013**, *10*, 1003-1014.

¹⁸⁶ Sahiratmadja, E.; Alisjahbana, B.; Buccheri, S.; Di Liberto, D.; de Boer, T.; Adnan, I.; van Crevel, R.; Klein, M. R.; van Meijgaarden, K. E.; Nelwan, R. H. H.; van de Vosse, E.; Dieli, F.; Ottenhoff, T. H. M. *Tuberculosis* **2007**, *87*, 312-321.

¹⁸⁷ Ernst, W. A.; Thoma-Uszynski, S.; Teitelbaum, R.; Ko, C.; Hanson, D. A.; Clayberger, C.; Krensky, A. M.; Leippe, M.; Bloom, B. R.; Ganz, T.; Modlin, R. L. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 7102-7108.

¹⁸⁸ Dieli, F.; Troye-Blomberg, M.; Ivanyi, J.; Fournié, J. J.; Krensky, A. M.; Bonneville, M.; Peyrat, M. A.; Caccamo, N.; Sireci, G.; Salerno, A. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 1082-1085.

¹⁸⁹ Lu, C. C.; Wu, T. S.; Hsu, Y. J.; Chang, C. J.; Lin, C. S.; Chia, J. H.; Wu, T. L.; Huang, T. T.; Martel, J.; Ojcius, D. M.; Young, J. D.; Lai, H. C. *J. Leukoc. Biol.* **2014**, *96*, 1119-1129.

$\alpha\beta$ CD4⁺ exprimant la granulysine sont présents en quantité 6 fois supérieure dans les lésions lépreuses de patient présentant une forme contenue de l'infection en comparaison avec les lésions de patient présentant une forme disséminée. Ces lymphocytes sont capables de cibler *M. leprae* par un mécanisme d'exocytose de granules et la granulysine s'est révélée responsable de la réduction de la viabilité de cette bactérie.¹⁹⁰

D'autres travaux montrent que des populations de lymphocytes T $\alpha\beta$ CD8⁺ utilisent la granulysine pour tuer le champignon *Cryptococcus neoformans*,¹⁹¹ tandis que les lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2⁺ exprimant la granulysine sont un pivot de l'immunité contre le parasite *Plasmodium falciparum*, l'un des agents responsables de la malaria. Farouk *et al.* ont montré *in vitro* la réduction de la viabilité de ce parasite *via* un mécanisme d'exocytose de granules et fortement corrélée avec l'expression de la granulysine.¹⁹²

4.2. Cancers

L'expression de la granulysine s'est vue largement corrélée à de bons résultats pour divers cancers. La faible expression des granulysines 9 et 15 kDa, mais pas de la perforine, chez les lymphocytes NK CD3⁻ CD16⁺ s'accompagne de la progression du cancer chez les patients atteints.¹⁹³ En revanche, un niveau élevé de perforine et de granulysine est détecté au sein des lymphocytes NK sains témoins. Les patients ne présentant pas de tumeur expriment la granulysine à un niveau similaire à celui des cellules contrôles tandis que les patients atteints de cancer montrent une diminution significative. En revanche, les niveaux de perforine sont similaires pour tous les groupes. Ces travaux suggèrent donc que l'amoindrissement de l'expression de la granulysine chez les lymphocytes NK circulants est corrélé à la progression de tumeurs.¹⁹³

¹⁹⁰ Ochoa, M. T.; Stenger, S.; Sieling, P.; Thoma-Uszynski, S.; Sabet, S.; Cho, S.; Krensky, A. M.; Rollinghoff, M.; Nunes Sarno, E.; Burdick, A. E.; Rea, T. H.; Modlin, R. L. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 174–179.

¹⁹¹ Chun, F. Z.; Ling, L. M.; Jones, G. J.; Gill, M. J.; Krensky, A. M.; Kubes, P.; Mody, C. H. *Blood* **2007**, *109*, 2049–2057.

¹⁹² Farouk, S. E.; Mincheva-Nilsson, L.; Krensky, A. M.; Dieli, F.; Troye-Blomberg, M. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 2248–2256.

¹⁹³ Kishi, A.; Takamori, Y.; Ogawa, K.; Takano, S.; Tomita, S.; Tanigawa, M.; Niman, M.; Kishida, T.; Fujita, S. *Cancer Immunol Immunother.* **2002**, *50*, 604–614.

D'autres études ont également indiqué que l'expression de la granulysine chez les cellules capables d'infiltrer les tumeurs est synonyme de résultats positifs. Pages *et al.* ont rapporté une corrélation entre une faible expression du gène de la granulysine chez les lymphocytes T effecteurs à mémoire au sein d'infiltrats tumoraux et l'apparition précoce de métastases ainsi qu'un faible taux de survie.¹⁹⁴ Une expression élevée de ce même gène dispose toutefois d'une influence positive sur le carcinome colorectal. D'autres travaux ont suggéré que l'expression des granulysines est un biomarqueur utile de l'issue de carcinomes gastriques¹⁹⁵ et de neuroblastomes.¹⁹⁶ Un groupe japonais a également montré que l'expression de la 9-GN dans un modèle murin de cancer du poumon à petites cellules est protecteur.¹⁹⁷

4.3. Transplantations

La granulysine est également un marqueur utile lors de transplantations.¹⁹⁸ Sarwal et ses collaborateurs ont montré que l'expression *in situ* de granulysine est un marqueur de rejet aigu et de résistance aux stéroïdes lors de transplantations rénales.¹⁹⁹ Kotsh *et al.* ont rapporté qu'une augmentation de l'expression de l'ARNm de la granulysine dans les sédiments urinaires est le meilleur marqueur du rejet des allogreffes rénales précoce et tardive.²⁰⁰ Hidalgo *et al.* ont trouvé, en examinant le transcriptome des lymphocytes T cytotoxiques présents dans des biopsies de transplantations rénales, que la granulysine est le transcrit le plus exprimé chez les lymphocytes T cytotoxiques CD4⁺ et CD8⁺.²⁰¹ Lors de la transplantation allogénique, mais pas autologue, de cellules souches, la quantité de granulysine présente dans le sérum est transitoirement accrue durant les 3 semaines qui suivent la transplantation.²⁰² Le taux de

¹⁹⁴ Pages, F.; Berger, A.; Camus, M.; Sanchez-Cabo, F.; Costes, A.; Molidor, R.; Mlecnik, B.; Kirilovsky, A.; Nilsson, M.; Damotte, D.; Meatchi, T.; Bruneval, P.; Cugnenc, P. H.; Trajanoski, Z.; Fridman, W. H.; Galon, J. *N Engl J Med.* **2005**, *353*, 2654–2666.

¹⁹⁵ Saigusa, S.; Ichikura, T.; Tsujimoto, H.; Sugawara, H.; Majima, T.; Kawarabayashi, N.; Chochi, K.; Ono, S.; Kinoshita, M.; Seki, S.; Ogawa, K.; Mochizuki, H. *J Gastroenterol Hepatol.* **2007**, *22*, 1322–1327.

¹⁹⁶ Nagasawa, M.; Kawamoto, H.; Tsuji, Y.; Mizutani, S. *Int J Hematol.* **2005**, *82*, 456–457.

¹⁹⁷ Sekiya, M.; Ohwada, A.; Katae, M.; Dambara, T.; Nagaoka, I.; Fukuchi, Y. *Respirology.* **2002**, *7*, 29–35.

¹⁹⁸ Krensky AM, Clayberger C. *Am J Transplant.* **2005**, *5*, 1789–1792.

¹⁹⁹ Sarwal, M. M.; Jani, A.; Chang, S.; Huie, P.; Wang, Z.; Salvatierra, O. Jr.; Clayberger, C.; Sibley, R.; Krensky, A. M.; Pavlakis, M. *Hum Immunol.* **2001**, *62*, 21–31.

²⁰⁰ Kotsch, K.; Mashreghi, M. F.; Bold, G.; Tretow, P.; Beyer, J.; Matz, M.; Hoerstrup, J.; Pratschke, J.; Ding, R.; Suthanthiran, M.; Volk, H. D.; Reinke, P. *Transplantation* **2004**, *77*, 1866–1875.

²⁰¹ Hidalgo, L. G.; Einecke, G.; Allanach, K.; Mengel, M.; Sis, B.; Mueller, T. F.; Halloran, P. F. *Am J Transplant.* **2008**, *8*, 637–646.

²⁰² Nagasawa, M.; Isoda, T.; Itoh, S.; Kajiwara, M.; Morio, T.; Shimizu, N.; Ogawa, K.; Nagata, K.; Nakamura, M.; Mizutani, S. *Am J Hematol.* **2006**, *81*, 340–348.

granulysine augmente nettement et corrèle avec la sévérité de la réaction du greffon contre l'hôte, suggérant que cette protéine pourrait être un biomarqueur important dans ce contexte.

4.4. Maladies de peau

La granulysine se révèle également impliquée dans plusieurs maladies de la peau. Oono et ses collaborateurs ont noté la présence au sein des lésions causées par la folliculite de cellules lymphoïdes et de lymphocytes T exprimant la granulysine.²⁰³ En 2004, Raychaudhuri *et al.* remarquent la forte expression de la granulysine dans les lymphocytes T et les cellules dendritiques qui infiltrent les plaques de psoriasis. Cette découverte permet aux auteurs de rationaliser la relative immunité des plaques psoriasiques face aux infections bactériennes.²⁰⁴ L'étude menée par Ammar *et al.* a également révélé une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de la granulysine au sein de lésions provoquées par le lichen plan en comparaison avec des tissus sains.²⁰⁵ Des lymphocytes T cytotoxiques CD4+ et CD8+ ont également été retrouvés dans les vésicules herpétiques et les lésions causées par un hydroa vacciniforme.²⁰⁶ Chung *et al.* ont également montré que l'injection intradermique de 15-GN recombinante provoque des nécroses cutanées et des cloques imitant les caractéristiques cliniques des syndromes de Stevens-Johnson et de Lyell.¹⁶⁸

4.5. Affections reproductives

L'accroissement des connaissances autour des fonctions immunitaires des organes reproducteurs a fait émerger la présence de la granulysine au sein de l'endomètre.²⁰⁷ L'expression de l'ARNm de la granulysine est maximale dans l'endomètre lors de la phase proliférative tardive. La présence de cette protéine au cours de cette phase pourrait fournir

²⁰³ Oono, T.; Morizane, S.; Yamasaki, O.; Shirafuji, Y.; Huh, W. K.; Akiyama, H.; Iwatsuki, K. *Br J Dermatol.* **2004**, *150*, 904–909.

²⁰⁴ Raychaudhuri, S. P.; Jiang, W. Y.; Raychaudhuri, S. K.; Krensky, A. M. *J Am Acad Dermatol.* **2004**, *51*, 1006–1008.

²⁰⁵ Ammar, M.; Mokni, M.; Boubaker, S.; El Gaied, A.; Ben Osman, A.; Louzir, H. *J Cutan Pathol.* **2008**, *35*, 630–634.

²⁰⁶ Morizane, S.; Suzuki, D.; Tsuji, K.; Oono, T.; Iwatsuki, K. *Br J Dermatol.* **2005**, *153*, 981–986.

²⁰⁷ King, A. E.; Critchley, H. O.; Kelly, R. W. *Reprod Biol Endocrinol.* **2003**, *1*, 116-123.

une protection supplémentaire au moment de l'implantation de l'embryon ou des règles en absence d'embryon. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ de la caduque basale expriment l'ARNm de 5 molécules cytotoxiques dont la granulysine au début de la grossesse.²⁰⁸ Les travaux de Balogh *et al.* ont également révélé que la granulysine serait une des empreintes moléculaires du changement génomique provoqué par la grossesse.²⁰⁹ En effet, les auteurs ont noté la surexpression du gène de la granulysine dans les cellules épithéliales de la poitrine de femmes paires ménopausées en comparaison avec les mêmes cellules pour des femmes nullipares. Enfin, d'autres travaux ont révélé un taux élevé de granulysine dans le sérum de patientes atteintes de prééclampsie ainsi qu'une corrélation avec les autres signaux cliniques comme l'augmentation de la pression artérielle et le statut immunologique.^{210,211} L'altération de la réponse immunitaire semble en effet jouer un rôle clé dans l'apparition de cette pathologie.²¹² L'inflammation endothéliale y serait, par exemple, induite par l'activation de neutrophiles, de monocytes et de lymphocytes NK. Le profil de cytokines exprimé lors de la prééclampsie est également dominé par des cytokines proinflammatoires et la production de cytokines régulatrices de l'inflammation est diminuée.

5. Intérêts thérapeutiques de la granulysine et limites

La grande variété d'activités des granulysines 9 et 15 kDa ainsi que de leur pertinence clinique donnent à ces protéines un réel potentiel en tant qu'agent thérapeutique contre le cancer et les maladies infectieuses. A ce jour, plusieurs études ont mis en avant la 9-GN comme agent anticancéreux. Seulement, bien que son activité antibactérienne soit incontestable, cette même protéine reste encore peu utilisée en tant qu'agent antimicrobien. Ceci s'attribue à la nécessité d'une action synergique avec la perforine et les granzymes pour une activité *in vivo*. Dans ce domaine, nombre de travaux relatent l'efficacité de courts peptides dérivant de sa séquence et ouvrent de nouvelles opportunités thérapeutiques pour la granulysine.

²⁰⁸ Mincheva-Nilsson, L.; Nagaeva, O.; Sundqvist, K. G.; Hammarstrom, M. L.; Hammarstrom, S.; Baranov, V. *Int Immunol.* **2000**, *12*, 585–596.

²⁰⁹ Balogh, G. A.; Russo, I. H.; Spittle, C.; Heulings, R.; Russo, J. *Int J Oncol.* **2007**, *31*, 303–312.

²¹⁰ Qiu, C.; Saito, S.; Sakai, M.; Ogawa, K.; Nagata, K.; Williams, M. A. *Clin Biochem.* **2006**, *39*, 1016–1021.

²¹¹ Sakai, M.; Ogawa, K.; Shiozaki, A.; Yoneda, S.; Sasaki, Y.; Nagata, K.; Saito, S. *Clin Exp Immunol.* **2004**, *136*, 114–119.

²¹² Saito, S.; Shiozaki, A.; Nakashima, A.; Sakai, M.; Sasaki, Y. *Mol Aspects Med.* **2007**, *28*, 192–209.

5.1. La 9-GN comme agent anticancéreux

Abstraction faite du rôle de la 9-GN dans la défense de l'hôte contre les tumeurs, cette protéine est un bon candidat pour une utilisation directe en thérapie antitumorale. En effet, des peptides construits à partir des séquences de la 9-GN et de la NK-lysine ont été testés comme agents antitumoraux *in vivo* et ont montré de bons résultats.²¹³ Cependant, et à la différence de la protéine entière, les peptides dérivant de la granulysine ont un effet hémolytique sur les érythrocytes.²¹⁴ Pour cette raison, l'utilisation de la granulysine 9 kDa recombinante en tant que molécule entière est préférable pour les thérapies anti-cancéreuses futures. La 9-GN recombinante est capable, au moins *in vitro*, d'induire la mort de différentes lignées de cellules tumorales humaines telles que la leucémie aiguë lymphocytaire et la lignée du myélome multiple.^{215,216,217,218} De plus, les cellules tumorales primaires provenant des lymphocytes B de patients atteints de leucémie lymphocytaire sont sensibles *ex vivo* à l'induction de la mort cellulaire par la granulysine alors que les cellules sanguines périphériques mononucléaires de donneurs sains ne le sont pas.²¹⁸ L'utilisation de la 9-GN recombinante en tant que traitement antitumoral a été breveté en 2014,²¹⁹ en mettant en avant son efficacité *in vivo* contre l'adénocarcinome mammaire et le myélome multiple xénotransplanté chez des souris immunodéficientes.²²⁰

5.2. Des peptides dérivés de la 9-GN comme agent antimicrobiens

A ce jour, un grand nombre d'études se sont concentrées sur la génération de peptides synthétiques dérivant de la séquence de la 9-GN et disposant principalement d'une activité

²¹³ Ellerby, H. M.; Lee, S.; Ellerby, L. M.; Chen, S.; Kiyota, T.; del Rio, G.; Sugihara, G.; Sun, Y.; Bredesen, D. E.; Arap, W.; Pasqualini, R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35311–35316.

²¹⁴ Li, Q.; Dong, C.; Deng, A.; Katsumata, M.; Nakadai, A.; Kawada, T.; Okada, S.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *Agents Chemother.* **2005**, *49*, 388–397.

²¹⁵ Pena, S. V.; Hanson, D. A.; Carr, B. A.; Goralski, T. J.; Krensky, A. M. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 2680–2688.

²¹⁶ Gamen, S.; Hanson, D. A.; Kaspar, A.; Naval, J.; Krensky, A. M.; Anel, A. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 1758–1764.

²¹⁷ Pardo, J.; Perez-Galan, P.; cGamen, S.; Marzo, I.; Monleón, I.; Kaspar, A. A.; Susín, S. A.; Kroemer, G.; Krensky, A. M.; Naval, J. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 1222–1229.

²¹⁸ Aporta, A.; Catalan, E.; Galan-Malo, P.; Ramírez-Labrada, A.; Pérez M.; Azaceta G.; Palomera L.; Naval, J.; Marzo, I.; Pardo, J.; Anel, *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *87*, 410–423.

²¹⁹ Anel Bernal, L. A.; Aporta Clemente, A.; Pardo Jimeno, J.; Conde Guerri, B.; Martinez-Lostao, L. WO2014122351 (2014).

²²⁰ Al-Wasaby, S.; de Miguel, D.; Aporta, A.; Naval, J.; Conde, B.; Martínez-Lostao, L.; Anel, A. *OncolImmunology* **2015**, *4*, e1036213,

antibactérienne. Ces dérivés de la granulysine offrent l'opportunité d'accéder à des agents antibactériens à large spectre, agissant rapidement, non toxiques pour les cellules humaines, bon marché et faciles à produire.

Andreu et ses collaborateurs ont synthétisé deux peptides, GN-1 et GN2 (Tableau 3), correspondant aux résidus 26-65 et 33-65 de la 9-GN.²²¹ Cette région inclut une partie de l'hélice 2, la boucle 2 et l'intégralité de l'hélice 3. Ces deux peptides sont actifs contre *B. megaterium*, modérément actif contre *E. coli* mais ne montrent aucun signe d'activité envers *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Aucun de ces deux peptides ne provoque non plus la lyse des érythrocytes.

Ernst *et al.* ont rapporté que des peptides synthétiques de la 9-GN correspondant aux régions hélice 1-boucle 1-hélice 2 (GN-3 – GN-5, Tableau 3) retiennent 50 à 80% de l'activité antibactérienne de la molécule mère.²²² En revanche, le peptide correspondant à la région de 20 résidus qui ne présente pas de caractère hélicoïdal (GN-6) ne montre pas ou très peu d'activité antibactérienne. La modification chimique des résidus d'arginine par la butanedione des peptides actifs conduit à une abrogation totale de leur activité antibactérienne alors que la modification des lysines par l'anhydride citraconique n'affecte pas l'activité.

Dans le but d'améliorer leur stabilité, Hamamoto *et al.* ont substitué tout ou partie des aminoacides d'un peptide synthétique correspondant à la séquence de la 9-GN comprise entre les résidus 32 et 42 par des aminoacides D (GN-11, GN-12, GN-13).²²³ Ces peptides lysent les bactéries de manière similaire à leurs homologues L mais sont significativement plus résistants à l'inactivation par la trypsine ou le sérum. Les peptides antimicrobiens dérivant de la 9-GN et contenant des acides aminés D sont donc de bons candidats médicaments.

²²¹ Andreu, D.; Carreño, C.; Linde, C.; Boman, H. G.; Andersson, M. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 845-849.

²²² Ernst W. A.; Thoma-Uszynski, S.; Teitelbaum, R.; Ko, C.; Hanson, D. A.; Clayberger, C.; Krensky, A. M.; Leippe M.; Bloom, B. R.; Ganz, T.; Modlin, R. L. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 7102-7108.

²²³ Hamamoto, K.; Kida, Y.; Zhang, Y.; Shimizu, T.; Kuwano, K. *Microbiol Immunol* **2002**, *46*, 741-749.

Da Silva et ses collaborateurs ont synthétisé une chimiothèque de 9 peptides dérivant de la séquence de la 9-GN.²²⁴ Tous ces peptides se sont révélés capables d'inhiber *in vitro* *V. cholerae* en montrant toutefois une meilleure activité envers le pathogène dans sa phase stationnaire. Deux de ces peptides (GN-14 et GN-15) contrôlent efficacement la croissance de la bactérie *in vivo*. Ces peptides ne lysent pas les érythrocytes et ne montrent qu'une très faible toxicité envers les cellules mononucléées du sang périphérique.

²²⁴ Da Silva, A. P.; Unks, D.; Lyu, S. C.; Ma, J.; Zbozien-Pacamaj, R.; Chen, X.; Krensky, A. M.; Clayberger, C. J *Antimicrob Chemother.* **2008**, *61*, 1103–1109.

Nom	Séquence
9-GN	GRDYRTCLTIVQKLKMMVDKPTQRSVSNAATRVCRTGRSRWRDVCNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLR
GN-1	VSNAATRVCRTGRSRWRDVCNFMRRYQSRVTQGLVAGET
GN-2	VCRTGRSRWRDVCNFMRRYQSRVTQGLVAGET
GN-3	GRDYRTSLTIVQKLKMMVDKPTQRSVSNAATRVS
GN-4	TGRSRWRDVS RNFMRRYQSRVIQGLVAGETAQQIS
GN-5	TRVSRTGRSRWRDVS RNFM
GN-6	VAGETAQQISEDLR
GN-7	QRSVSNAATRVCRTGRSRWRDVCNFMRR
GN-8	GRSRWRDVCNFMRR
GN-9	QRSVSNAATRVSRTGRSRWRDVS RNFMRR
GN-10	GRSQWQDVCNFMRR
GN-11	RVCRTGRSRWR
GN-12	RvcRtGrsRwR
GN-13	rvcrtgrsrwr
GN-14	RRVSRPMMRRYRSRPRLV
GN-15	GSRRWRRVSRFMRR
GN-16	RRVSRFMRRYRSRIRRLV
GN-17	RRVSRFMRRYRSRPRLV
GN-18	RRVSRPMMRRYRSRPRLV
GN-19	RRVSRPPRRYRSSRRLV
GN-20	TRVCRTGRSRWRDVCNFMRR
GN-21	TRVCRTGRSRVRDVCNFMRR
GN-22	trvcrtgrsrvr dvcnfmr
GN-23	SVSNAATRVCRTGRSRWRDVCNFMRR
GN-24	SVSNAATRVARTRGRSRWRDVARNFMR
GN-25	SRWRDVARNFMRRYQSRVIQGLVA

Tableau 3. Peptides synthétiques dérivants de la séquence de la 9-GN. Les résidus en rouge sont impliqués dans une hélice α . Les résidus en gras correspondent à une mutation. Les résidus en minuscule correspondent à une mutation en acide aminé D.

Dans leur étude, Chen *et al.* ont conduit de multiples analyses biophysiques de l'interaction entre des peptides cationiques dérivés de la 9-GN (GN-16 - 19) et des bactéries ainsi que des lipopolysaccharides isolés.²²⁵ Ils ont ainsi posé les bases mécanistiques de l'aptitude des peptides dérivant de la 9-GN à lyser des bactéries et à neutraliser les LPS. L'activité antimicrobienne et la capacité à neutraliser les LPS sont des caractéristiques souhaitables des

²²⁵ Chen, X.; Howe, J.; Andrä, J.; Rössle, M.; Richter, W.; da Silva, A. P.; Krensky, A. M.; Clayberger, C.; Brandenburg, K. *Biochim Biophys Acta*. **2007**, *1768*, 2421–2431.

agents antiseptiques. Les auteurs ont démontré un changement caractéristique de la structure agrégée des LPS en empilement multilamellaire en présence de ces peptides mais peu ou pas de changement dans la fluidité de la chaîne grasse. La neutralisation des LPS par ces peptides procède *via* leur incorporation dans la membrane de leur cible.

La 9-GN et des peptides synthétiques dérivés possédant un motif hélice boucle-hélice sont capables de tuer *in vitro* *Propionibacterium acnes*.²²⁶ La modification du peptide GN-20 par substitution du résidu tryptophane 44 par une valine (GN-21) permet d'augmenter son interaction avec les surfaces bactériennes et accroît son activité antibactérienne. De plus, lorsqu'il est synthétisé avec des aminoacides D (GN-22), ce peptide devient moins susceptible à la dégradation par les protéases et plus efficace pour causer la lyse de *P. acnes*. Ce même peptide D s'est révélé capable de tuer *P. acnes* présent dans des micro-comédons humains isolés. De manière intéressante, les trois peptides GN-20, -21 et -22 disposent d'un potentiel effet antiinflammatoire dans la mesure où la lyse de *P. acnes* s'accompagne d'une libération de cytokines. Toutes ces données suggèrent que des peptides dérivés de la 9-GN pourraient être d'utiles agents thérapeutiques topiques apportant une alternative solide aux traitements actuels de l'acné.

Les travaux de Wang *et al.* présentés ci-avant font mention de l'activité lytique accrue d'une forme mutante de la 9-GN pour laquelle les quatre résidus cystéines ont été remplacés par des sérines.¹⁵⁷ Les auteurs ont également montré que des formes acycliques de peptides dérivés de la 9-GN conservent leur activité antibactérienne et perdent leur capacité à lyser des cellules humaines. Cependant, en 2010, Siano et ses collaborateurs produisent trois peptides couvrant les régions 25-50 (GN-23, GN-24) et 39-62 (GN-25) de la 9-GN et évaluent *in vitro* leur activité contre *M. tuberculosis*.²²⁷ Le plus actif des peptides correspond à la forme oxydée de GN-23 avec une concentration minimale inhibitrice de 10,1 μ M. De plus, à des concentrations supérieures à 50 μ M, l'activité hémolytiques de GN-23 oxydé, GN-23 réduit et de GN-24 ne dépasse pas 30%.

²²⁶ McInturff, J. E.; Wang, S. J.; Machleidt, T.; Lin, T. R.; Oren, A.; Hertz, C. J.; Krutzik, S. R.; Hart, S.; Zeh, K.; Anderson, D. H.; Gallo, R. L.; Modlin, R. L.; Kim, J. *J Invest Dermatol* **2005**, *125*, 256-263.

²²⁷ Siano, A.; Tonarelli, G.; Imaz, M. S.; Perín, J. C.; Ruggeri, N.; López, M.; Santi, M. N.; Zerbini, E. *Protein Pept. Lett.* **2010**, *17*, 517-521.

5.3. Limites

À la lumière des travaux présentés dans le paragraphe précédent, nous remarquons que seule la capacité de la 9-GN à provoquer la mort cellulaire est exploitée pour des applications thérapeutiques ; et ce, qu'il s'agisse de cellules tumorales ou d'agents infectieux. Cependant, grâce à son aptitude à induire la production de cytokines, la granulysine 9 kDa a démontré son caractère immunostimulateur. Pourtant, à ce jour, aucun travail n'exploite cette propriété alors que l'accroissement de la réponse immunitaire grâce à des anticorps monoclonaux est une stratégie nouvelle et prometteuse en thérapie anticancéreuse. De plus, il est clairement établi que l'élimination de cellules cancéreuses requiert un ensemble orchestré d'événements induits par des leucocytes dont les lymphocytes T CD8+, les cellules dendritiques ou les lymphocytes NK et dont les activités semblent liées à la granulysine.²²⁸

Aucune stratégie thérapeutique n'exploite non plus son activité chimiotactique. Les chemoattractants agissent comme médiateurs immédiats de la réponse immunitaire en régulant le recrutement des leucocytes, leur infiltration, leurs déplacements ainsi que leur développement et leur fonction.²²⁹ Bien que l'inflammation joue un rôle essentiel dans la défense de l'hôte, une réaction inflammatoire incontrôlée est responsable de l'initiation et de la progression de nombreuses maladies comme l'athérosclérose, l'ischémie reperfusion, la myocardite virale, la polyarthrite rhumatoïde, les réactions allergiques, le psoriasis et d'autres inflammations des muqueuses et même de la tumorigenèse ou du développement de métastases.²³⁰ Cependant, le manque de spécificité des agents thérapeutiques entrave l'efficacité du traitement de ces maladies inflammatoires. Par conséquent, une meilleure compréhension de la régulation de la chimiotaxie des leucocytes pourrait faire émerger de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouvelles stratégies pour traiter ces maladies.

Une seule étude présente néanmoins la granulysine sous l'angle de l'immunothérapie mais elle implique la 15-GN.¹⁶⁶ Elle la compare au GM-CSF classiquement utilisé pour aider à rétablir le taux de globules blancs après une chimiothérapie ou une transplantation de moelle

²²⁸ Melero, I.; Hervas-Stubbs, S.; Glennie, M.; Pardoll, D. M.; Chen, L. *Nature Reviews Cancer* **2007**, *7*, 95–106.

²²⁹ Baggiolini, M. *Nature* 1998, **392**, 565–568.

²³⁰ Dianqing, W. U. *Cell Research* **2015**, *15*, 52–56.

osseuse. De nombreux développements ont également eu lieu pour son utilisation dans le traitement de cancers.²³¹ Les auteurs concluent que bien que ces protéines induisent l'expression d'un grand nombre de gènes communs, la 15-GN et le GM-CSF induisent deux réponses différentes chez les monocytes. En constatant une meilleure induction des fonctions immunitaires par la 15-GN, l'étude suggère que cette protéine pourrait s'avérer être un immunomodulateur thérapeutique très utile.

La granulysine était initialement considérée comme un peptide antimicrobien à l'activité cytotoxique dirigée contre des pathogènes, des cellules infectées ou tumorales. Il est aujourd'hui clairement établi que son rôle dans la réponse immunitaire est bien plus important qu'il ne l'était pensé à l'origine. Tandis que l'isoforme de 9 kDa montre de vastes propriétés antimicrobiennes et la capacité d'induire la mort de cellules tumorales, l'isoforme de 15 kDa est quant à elle impliquée dans des processus de recrutement et la maturation de différentes populations de cellules immunitaires au site d'une infection ou au voisinage d'une tumeur. Malgré ce rôle clé dans la réponse immunitaire et son fort potentiel thérapeutique, la 15-GN reste très peu étudiée par rapport à son isoforme plus courte. Par exemple, la structure tridimensionnelle de la 9-GN a été résolue par diffraction des rayons X en 2003 alors qu'à ce jour très peu de données sont disponibles sur la structure tridimensionnelle et l'arrangement des ponts disulfure de la 15-GN. Son activité antimicrobienne fait encore aujourd'hui débat dans la littérature laissant également supposer que l'éventail des activités de la 15-GN est encore sous-estimé. Enfin, la caractérisation de ses activités d'alarmine ne s'accompagne que très rarement de travaux permettant d'élucider sur son mode d'action. Seule l'étude de la maturation des cellules dendritique par la 15-GN a permis d'identifier le récepteur TLR4 comme médiateur de son action.

Il est aujourd'hui essentiel d'élargir nos connaissances sur la manière dont fonctionne le système immunitaire afin de permettre le développement de stratégies thérapeutiques créatives et ainsi répondre aux besoins médicaux insatisfaits. Seulement, espérer comprendre la réponse immunitaire passe nécessairement par une étude approfondie de tous les

²³¹ Arellano, M.; Lonial, S. *Biologics*. **2008**, *2*, 13–27.

mécanismes qui la constituent. L'expression de la 15-GN par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK est un de ces mécanismes dont l'étude pourrait ouvrir l'accès à de nouvelles connaissances et poser les bases de nouvelles approches thérapeutiques pour lutter contre le cancer ou les maladies infectieuses.

Chapitre 3. Développement d'un procédé de synthèse totale de la granulysine 15 kDa

1. Intérêt du développement d'un procédé de synthèse chimique de la 15-GN

Le Chapitre 2 a clairement montré l'intérêt d'une meilleure caractérisation des propriétés structurales et biologiques de la 15-GN. Seulement, son étude est sérieusement entravée par de grandes difficultés à produire cette protéine dans les systèmes biologiques traditionnels. Plusieurs essais d'expression conduits dans *E. coli* à l'aide du vecteur pET-28a, un vecteur bactérien permettant l'expression d'une protéine marquée par 6 histidines et un site thrombine, ont conduit à de très faibles rendements dus à une dégradation de la protéine.¹⁶⁹ Les mêmes auteurs ont également essayé un vecteur d'expression dans *E. coli* contenant un tag GST mais encore une fois, l'instabilité de la protéine et la dégradation du tag GST ont conduit à un faible rendement. Des essais d'expression de la 15-GN dans la levure *Kluyveromyces lactis* se sont également révélés infructueux et ont conduit les auteurs à envisager l'expression de la protéine dans des cellules d'insectes. Le traitement d'un litre de surnageant de ces cellules ne permet cependant d'obtenir que 0,6 mg de 15-GN purifiée. Chung *et al.* ont également tenté d'exprimer la 15-GN dans le système Expressway Cell-Free *E. coli* mais celui-ci s'est révélé inapproprié.¹⁶⁸

En plus des difficultés mentionnées ci-dessus pour l'accès à des quantités substantielles de 15-GN par les méthodes recombinantes, d'autres facteurs pourraient compliquer d'avantage l'accès à cette protéine. En effet, une étude de modélisation *in silico* suggère la présence de plusieurs régions peu structurées distribuées tout au long de sa séquence.²³² La présence de

²³² Yacoub, H. A.; Al-Maghrabi, O. A.; Ahmed, E. S.; Uversky, V. N. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, 35, 836.

telles régions laisse penser que la conformation de la 15-GN est dynamique. De plus, la 15-GN dispose de sept résidus cystéines. Quatre d'entre eux sont très probablement engagés dans deux ponts disulfure au sein d'un domaine saposin-like par analogie avec la 9-GN (Cys69-Cys132, Cys96-Cys107, Figure 8).¹⁴⁶ Aucune information n'est cependant disponible quant à l'état d'oxydation des trois autres cystéines (Cys43, Cys45, Cys138). Compte tenu de la présence de régions peu structurées et du nombre impair de cystéines, le repliement de la 15-GN est très probablement complexe et n'a d'ailleurs jamais été décrit. Ceci vient s'ajouter aux difficultés déjà mises en évidence de production de la 15-GN dans des systèmes recombinants. En effet, certains protocoles d'extraction de la 9-GN requièrent une étape de réduction puis de re-repliement de la protéine. La transposition d'un tel protocole à la production de la 15-GN est donc inenvisageable tant que son repliement ne sera pas maîtrisé et complètement caractérisé.

La 15-GN est également disponible commercialement mais ces protéines sont lourdement modifiées par des tags N ou C-terminaux dont l'action délétère sur l'activité de la protéine a été démontré.^{169,233} Afin d'estimer la qualité réelle des échantillons de 15-GN disponibles commercialement nous avons entrepris une étude de la protéine commercialisée par R&D Systems. Après solubilisation selon les recommandations du fournisseur, un dosage spectrophotométrique à 280 nm permet d'estimer une quantité totale de protéine contenue dans l'échantillon à 15 µg alors qu'elle est affichée à 25 µg. L'analyse de l'échantillon par MALDI-TOF fournit deux masses moléculaires moyennes à 14202 u et 15600 u alors que la masse attendue est de 15465 Da (Figure 13). L'analyse UPLC-MS de l'échantillon montre un pic unique mais large pouvant être justifié par la présence de plusieurs formes repliées. La déconvolution du spectre de masse révèle trois masses : 14245 u, 15611 u et 15689 u alors que la masse théorique de la 15-GN portant un tag 10-His est de 15465 u (Figure 14). La pluralité des masses obtenues peut être expliquée par la présence d'adduits β-mercaptoethanol liés par des ponts disulfure aux cystéines de la séquence. Une deuxième analyse UPLC-MS de l'échantillon a donc été conduite après une étape de réduction par la TCEP (Figure 15). La déconvolution du spectre de masse fournit des masses à 14107 u et 15471 u. La seconde correspond bien à la masse théorique de la protéine réduite, présentant

²³³ Hanson, D. A.; Ziegler, S. F. *J Negat Results Biomed.* **2004**, 3, 2.

toutefois une mutation connue de la Thr119 en Ile,²³⁴ mais la première ne peut s'expliquer que par la présence d'une protéine tronquée dans l'échantillon. En effet, la masse trouvée à 14107 u pourrait correspondre à celle d'une protéine mutée en position 97 et clivée entre les résidus Arg33 et Ala34.

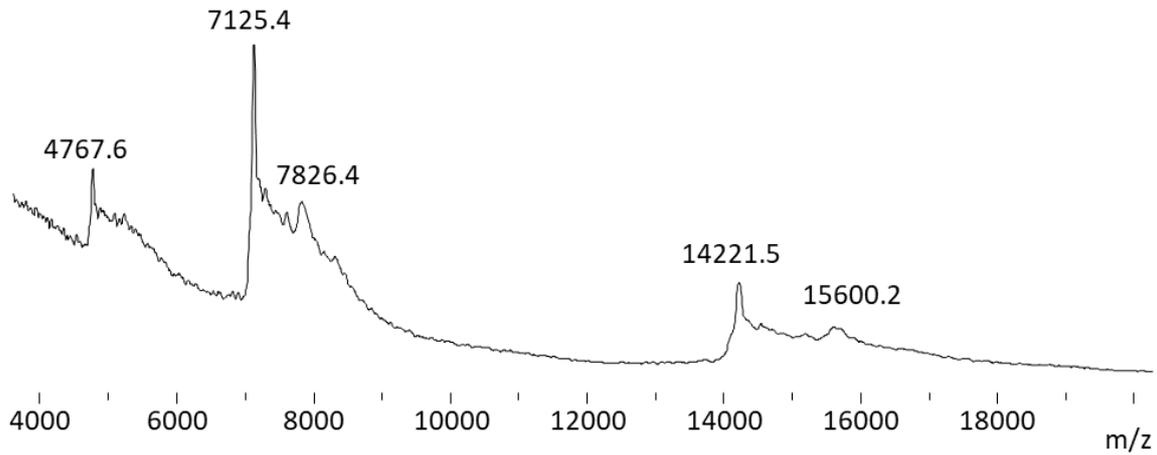


Figure 13. Analyse MALDI-TOF de la 15-GN recombinante, Matrice acide 2,5-dihydrobenzoïque, mode de détection positif, calculé pour $[M+H]^+$ (moyenne) 15466, trouvé 14221,5 et 15600,2.

²³⁴ Houchins, J. P.; Kricek, F.; Chujor, C. S.; Heise, C. P.; Yabe, T.; McSherry, C.; Bach F. H. *Immunogenetics* **1993**, 37, 102-107.

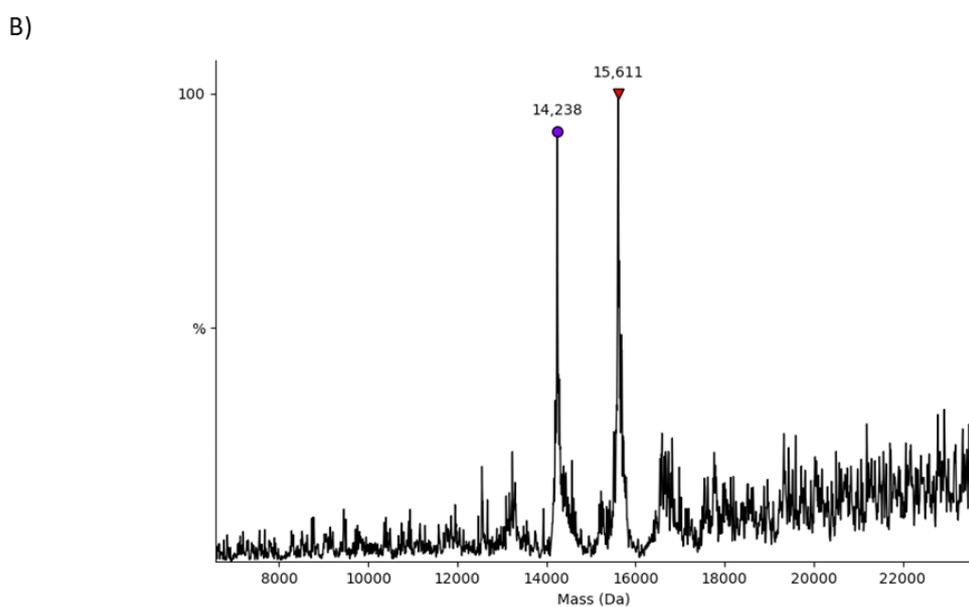
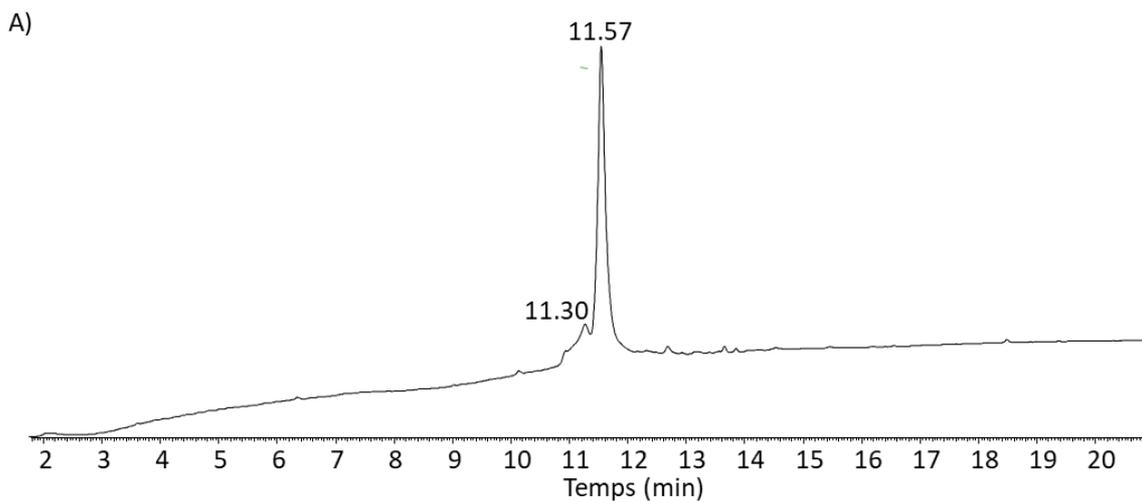


Figure 14. Analyse UPLC-MS de la 15-GN recombinante. A) Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. B) Spectre de masse déconvolué, calculé pour [M] (moyenne) 15465, trouvé 14238 et 15611.

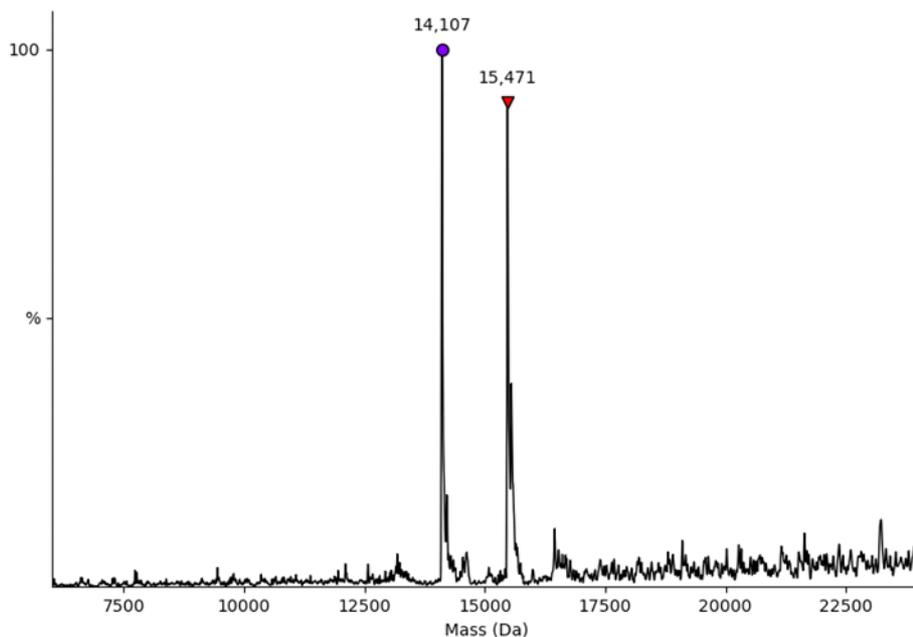


Figure 15. Analyse UPLC-MS de la 15-GN recombinante après réduction à la TCEP. Trace LC : éluant A 0,10% FA dans H₂O, éluant B 0,10% FA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm, non présentée. Spectre de masse déconvolué, calculé pour [M] (moyenne) 15465, trouvé 14107 et 15471.

Enfin, la digestion pepsique de l'échantillon fournit tout d'abord trois peptides permettant d'attester la présence de ponts disulfure reliant les Cys69 et Cys132 ainsi que les Cys96 et Cys107 (Figure 16). Il s'agit des deux ponts disulfure stabilisant le domaine saposin-like. En plus d'un peptide confirmant l'existence d'un pont disulfure entre les Cys96 et 107, la digestion trypsique nous renseigne également sur l'état d'oxydation des Cys43 et 45. Deux peptides de masse 1757.9 et 1759.8 ont été trouvés et correspondent au peptide Ser42-Lys88 disposant respectivement d'un disulfure cyclique entre les Cys43 et 45 ou de cystéines 43 et 45 réduites (Figure S 2).

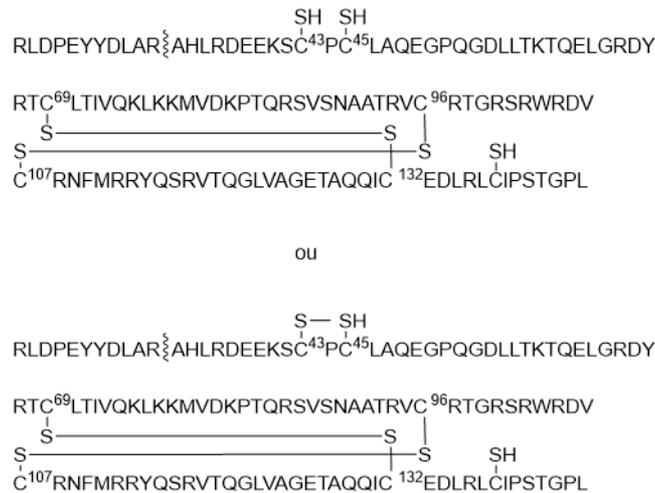


Figure 16. Patron des ponts disulfure de l'échantillon de granulysine commercial déterminé par analyse des peptides de digestion trypsique et pepsique.

La protéine recombinante commercialisée par R&D Systems est donc un mélange complexe dont l'hétérogénéité découle en premier lieu de la présence d'au moins deux protéines de structure primaire différente. À ceci, s'ajoute l'existence de deux formes repliées qui diffèrent par la présence ou l'absence d'un lien disulfure entre les Cys43 et 45. À noter également que l'état d'oxydation de la Cys138 n'a pas pu être déterminé. En considérant toutes ces données et la présence d'un tag poly-Histidine en position C-terminale, engager cette protéine recombinante dans des essais de caractérisation de l'activité biologique de la 15-GN apparaît périlleux.

Une meilleure caractérisation des fonctions immunitaires et de la structure de la 15-GN nécessite l'accès à cette protéine dans des quantités de l'ordre du milligramme et sans contaminant provenant du système d'expression. Compte tenu des difficultés à produire la 15-GN par les méthodes biologiques conventionnelles et à obtenir un échantillon de pureté suffisante dans le commerce, notre attention s'est logiquement portée sur la synthèse chimique de protéines. Celle-ci est particulièrement indiquée dans ce cas puisqu'elle permet de produire des lots de protéine hautement homogènes avec un contrôle total de leur composition. Ce chapitre présente les différents développements qui ont conduit à la mise au point d'un procédé de synthèse chimique robuste de la 15-GN.

2. Synthèse chimique du polypeptide 15-GN linéaire (15-GN-I)

2.1. Découpage de la séquence et choix du sens de synthèse

Le polypeptide linéaire **15-GN-I** se compose de 123 résidus. La présence de sept cystéines dans sa séquence rend possible sa synthèse chimique via l'utilisation de la ligation chimique native (NCL) qui consiste, pour rappel, en la réaction chimiosélective en milieu aqueux d'un peptide porteur d'une fonction thioester à son extrémité C-terminale et d'un cystéinyle peptide N-terminal. Des segments peptidiques complètement déprotégés sont engagés dans cette réaction qui conduit à la formation d'un lien peptidique natif à la cystéine. La taille des segments peptidiques accessibles par synthèse sur support solide est limitée à environ 50 acides aminés. Nous avons donc premièrement cherché à assembler le polypeptide **15-GN-I** par ligation de trois segments peptidiques d'environ 40 résidus (segment A : 23-68, segment B : 69-106, segment C : 107-145). L'emploi de la NCL impose la production des segments A et B sous forme de thioesters C-terminaux. Ceux-ci sont facilement accessibles *via* la synthèse sur support solide de précurseurs porteurs d'un groupement SEA en position C-terminale. Leur traitement après coupure et en solution par le MPA produit un thioester d'alkyle approprié à la NCL par réaction d'échange thiol/thioester. L'assemblage de cette protéine selon ce plan rétrosynthétique pourrait néanmoins s'avérer difficile puisqu'à l'extrémité C-terminale des segments A et B se trouvent des acides aminés β -branchés (Thr68 et Val106). La présence de tels résidus en position C-terminale se traduit généralement par des cinétiques de réaction très lentes dûes à l'encombrement stérique de la chaîne latérale.²³⁵

Les premières tentatives de production de **15-GN-I** à partir des trois segments peptidiques **A**, **B** et **C** ont été conduites dans la direction N vers C (**A + B** \rightarrow **AB** puis **AB + C** \rightarrow **ABC**). La synthèse dans cette direction s'est révélée extrêmement compliquée à cause de la mauvaise solubilité des intermédiaires dans les milieux réactionnels.²³⁶ Des phénomènes de gélification ont d'ailleurs été observés et l'ensemble du procédé n'a conduit qu'à l'obtention de 0,92 mg de **15-GN-I** avec un rendement global de 1,6%. Un examen des propriétés physico-chimiques des

²³⁵ Hackeng, T. M.; Griffin, J. H.; Dawson, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10068.

²³⁶ Cargoët, M. (2017) Nouvelles méthodologies pour la synthèse de protéines, Thèse de doctorat, Université de Lille.

trois précurseurs peptidiques a révélé que les segments B et C ont des points isoélectriques significativement supérieurs à celui du segment A (A : pI = 5,2, B : pI = 11,4, C : pI = 8,7). Par conséquent, l'assemblage de la 15-GN linéaire a été envisagé dans le sens inverse, dans la direction C vers N. Il permet d'exploiter l'effet bénéfique de la présence de charges positives sur les segments B et C au pH des réactions de ligation sur la solubilité des intermédiaires.

C'est également à ce stade de notre réflexion que nous avons décidé d'introduire un quatrième découpage. Au-delà de la seule production de la 15-GN native, ce procédé synthétique doit permettre ultérieurement la synthèse d'analogues de la protéine par introduction de modifications et de mutations. Ainsi et afin d'amener un degré supplémentaire de modularité, la synthèse du segment A a été repensée à partir de deux segments peptidiques plus courts et toujours obtenus par SPPS (segment A1 : 23-42 et segment A2 : 43-68). Il s'agit là de faciliter l'introduction de modifications dans ce segment tout en évitant de le resynthétiser intégralement. Il en résulte donc un schéma d'assemblage convergent qui permet l'accès à la 15-GN linéaire à partir de quatre segments peptidiques et nécessitant quatre étapes de NCL.

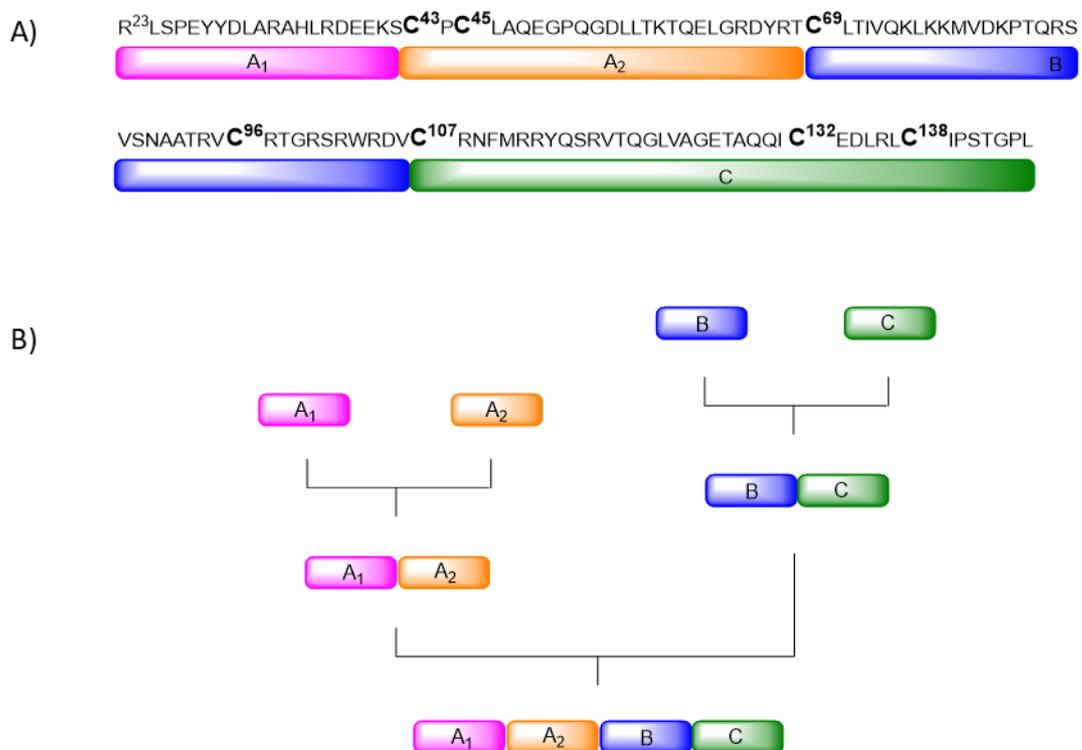


Figure 17. A) Découpage de la séquence de la 15-GN. B) Assemblage convergent de la 15-GN à partir de 4 segments peptidiques

2.2. Optimisation de la synthèse sur support solide du segment B.

Dans la phase de production des segments peptidiques nécessaires à l'assemblage de la 15-GN, des difficultés sont apparues dans la préparation du segment central **B** par Fmoc-SPPS. La présence de nombreux sous-produits acétylés témoignait de l'occurrence de couplages largement incomplets après la Thr93. Une première tentative pour remédier à ce problème a été apportée par l'introduction dans la chaîne en croissance de deux unités O-acyl isodipeptidiques en remplacement des dyades Ala92-Thr93 et Val98-Ser99. A l'origine liés par un lien ester impliquant la fonction hydroxyle des chaînes latérales de Ser et Thr, ces systèmes peuvent se réarranger en milieu acide, formant un lien peptidique natif par transfert d'acyle intramoléculaire de O vers N. Introduits lors de l'élongation sur support solide, ils défavorisent l'agrégation des chaînes en croissance et de manière générale améliorent significativement les rendements.²³⁷ L'utilisation de ces deux unités isopeptidiques ne s'est malheureusement pas révélée aussi avantageuse qu'espérée, le rendement obtenu après coupure et purification n'était que de 3,2%. Par ailleurs leur introduction dans la chaîne en croissance est fastidieuse. Le couplage des deux acides aminés suivants doit nécessairement être réalisé rapidement et à la main pour éviter une réaction secondaire de formation de dicétopipérazine (Figure 18).

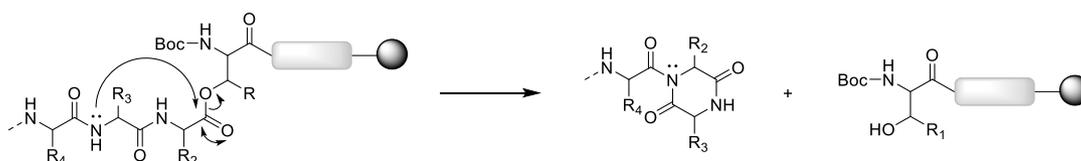


Figure 18. Réaction secondaire de formation de dicétopipérazine lors de la croissance sur support solide d'un peptide contenant une unité O-acyl isopeptidique.

Une seconde approche a donc été testée pour l'optimisation de la synthèse du segment **B**. Il s'agissait de l'incorporation en lieu et place de la dyade Ala92-Thr93 d'un dipeptide pseudoproline. Dans une pseudoproline, le résidu Ser ou Thr est protégé de façon réversible pour former une oxazolidine mimant structurellement la proline et labile en présence d'acide trifluoroacétique (TFA). L'insertion d'un dipeptide pseudoproline dans une séquence empêche la formation de structures secondaires au cours de l'assemblage du peptide par l'introduction

²³⁷ Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Chem. Commun.* **2004**, 124–125.

artificielle d'un coude. Il en résulte de meilleures cinétiques d'acylation et de déprotection.²³⁸ En combinaison avec l'utilisation d'une pseudoproline, le passage d'une résine polystyrène (PS) à une résine ChemMatrix® à base de polyéthylène glycol a été décidé. Celle-ci est particulièrement indiquée pour la préparation de peptides hydrophobes, hautement structurés ou présentant de nombreux résidus basiques comme le segment **B** de la 15-GN.²³⁹ L'introduction de ces deux modifications a permis d'augmenter significativement l'efficacité de la synthèse du segment **B**. En partant d'une résine ChemMatrix® trityl-OH commerciale facilement fonctionnalisable (Figure 19) et en introduisant une pseudoproline en position 92-93, le rendement de synthèse du segment B atteint 17% après coupure et purification.

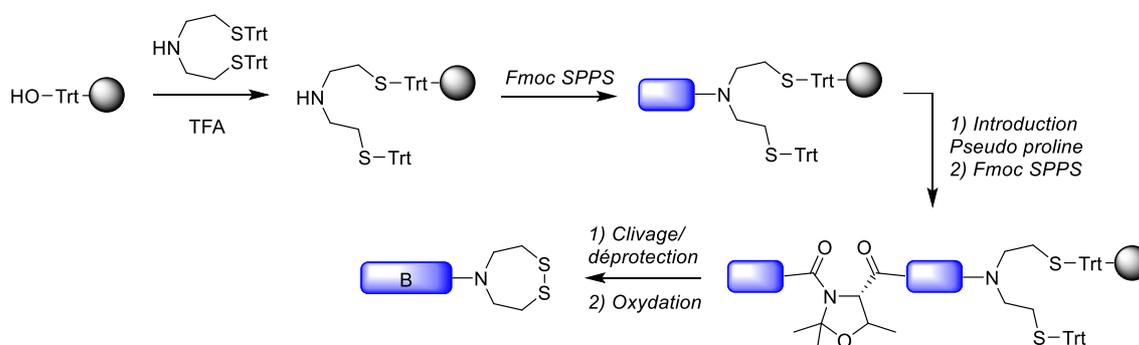


Figure 19. Stratégie de synthèse du segment B de la 15-GN sur résine ChemMatrix® avec insertion d'une pseudoproline²⁴⁰

2.3. Description du procédé de synthèse de la 15-GN-I

Le procédé de synthèse de la 15-GN linéaire débute par la modification des extrémités N et C-terminales du segment **B**. En effet, ce dernier est bifonctionnel du point de vue de la NCL. Il est à la fois porteur d'une cystéine en position N-terminale et d'un thioester en position C-terminale. Telle qu'elle est conçue, la synthèse convergente de la 15-GN impose donc une première étape de protection de la cystéine N-terminale pour empêcher les réactions secondaires de cyclisation ou d'oligomérisation lors des étapes suivantes. La protection de cette cystéine est réalisée au moyen d'une réaction de NCL avec

²³⁸ Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Wöhr, T. *Pept Res.* **1995**, *8*, 145-153.

²³⁹ García-Martín, F.; Quintanar-Audelo, M.; García-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C.; Furic, R.; Côté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 213-220.

²⁴⁰ Boll, E.; Drobecq, H.; Ollivier, N.; Raibaut, L.; Desmet, R.; Vicogne, J.; Melnyk, O. *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 2017-2022.

l'acétoacétylmethylthioglycolate (**AcA-MTG**) permettant une acylation réversible de l'atome d'azote (Figure 20).^{241,242} Cette réaction étant menée en conditions faiblement réductrices, le groupement SEA C-terminal reste dans sa configuration cyclique inactive SEA^{off}. La fonction SEA est ensuite transformée en thioester d'alkyle *via* un échange SEA/thioester. La réaction est conduite dans le même réacteur afin d'économiser une étape de purification intermédiaire en ajoutant au milieu précédent la TCEP, le MPA et en abaissant le pH à 4,0. Cette étape est cependant particulièrement difficile puisque la fonctionnalité SEA est ici portée par une valine, un acide aminé stériquement encombré. Elle nécessite l'utilisation du catalyseur alkyle disélényre **6** dont le développement et la preuve de son utilité pour l'échange SEA/thioester sont rapportés au chapitre 6. Cette première séquence réactionnelle permet d'obtenir le peptide **AcA-B-MPA** avec un rendement satisfaisant de 34%.

²⁴¹ Ollivier, N.; Desmet, R.; Drobecq, H.; Blanpain, A.; Boll, E.; Leclercq, B.; Mougel, A.; Vicogne, J.; Melnyk, O. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5362–5370.

²⁴² Bouchenna, J.; Sénéchal, M.; Drobecq, H.; Vicogne, J.; Melnyk, O. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2967–2973.

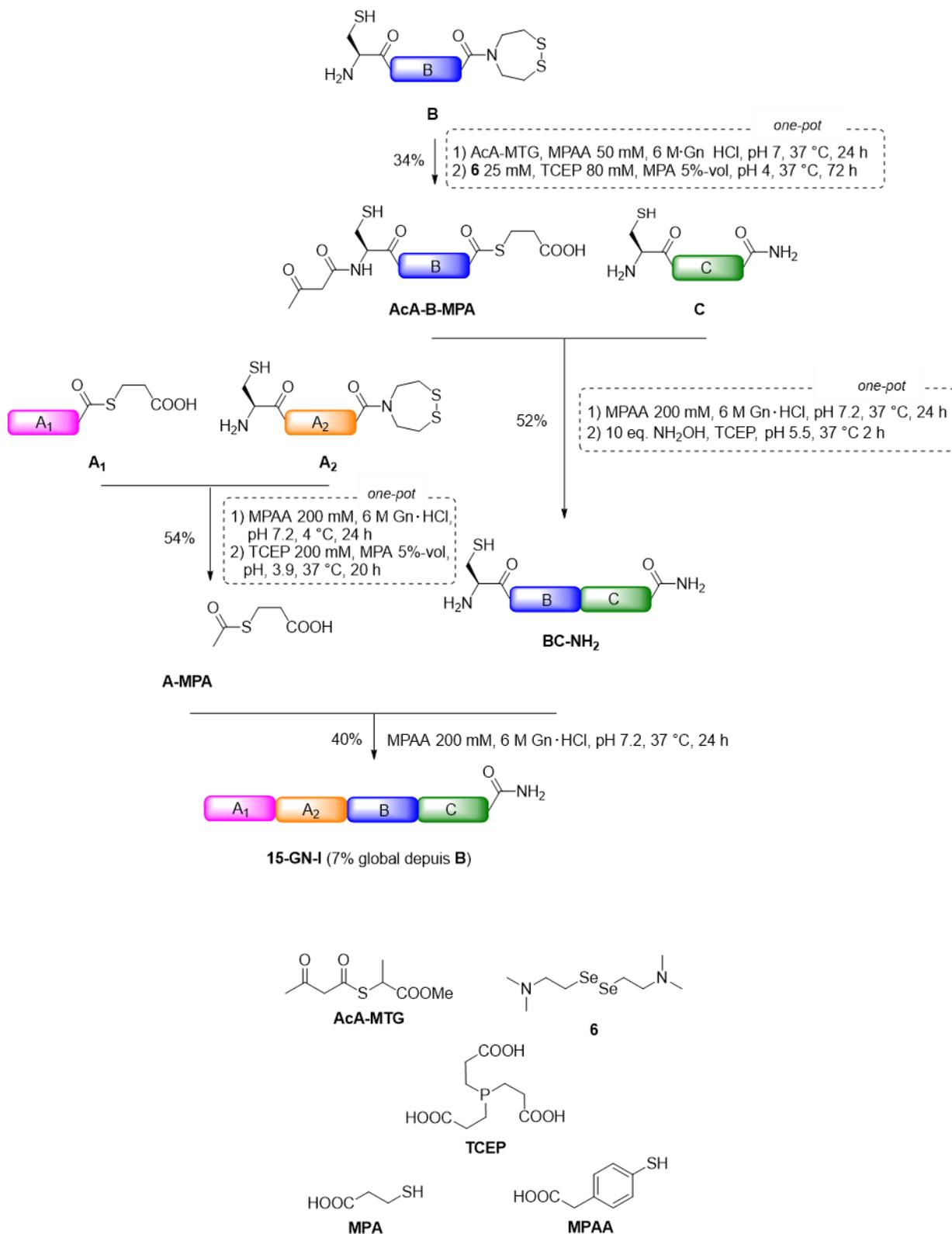


Figure 20. Procédé chimique de synthèse de la 15-GN linéaire

AcA-B-MPA est ensuite engagé dans une réaction de NCL avec un léger excès du cystéinyle peptide **C** à pH 7,2 en présence de MPAA pour conduire à l'intermédiaire **BC** toujours protégé

en position N-terminale. Le groupement AcA est retiré sans purification intermédiaire ou isolement par addition dans le milieu de ligation d'hydroxylamine à pH acide. La réaction d'oximation suivie d'une cyclisation spontanée libère l'amine N-terminale ainsi qu'un équivalent de 3-méthylisoxazol-5(4H)-one (Figure 21). Le peptide **BC-NH₂** est isolé avec un rendement de 52% après une étape de purification par HPLC préparative avec des éluants contenant 0,25% de TFA. Les peptides **BC** et **C** ont en effet des temps de rétention très proches dans les conditions classiques d'éluion avec des phases mobiles contenant 0,1% de TFA, compliquant ainsi leur isolement. **BC** disposant d'un plus grand nombre de résidus basiques que **C**, leur séparation est facilitée par l'augmentation à 0.25% du pourcentage de TFA dans les solvants HPLC.

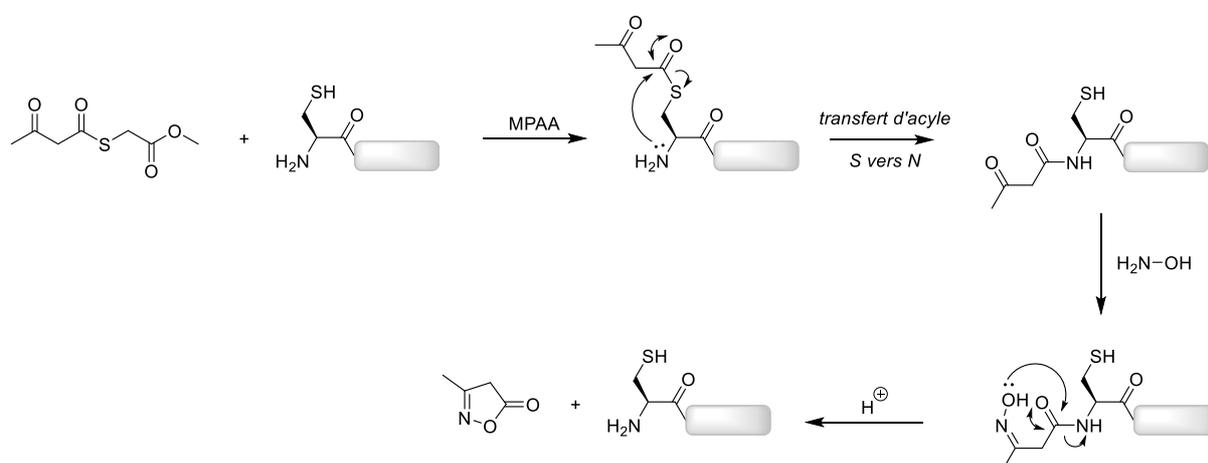


Figure 21. Protection – déprotection d'une cystéine par un groupement AcA. Le groupe protecteur est introduit par une réaction de NCL et retiré par action de l'hydroxylamine

Parallèlement, le peptide **A₁-SEA** est traité par le MPA à pH 4,0 pour conduire au peptide thioester **A₁-MPA**. Il est purifié puis engagé dans une NCL avec le cystéinyle peptide **A₂-SEA**. La réaction est menée dans les conditions classiques de la ligation chimique native à l'exception de la température du milieu réactionnel. Celle-ci est abaissée à 4 °C puisqu'une sérine porte le groupement SEA C-terminal du peptide **A₁**. Ce résidu est particulièrement sujet à l'épimérisation au cours des ligations et de récents travaux conduits au laboratoire ont montré que cette réaction secondaire pouvait être minimisée en travaillant à 4 °C.²⁴³

²⁴³ Snella, B.; Diemer, V.; Drobecq, H.; Agouridas, V.; Melnyk, O. *Org. Lett.* **2018** *20*, 7616-7619.

L'intermédiaire **A-SEA** n'est pas isolé mais transtioestérifié en one-pot par traitement au MPA à pH 4,0 puis purifié pour conduire au peptide **A-MPA** avec un rendement 54%.

Le polypeptide **15-GN-I** est finalement obtenue par NCL entre les peptides **A-MPA** et **BC** puis purifiée par HPLC. L'ensemble du procédé a permis d'obtenir 3,08 mg de 15-GN linéaire avec un rendement global de 7% (Figure 22).

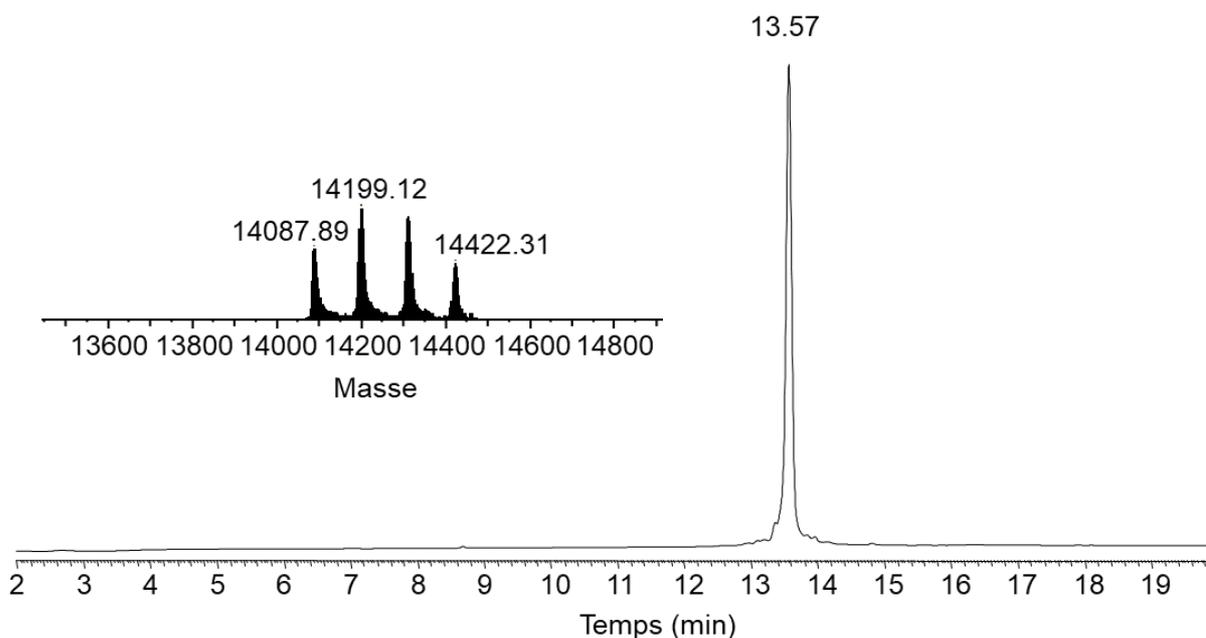


Figure 22. Analyse UPLC-MS du polypeptide **15-GN-I**. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Spectre de masse déconvolué, m/z calculé pour [M] (moyenne) 14088.22, trouvé 14087.29 (14199.12 [M+M_{TFA}], 14311.51 [M+2M_{TFA}], 14422.31 [M+3M_{TFA}]).

3. Repliement de la 15-GN linéaire

L'obtention de la 15-GN linéaire en quantité substantielle a permis d'envisager son repliement *in vitro*. Dans un premier essai de repliement, **15-GN-I** est dissout à 60 μM dans un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10%-vol de glycérol et un mélange de glutathion (GSH, 1 mM)/glutathion oxydé (GSSG, 0,2 mM) (Figure 23). Malgré la difficile solubilisation de la protéine linéaire le mélange est tout de même maintenu pendant 46 h à 20 °C, puis la protéine a été dialysée une nuit contre un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10%-vol de glycérol.

L'analyse UPLC de la protéine repliée **15-GN-f** et dialysée montre plusieurs pics avec une forme dominante (**15-GN-f2**, Figure 23 B).

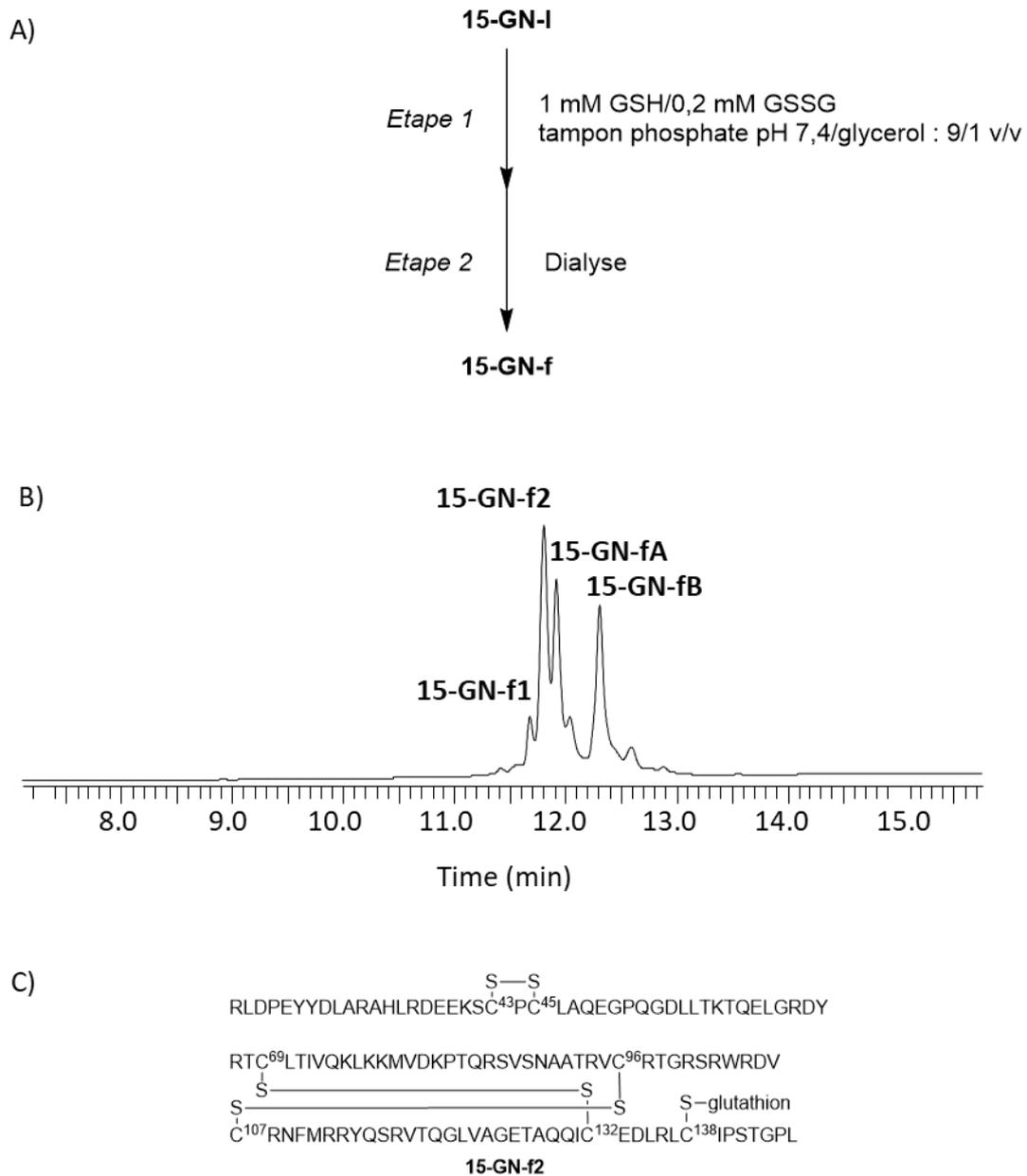


Figure 23. Premier repliement du polypeptide **15-GN-I**. A) **15-GN-I** est replié en présence du système redox glutathion (GSH)/glutathion disulfure (GSSG) puis dialysé contre un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10%-vol de glycérol B) Analyse HPLC du mélange **15-GN-f**. C) Patron des ponts disulfure de la forme **15-GN-f2**.

Une analyse minutieuse des peptides produits par digestion trypsique et pepsique de la forme majoritaire a permis de déterminer son patron de pont disulfure. La protéine **15-GN-f2**

dispose de deux ponts disulfure liant la Cys69 à la Cys132 et la Cys96 à la Cys 107. Ces ponts sont présents dans le domaine saposin-like de la 9-GN recombinante.¹³⁴ Un autre pont disulfure a également été détecté entre les cystéines 43 et 45 tandis que la Cys138 forme un disulfure avec une molécule de glutathion. **15-GN-f1** a la même masse totale que la forme majoritaire **15-GN-f2** et par conséquent correspond également à un adduit glutathion. La masse totale des autres formes minoritaires **15-GN-fA** et **15-GN-fB** montre qu'elles ne sont pas liées à des molécules de glutathion. Les patrons des ponts disulfure des formes minoritaires **15-GN-f1**, **-fA** et **-fB** n'ont cependant pas pu être déterminés à ce stade.

Les conséquences de la présence d'un motif Cys-X-Cys (X = Pro) dans la séquence de la 15-GN sur la production de cette protéine par les méthodes recombinantes, sur son repliement et sur son mécanisme d'action n'ont jamais été discutées. Pourtant, la présence d'un tel motif CXC dans une protéine peut compliquer son isolement en favorisant la formation de disulfures mixtes, de dimères ou d'oligomères. En effet, plusieurs études ont montré que l'oxydation des motifs CXC à l'aide du système redox GSH/GSSG peut conduire à l'obtention de mélanges complexes incluant des espèces monomériques cycliques (disulfure cyclique C), des espèces présentant un disulfure mixte avec le glutathion (S1,2), deux disulfures mixtes avec le glutathion (DDM) et des espèces dimériques (CD1,2) (Figure 26 A).^{244,245} Le disulfure cyclique L est tendu et par conséquent réagit significativement plus rapidement avec les thiols que les disulfures non contraints (environ 180 fois plus rapidement pour X = Val).²⁴⁴ Ainsi, il peut avoir un rôle important dans des protéines impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction. La protéine chaperon mitochondriale MIA40 en est un bon exemple.²⁴⁶ Cette petite protéine expose à sa surface un motif Cys-Pro-Cys contenu dans son extrémité N-terminale lui conférant ses fonctions d'oxydoréductase dans les mitochondries.

Notons que la triade Cys-Pro-Cys dans la séquence de la 15-GN est également localisée près de l'extrémité N-terminale. Un modèle structural généré pour la 15-GN à l'aide du logiciel I-TASSER suite prédit que le motif CPC est éloigné de la Cys 138 (Figure 24).²⁴⁷ La prédiction

²⁴⁴ Zhang, R.; Snyder, G. H. *Biochem.* **1988**, *27*, 3785.

²⁴⁵ Wu, C.; Leroux, J. C.; Gauthier, M. A. *Nat Chem* **2012**, *4*, 1044.

²⁴⁶ Banci, L.; Bertini, I.; Cefaro, C.; Ciofi-Baffoni, S.; Gallo, A.; Martinelli, M.; Sideris, D. P.; Katrakili, N.; Tokatlidis, K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 198.

²⁴⁷ Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 7.

d'une longue distance séparant les Cys43 ou Cys 45 et Cys138 est en accord avec les résultats collectés lors de son repliement *in vitro*. À minima pour sa forme repliée majoritaire **15-GN-f1**, la protéine préfère adopter une forme contrainte où les Cys43 et 45 sont liées par un pont disulfure plutôt qu'une conformation plus lâche où l'une des deux cystéines 43 ou 45 seraient engagées dans un disulfure avec la Cys138. De plus, la Cys138 de la 15-GN s'aligne avec la Cys122 de la NK-lysine et cette dernière est engagée dans un lien disulfure avec la Cys50 (Figure 25 A). Le résidu Cys 50 de la NK-lysine n'est cependant pas conservé dans la 15-GN. La position correspondante est occupée par une tyrosine, la Tyr66, qui s'avère très proche de la Cys138 sur le modèle (Figure 25 B). Tout ceci, ajouté au fait que la cystéine 138 se combine à une molécule de glutathion dans la forme majoritaire **15-GN-f2** suggère une certaine flexibilité conformationnelle de l'extrémité C-terminale.

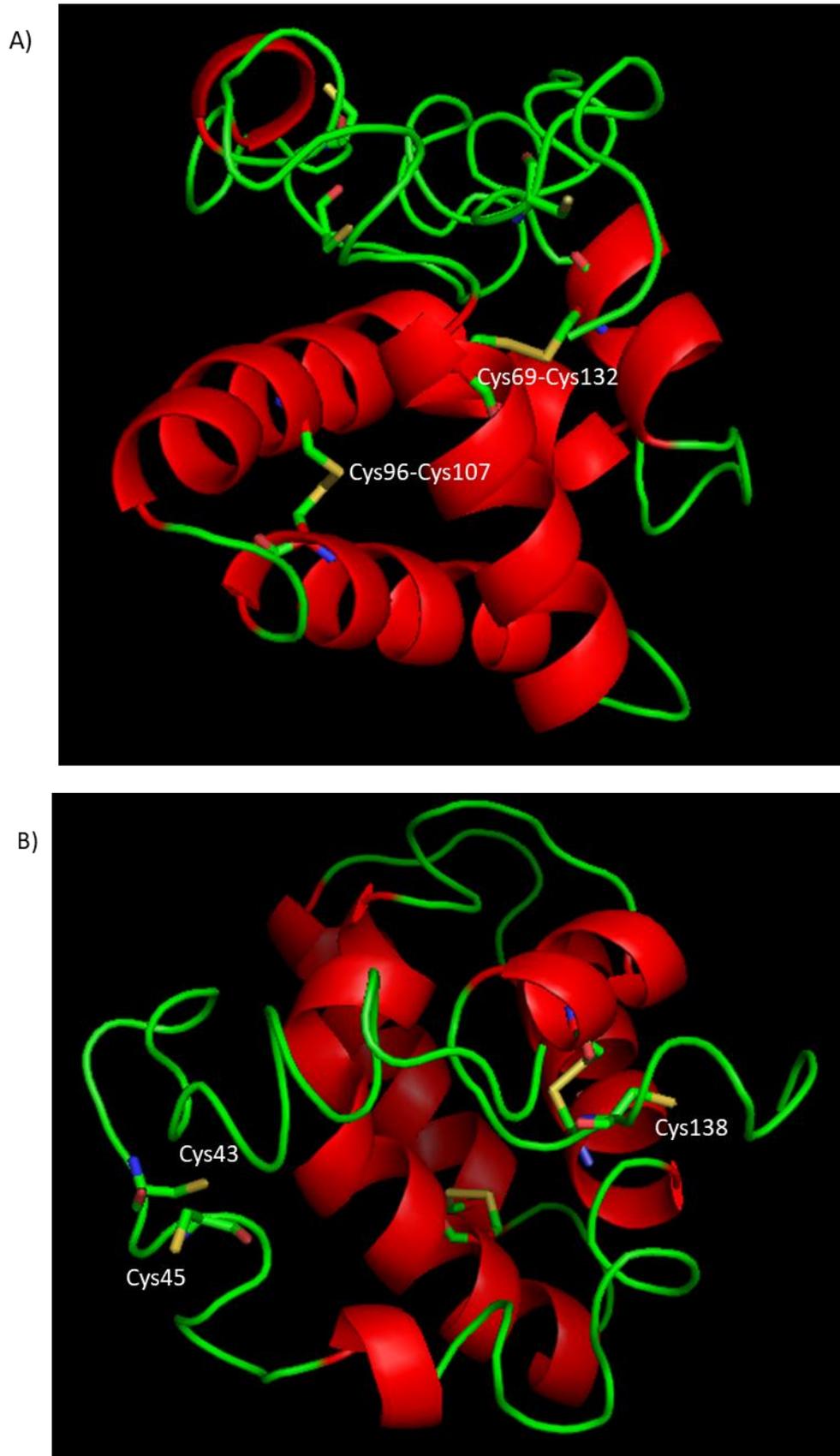


Figure 24. Modèle structural de la 15-GN généré par I-TASSER suite. A) La vue de côté montre les deux ponts disulfure stabilisant le domaine saposin-like. B) La vue de dessus montre les trois autres résidus cystéines pour laquelle aucune information structurale n'est disponible. La cystéine 138 est éloignée des cystéines 43 et 45.

A)

P22749 GNLY_HUMAN	1	MATWALLLLAAMLLGNPGLVFSRSLPEYYDLARAHLRDEEKSCPCLAQEGPQGDLLTKTQ	60
Q29075 NKL_FIG	1	-----PGLAFSGLTPEHSALARAHPCDGEQFCQNLAPEDPQGDQLLORE	44
		.* **:*: ** * *: * ** *.***** * : :	
P22749 GNLY_HUMAN	61	ELGRDYRTCLTIYQKLLKMKVDK-PTQRSVSNAAIRVCRTRGRSRWRDVCNFMRRYQSRVT	119
Q29075 NKL_FIG	45	ELGLICHSCKRIIQKLEDMVGPQPNEDVTQAASRVCDKM-KILRGVCKKIMRTFLRRIS	103
		.:* .*::.*. *.: :*:***:*** . . *.**::** : *::	
P22749 GNLY_HUMAN	120	QGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTGPL	145
Q29075 NKL_FIG	104	KDILTGKKPQAICVDIKICKCKTGLI	129
		:.***:.. * ** *::** .** :	

B)

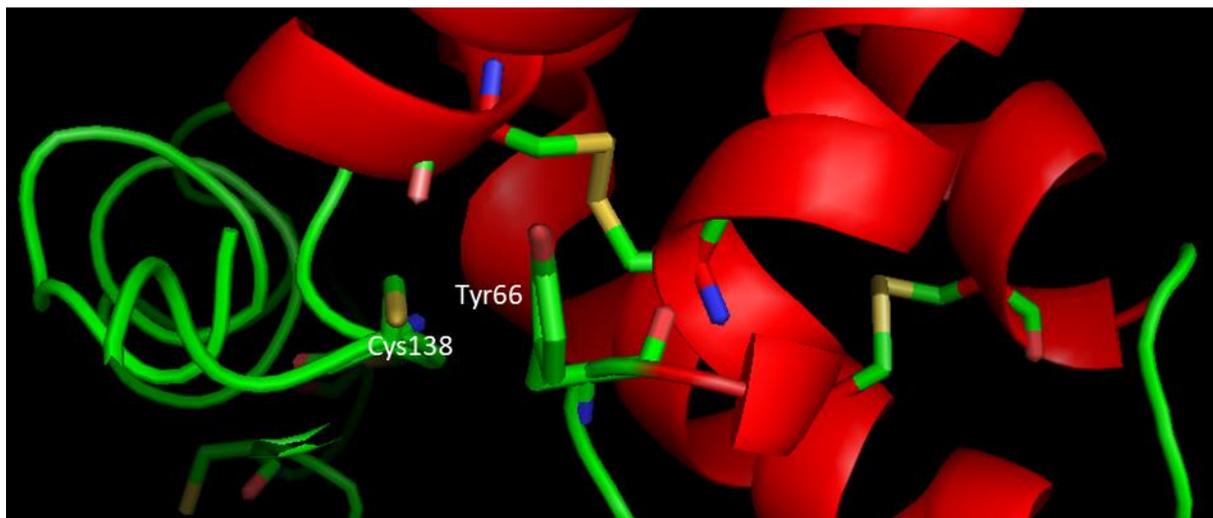


Figure 25. A) La séquence de la granulyse (UniProt P22749) est alignée avec la séquence de la NK-Lysine porcine (UniProt Q29075). L'alignement est réalisé à l'aide de l'outil en ligne d'UniProt. La position 66 est entourée en rouge. B) Vue du modèle I-TASSER suite mettant en évidence la proximité spatiale des Tyr 66 et Cys 138.

Pour disposer d'un meilleur éclairage sur le comportement redox de la triade CPC lors du repliement de la 15-GN, le peptide RDEEKSCPCLAQEG-NH₂ correspondant à la séquence de la 15-GN entre les résidus 37 et 50 a été synthétisé puis oxydé dans les conditions du précédent repliement. ([peptide] = 60 μM, [GSH] = 1 mM et [GSSG] = 0,2 mM). L'analyse LC-MS du mélange obtenu a révélé que la majorité du peptide reste sous forme réduite R (89,4%). Trois pics minoritaires correspondant aux disulfures mixtes S1,2 (9,8%) et à la boucle L (0,8%) ont également été détectés. Ce résultat suggère que le motif cyclique Cys-Pro-Cys observé pour **15-GN-f2** se forme au cours de la dialyse lorsque le système redox GSH/GSSG est progressivement retiré.

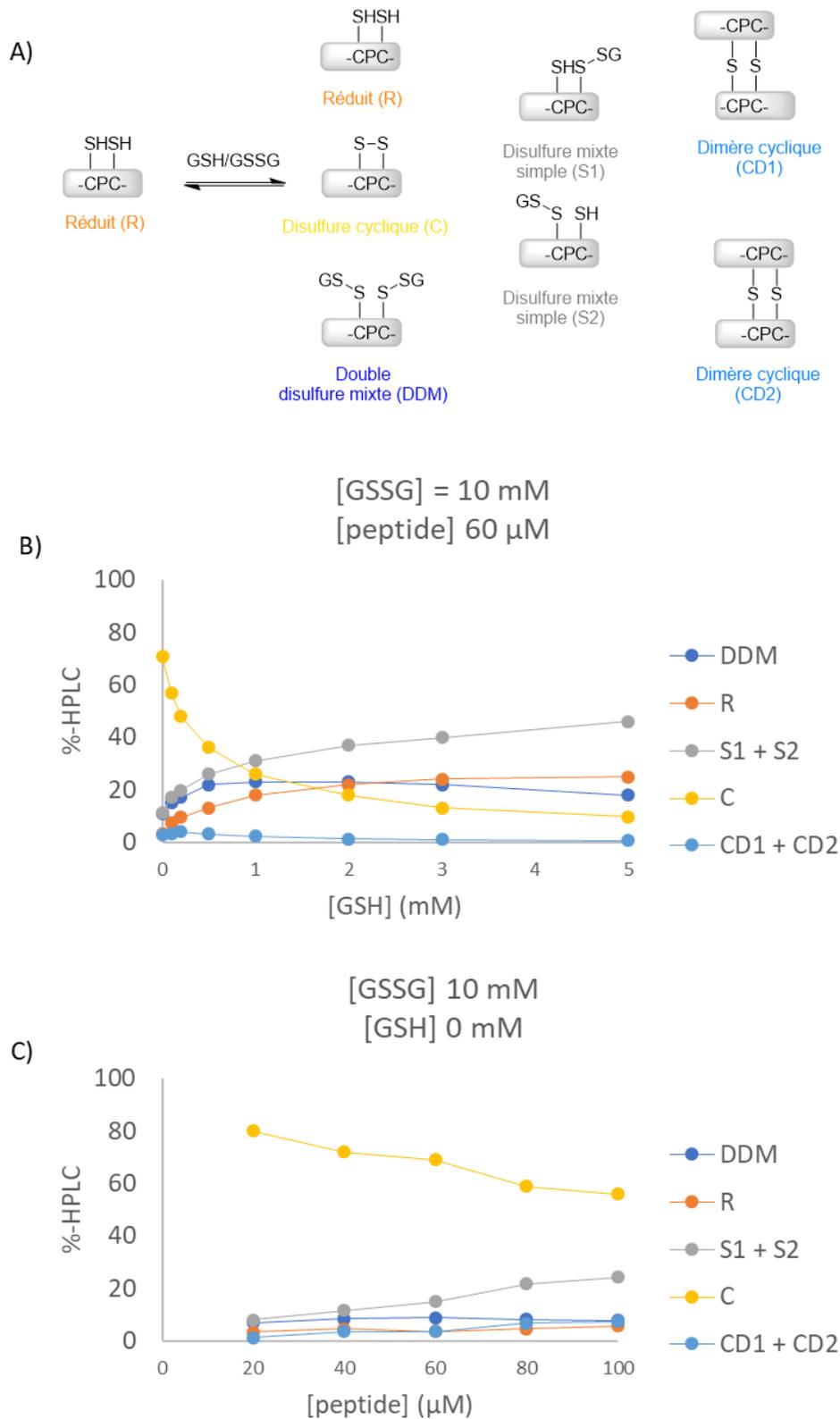


Figure 26. Le repliement oxydant du peptide RDEEKSCPLAQEG-NH₂ (15-GN 37-50) en présence de GSH/GSSG aboutit à plusieurs formes monomériques et dimériques. A) Listes des formes obtenues. B) Effet de la variation de la concentration en GSSG dans le milieu de repliement. La concentration en GSH varie de 0 à 5 mM, la concentration en GSSG est fixée à 10 mM dans un tampon PBS à pH 7.2 contenant 10%-vol de glycérol) C) Effet de la variation de la concentration en peptide dans le milieu de repliement. La concentration en peptide varie de 20 à 100 μ M, la concentration en GSSG est fixée à 10 mM dans un tampon PBS à pH 7.2 contenant 10%-vol de glycérol.

Avec pour objectif de mieux contrôler la formation du pont disulfure entre les cystéines 43 et 45 au cours du repliement du polypeptide linéaire **15-GN-I**, le comportement du même peptide modèle a été analysé dans des mélanges GSH/GSSG de moins en moins oxydants ([GSH] allant de 0 à 5 mM, [GSSG] constante à 10 mM, Figure 26 B). La diminution de la concentration en GSH accroît le rendement du peptide cyclique L. Le meilleur rendement pour L (environ 70 %) est d'ailleurs obtenu en absence totale de GSH. Dans ces conditions, la proportion de chacune des autres formes varie entre 5 et 11%. Dans une deuxième expérience, la concentration en peptide a été modulée de 20 à 100 μ M en présence de GSSG seul ([GSSG] = 10 mM, Figure 26 C). Une diminution de la concentration en peptide de 100 à 20 μ M a pour conséquence l'augmentation significative du rendement en peptide cyclique L (55% \rightarrow 80%). Ceci s'accompagne d'une diminution des proportions en peptide réduit R (10% \rightarrow 4%) et en dimère cyclique (17% \rightarrow 3%) lorsque l'équilibre est atteint.

L'ensemble de ces données a permis de concevoir une seconde expérience de repliement de **15-GN-I**. La protéine linéaire est toujours dissoute à 60 μ M dans un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10%-vol de glycérol et un mélange GSH 1mM/GSSH 0.2 mM. Par rapport à la première expérience, 2 M de chlorhydrate de de guanidine sont ajoutés au tampon de repliement afin d'assurer la complète dissolution de **15-GN-I**. L'utilisation d'un tel additif considéré comme un dénaturant a eu pour impact d'allonger la durée nécessaire à la conversion de l'intégralité du polypeptide linéaire, passant de 46 à 96 heures, sans toutefois modifier le profil obtenu (Figure 27). Au lieu de dialyser directement contre le tampon comme au cours du premier repliement, l'échantillon est ensuite dialysé contre le tampon contenant 10 mM de GSSG pour favoriser la formation du lien disulfure entre les cystéines 43 et 45. Forcer cette oxydation au cours d'une étape de dialyse permet de tirer profit de l'effet de dilution de l'échantillon qui entraîne une diminution de la concentration en protéine favorable à l'oxydation du motif CPC. L'échantillon est ensuite dialysé une seconde fois contre le tampon sans système redox. L'analyse LC-MS de **15-GN-f** repliée dans ces conditions révèle une simplification spectaculaire du profil HPLC, avec essentiellement la présence de deux formes majoritaires **15-GN-f1** et **15-GN-f2** (Figure 28 B). Avec cet échantillon, le patron des ponts disulfure de la forme majoritaire **15-GN-f2** a pu être confirmé et celui de la forme **15-GN-f1** a pu être complètement caractérisé (Figure 28 C). Les deux liens disulfures reliant les Cys69 à Cys132 et Cys96 à Cys 107 et stabilisant le domaine saposin-like sont présents dans les deux

formes. Une des deux cystéines du motif CPC est engagée dans un pont disulfure avec la Cys138 sans toutefois qu'il soit possible de déterminer précisément laquelle. Enfin la cystéine restante est liée par disulfure mixte à une molécule de glutathion. À noter également l'apparition d'une nouvelle forme, **15-GN-f3** dont la masse totale correspond à un dimère de la protéine portant deux molécules de glutathion. Le patron exact des ponts disulfure de ce dimère n'a pas pu être déterminé compte tenu de sa présence en faible quantité.

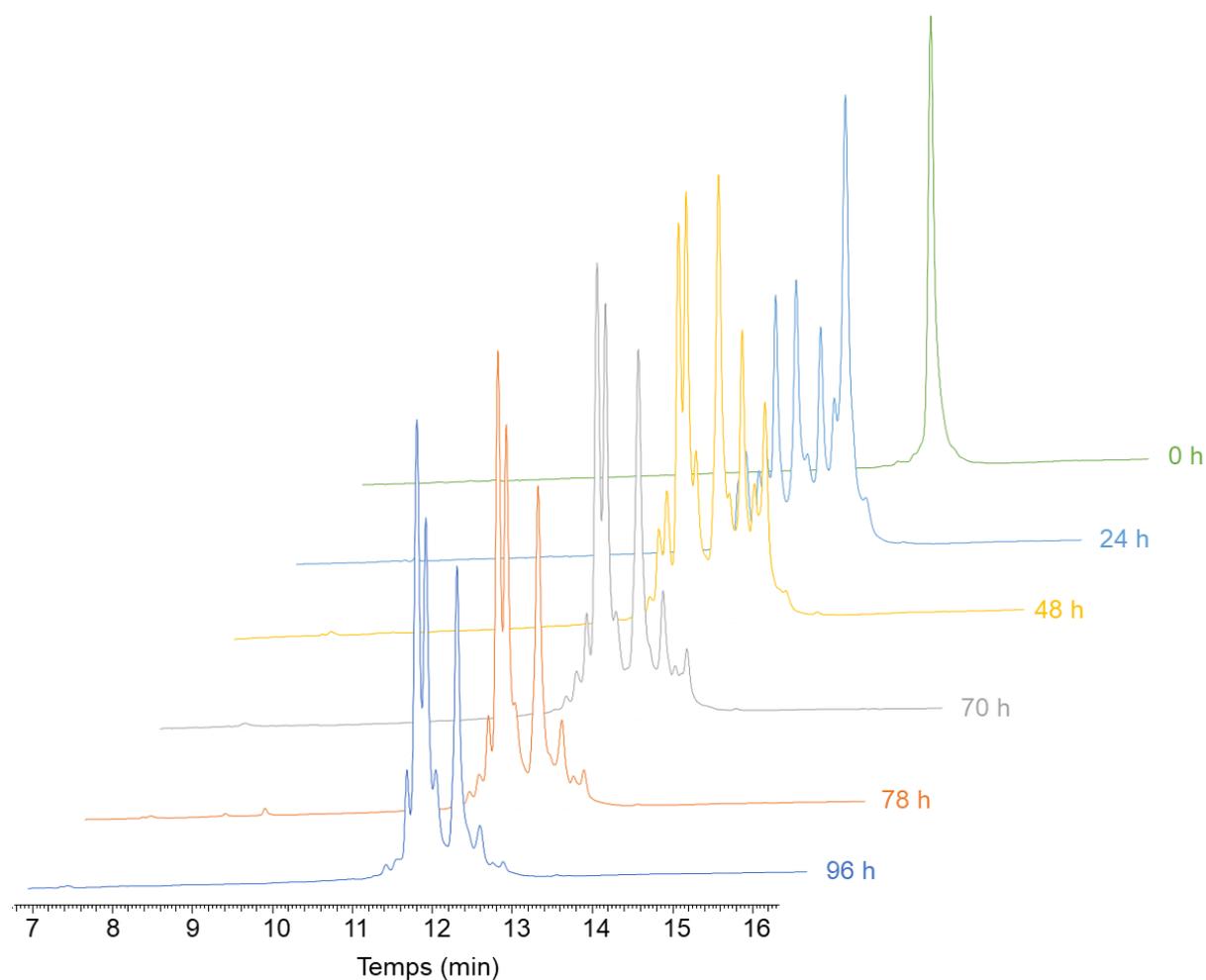


Figure 27. Suivi cinétique du repliement de 15-GN-I.

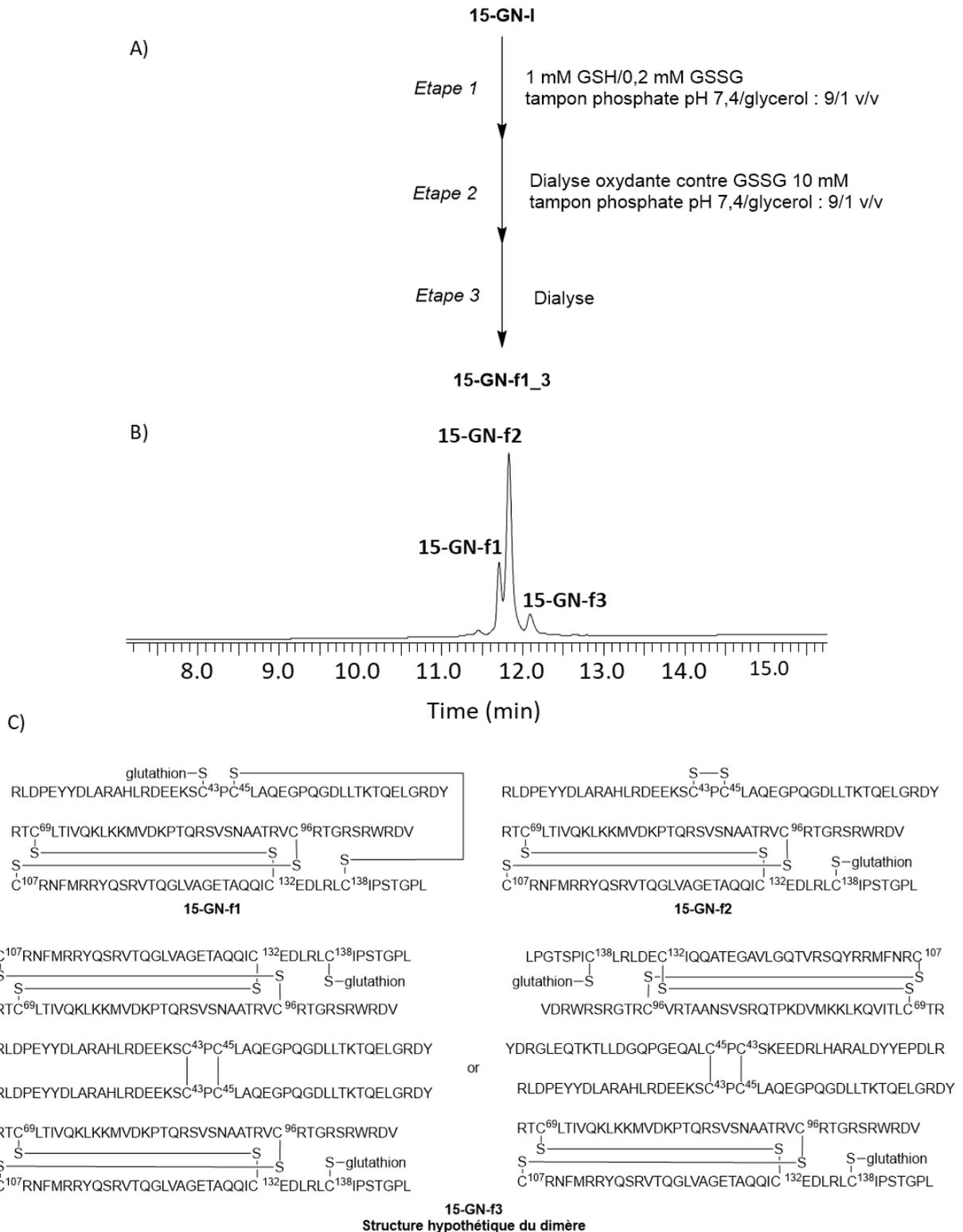


Figure 28. Second repliement du polypeptide **15-GN-I**. A) **15-GN-I** est replié en présence du système redox glutathion (GSH)/glutathion disulfure (GSSG), dialysé contre un tampon oxydant puis contre un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10%-vol de glycérol B) Analyse HPLC du mélange **15-GN-f**. C) Patron des ponts disulfure des formes **15-GN-f1**, **-f2** et **-f3**.

Pour les besoins des expériences décrites dans la suite de ce manuscrit, la protéine doit être concentrée avant stockage. À l'issue de la deuxième dialyse, l'échantillon est donc dessalé rapidement par HPLC préparative puis lyophilisé avant d'être redissout dans du PBS contenant 10%-vol de glycérol avant stockage à -80 °C. L'ensemble de ce procédé permet d'obtenir 300 µL d'une solution de 15-GN repliée concentrée à 429 µM avec 72 % de rendement.

4. Caractérisation structurale de la 15-GN synthétique

L'obtention de ce mélange de formes repliées de la **15-GN-f** en quantité de l'ordre de plusieurs milligrammes et surtout la complète caractérisation des patrons de ponts disulfure des deux formes majoritaires a ensuite été complétée par une étude structurale en spectroscopie de dichroïsme circulaire (CD).

La spectroscopie de dichroïsme circulaire est un outil de mesure biophysique dont l'utilité pour la caractérisation des biopolymères tels que les protéines ou les acides nucléiques est aujourd'hui bien établie. La technique s'appuie sur l'absorption différentielle de la lumière polarisée à droite et à gauche par les molécules contenant un centre chiral ou possédant une structure tridimensionnelle telle qu'un environnement chiral en découle. Les informations structurales obtenues par dichroïsme circulaire sont complémentaires de celles obtenues par la cristallographie aux rayons X, la spectroscopie RMN ou la microscopie cryo-électronique. Cette technique présente en outre de nombreux avantages qui incluent la capacité à explorer une grande variété de conditions de solubilisation de l'échantillon et de température, une acquisition rapide des données et une consommation relativement faible de l'analyte.

La structure secondaire des protéines peut être déterminée par spectroscopie de dichroïsme circulaire dans une région particulière de l'UV lointain comprise entre 180 et 260 nm. À ces longueurs d'onde, le chromophore est la liaison peptidique et les variations du signal traduisent sa présence dans un environnement replié et régulier.²⁴⁸ La transition énergétique la plus faible du chromophore peptidique est une transition $n \rightarrow \pi^*$ observée à 210-220 nm et

²⁴⁸ Kelly, S. M.; Price, N. C. *Biochim Biophys Acta* **1997**,*1338*, 161–185.

mettant en jeu les électrons non liants de l'atome d'oxygène du carbonyle. La transition la plus énergétique se traduit quant à elle par une bande d'absorption centrée à 190 nm et correspond à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ des électrons π du carbonyle.^{249,250} L'intensité de ces transitions dépend des angles de torsion Φ et Ψ . Par conséquent, la présence d'hélices α , de brins β ou de structures désordonnées se traduit par une forme et une amplitude particulière du spectre de dichroïsme circulaire autour de ces longueurs d'onde.²⁵¹ Une approximation de la fraction de chaque structure secondaire peut donc être fournie en réduisant l'analyse du spectre CD à l'UV lointain à la somme pondérée des spectres de références de chacune de ces structures. Le spectre CD nous renseigne ainsi sur le pourcentage moyen de la présence de ces structures dans la molécule mais n'est pas adapté pour déterminer quels résidus γ sont spécifiquement impliqués.

La construction du modèle structural à l'aide du logiciel I-TASSER présenté plus haut s'appuie sur des analogies de séquence avec des protéines pour lesquelles le repliement et l'occurrence de structures secondaires sont bien caractérisés. Logiquement, le modèle généré pour la 15-GN affiche une structure tridimensionnelle identique à la 9-GN entre les résidus 63 et 136 qui délimitent sa séquence. En dehors de cette région, aucune équivalence avec des structures protéiques connues ne permet au logiciel d'attribuer des structures secondaires de type hélice α ou brin β au reste de la séquence. En somme, le modèle permet de formuler l'hypothèse suivante. Structurellement parlant, la 15-GN disposerait d'un cœur saposin-like compact, tout à fait analogue à la 9-GN et donc composé de 5 hélices α . Autour de lui s'articuleraient deux régions N et C-terminales peu structurées. La proportion de résidus de la 15-GN engagés dans des hélices α dans ce modèle est égale à 49%.

L'analyse en dichroïsme circulaire de **15-GN-f** est conduite dans des conditions tout à fait classiques. La solution concentrée obtenue après purification par HPLC est diluée dans un tampon phosphate à 10 mM et à pH 7,2 afin d'obtenir une concentration finale en protéine

²⁴⁹ Hammes, G. G. (2005) *Spectroscopy for the Biological Sciences*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.

²⁵⁰ Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. (2000) *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2nd edn. New York, USA: Wiley-VCH.

²⁵¹ Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. *Biochim Biophys Acta* **2005**, 1751, 119–139.

égale à 12,6 μM . La moyenne de trois spectres enregistrés à 25 °C entre 185 et 260 nm par pas de 1 nm est présentée en Figure 29.

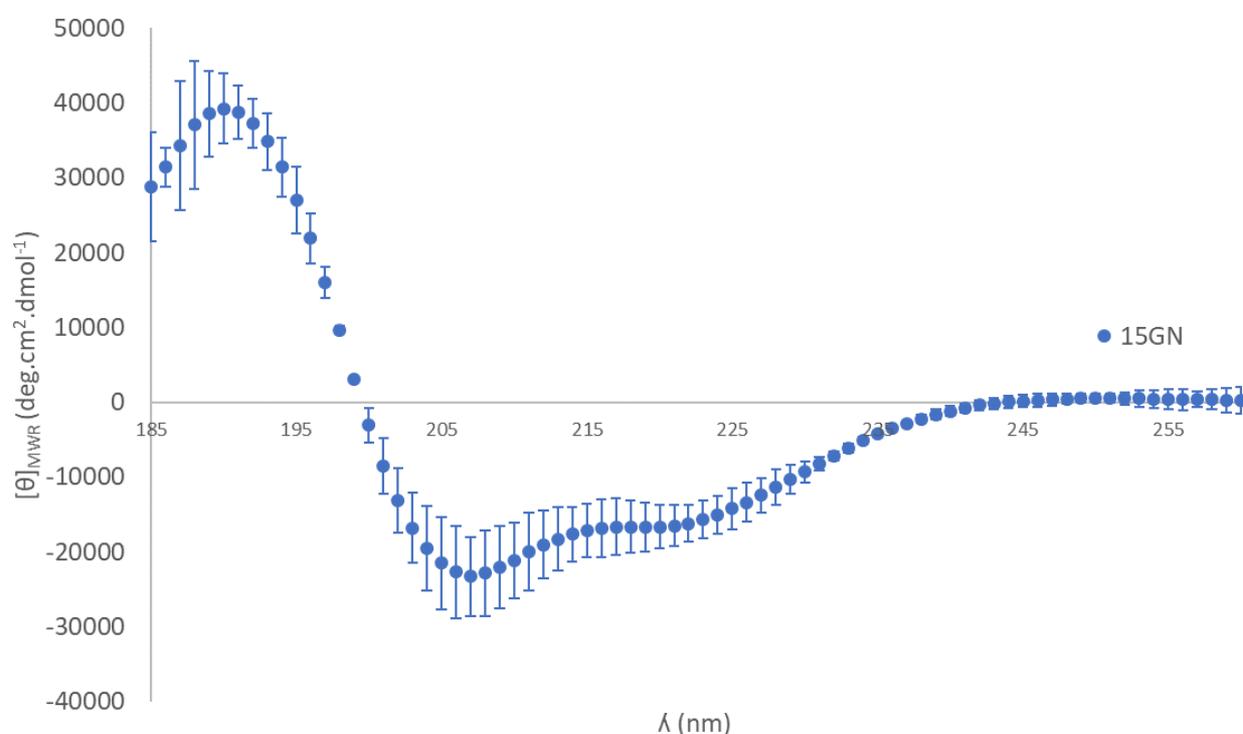


Figure 29. Spectre de dichroïsme circulaire de **15-GN-f**. **15-GN-f** est dissout à 12.6 μM dans un tampon phosphate à 10 mM et à pH 7,2. Le spectre est enregistré à 25 °C entre 185 et 260 nm par pas de 1 nm. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% calculé à partir de trois réplicats.

Le spectre présente deux minima à 208 et 222 nm caractéristiques de la présence de structures hélicoïdales dans l'échantillon. Le pourcentage d'hélices α , calculé par la méthode empirique de Greenfield et Fasman, est égal à 40%.²⁵² La déconvolution du spectre à l'aide du serveur en ligne Dichroweb permet également une approximation de l' α -hélicité de la 15-GN à 54%.^{253,254,255} Ces deux valeurs expérimentales d' α -hélicité encadrent étroitement la valeur théorique de 49%.

²⁵² Greenfield, N.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108-4116.

²⁵³ Lobley, A.; Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 211-212.

²⁵⁴ Sreerama, N.; Woody, R. W. *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 252-260.

²⁵⁵ Lees, J. G.; Miles, A. J.; Wien, F.; Wallace, B. A.. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1955-1962.

En résumé, l'accès par synthèse chimique à plusieurs milligrammes de 15-GN repliée a permis de lever un verrou important qui freinait jusqu'ici la caractérisation structurale de cette protéine. Son analyse en dichroïsme circulaire montre qu'elle dispose de structures secondaires principalement hélicoïdales et dont la proportion peut être estimée entre 40 et 54%. Ces résultats constituent une première étape vers la validation de notre modèle structural qui prédit à la 15-GN une structure composée d'un cœur saposin-like et d'extrémité N- et C-terminales ne possédant pas de structures secondaires de type hélice α ou brin β . Ces premières expériences ont également permis la mise au point d'un protocole robuste d'analyse en dichroïsme circulaire de la 15-GN. Celui-ci peut donc être facilement adapté à la caractérisation structurale de protéines analogues. Enfin, nous disposons d'une quantité substantielle de 15-GN dont le repliement et la structure secondaire sont désormais caractérisés. Il nous est donc maintenant possible d'envisager l'évaluation de ses propriétés biologiques.

5. Activités biologiques de la 15-GN synthétique

5.1. Chimiotaxie

Comme il en était fait mention au chapitre 2, une fonctionnalité importante de la 15-GN est de contribuer à la réponse immunitaire au travers d'une activité chimiotactique envers différentes cellules immunitaires dont les monocytes.¹⁷¹ La chimiotaxie est un phénomène pour lequel la direction du mouvement d'une cellule est déterminée par un gradient extracellulaire d'un composé. Les premières observations de la chimiotaxie dans le règne animal ont été rapportées par Leber en 1888. Il constate que les leucocytes d'un lapin convergent de toutes les directions vers un site d'irritation oculaire.²⁵⁶ Il émet l'hypothèse selon laquelle des substances se diffusent depuis la lésion et créent un gradient qui guide les leucocytes. Cependant, ces substances guidant les leucocytes au site d'une inflammation ne seront pas identifiées avant plusieurs décennies. En 1947, Bonner découvre que l'amibe eucaryote *Dictyostelium discoideum* migre elle aussi en direction d'une source de signaux

²⁵⁶ Leber, T. *Fortschr Med.* **1888**, 6, 460–464.

chimiques.²⁵⁷ Depuis ces premières découvertes, de véritables progrès ont été faits en ce qui concerne la compréhension des processus biologiques fondamentaux permettant la chimiotaxie des cellules eucaryotes.²⁵⁸ Aujourd'hui, la chimiotaxie est connue pour son rôle dans divers processus physiologiques comme le recrutement des leucocytes au site d'une infection, la circulation des lymphocytes dans l'ensemble de l'organisme ainsi que la structuration du système nerveux lors de son développement.²⁵⁹

L'activité chimiotactique de la granulysine s'observe à des concentrations de l'ordre du bas nanomolaire tandis que son activité antimicrobienne ne s'observe qu'à l'échelle micromolaire. Par conséquent, l'examen des propriétés chimiotactiques de la 15-GN synthétique est tout à fait indiqué pour attester de sa fonctionnalité sans en imposer une consommation trop importante. Nous avons donc évalué la capacité du mélange de formes repliées **15-GN-f** à induire la migration de monocytes humains CD14⁺ fraîchement purifiés dans des chambres de Boyden. Une chambre de Boyden (Figure 30 A) consiste en un insert de culture cylindrique logé au sein d'un puit de plaque de culture cellulaire. Le fond de l'insert est constitué d'une membrane en polycarbonate poreuse. La porosité de la membrane est choisie en fonction du type cellulaire support à l'expérience, 5 µm dans le cas des monocytes.²⁶⁰ Les cellules sont ensemencées dans l'insert avec du milieu sans sérum et du milieu contenant le chimioattractant est placé dans le puit en dessous (Figure 30 B). Les cellules capables de migrer passent à travers les pores et sont comptées à l'issue de l'expérience (Figure 30 C). Des monocytes purifiés du sang de 6 donneurs ont été utilisés pour l'expérience dont les résultats sont rassemblés en Figure 31.

²⁵⁷ Bonner, J. T. *J Exp Zool.* **1947**, *106*, 1–26.

²⁵⁸ Jin, T.; Hereld, D. *Eur J Cell Biol.* **2006**, *85*, 905–913.

²⁵⁹ Jin, T.; Xu, X.; Hereld, D. *Cytokine* **2008**, *44*, 1-8.

²⁶⁰ Falasca, M.; Raimondi, C.; Maffucci, T. (2011) Boyden Chamber. Wells C., Parsons M. (eds) Cell Migration. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 769. Humana Press.

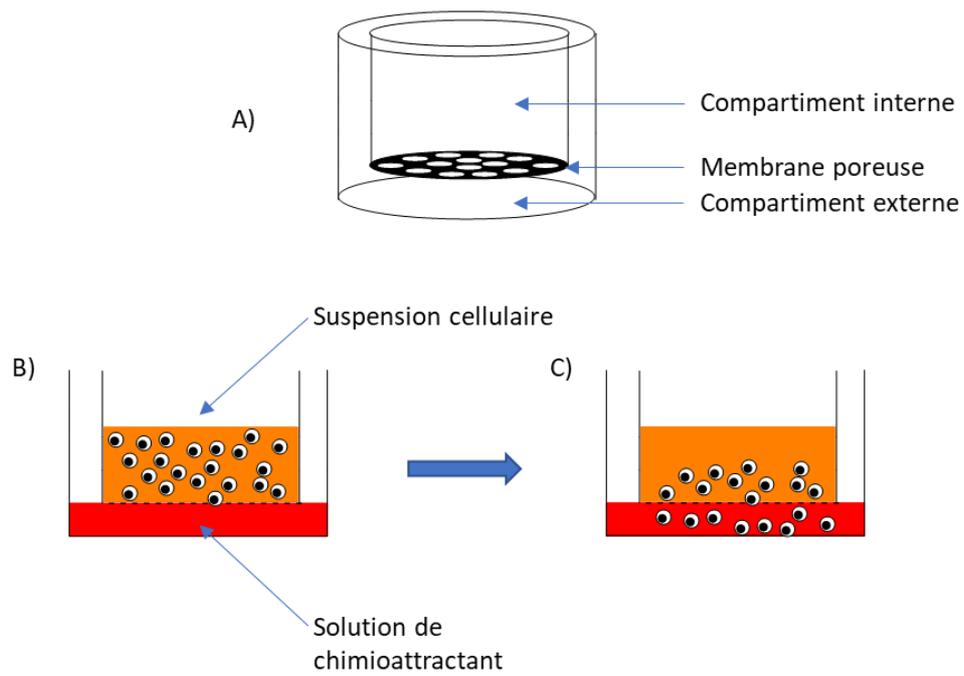


Figure 30. A) Chambre de Boyden pour la mesure de la chimiotaxie. B) Configuration de la chambre de Boyden avant le test. C) Configuration de la chambre de Boyden après le test. Les cellules sensibles au chimioattractant migrent dans le compartiment inférieur en passant à travers la membrane

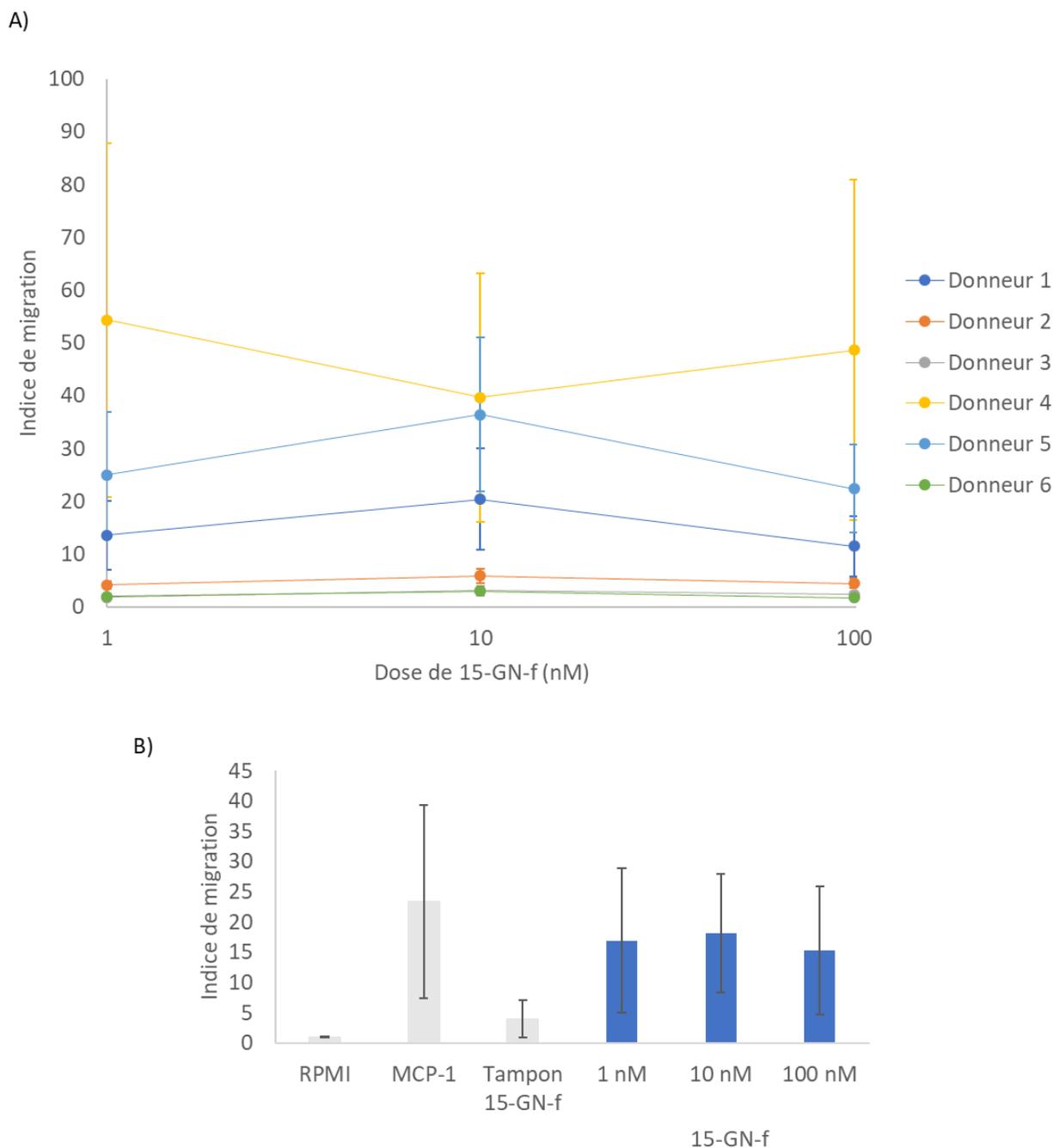


Figure 31. Activité chimiotactique de la 15-GN sur des monocytes primaires. Les données sont exprimées par rapport à la migration observé dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté par 0.1% de sérum de veau fœtal. A) Dose-réponse à **15-GN-f** (0-100 nM) pour 6 donneurs. Les expériences ont été répétées 9 fois et les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm écart type. B) Moyenne de l'indice de migration pour chaque dose. MCP-1 est utilisé comme contrôle positif à 23 nM.

Comme espéré, la **15-GN-f** induit la migration des monocytes à de faibles concentrations nanomolaires (Figure 31). De plus, la protéine présente une courbe de dose-réponse en cloche typique de l'activité chimiotactique avec une réponse maximale autour de 10 nM (Figure 31 B). La réponse à 10 nM est d'ailleurs comparable à la réponse observée face à 23 nM de MCP-

1, une chimiokine bien connue pour sa puissante activité chimiotactique envers les monocytes.²⁶¹

En conclusion, le résultat positif de cette expérience d'évaluation de l'activité chimiotactique de la **15-GN-f** vient incontestablement attester sa fonctionnalité. Ainsi, il valide et démontre la robustesse de l'ensemble du procédé de synthèse chimique pour l'accès à la 15-GN.

5.2. Activité antibactérienne

L'ensemble des résultats rapportés jusqu'ici montrent que nous sommes en possession de plusieurs milligrammes de 15-GN dont le repliement, la structure tridimensionnelle sont caractérisés en détails et dont la fonctionnalité biologique est largement démontrée. Dès lors nous pouvons tenter d'apporter un éclairage nouveau sur l'activité antibactérienne de la 15-GN. Pour rappel, il s'agit d'un sujet qui fait encore aujourd'hui débat dans la littérature. Les travaux de Wei et collaborateurs rapportent une activité bactéricide d'une 15-GN 6His-tag exprimée dans *E. coli* envers une grande variété de pathogènes. Les auteurs notent d'ailleurs que la souche *P. aeruginosa* PAO1 est la plus sensible à leur 15-GN recombinante avec une réduction d'un facteur 10^4 en CFU à $2 \mu\text{M}$.¹⁷⁰ En revanche, Clayberger *et al.* ne trouvent aucune activité antibactérienne à leur 15-GN de séquence native exprimée dans des cellules d'insectes envers *S. typhimurium*.¹⁴⁹ Une activité envers ce pathogène a pourtant été observée par Wei *et al.*

Le choix a donc été fait d'évaluer l'activité bactéricide de **15-GN-f** envers *P. aeruginosa* PAO1. Pour cela, la souche bactérienne a été exposée à une dose croissante de **15-GN-f** et la densité optique du milieu de culture à 600 nm a été mesurée après 4 et 22 heures d'incubation. Les résultats sont présentés en Figure 32. L'activité de la 15-GN commercialisée par R&D systems est également évaluée dans les mêmes conditions et rapportée ici.

²⁶¹ Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. E. *J Interferon Cytokine Res.* **2009**, *29*, 313–326.

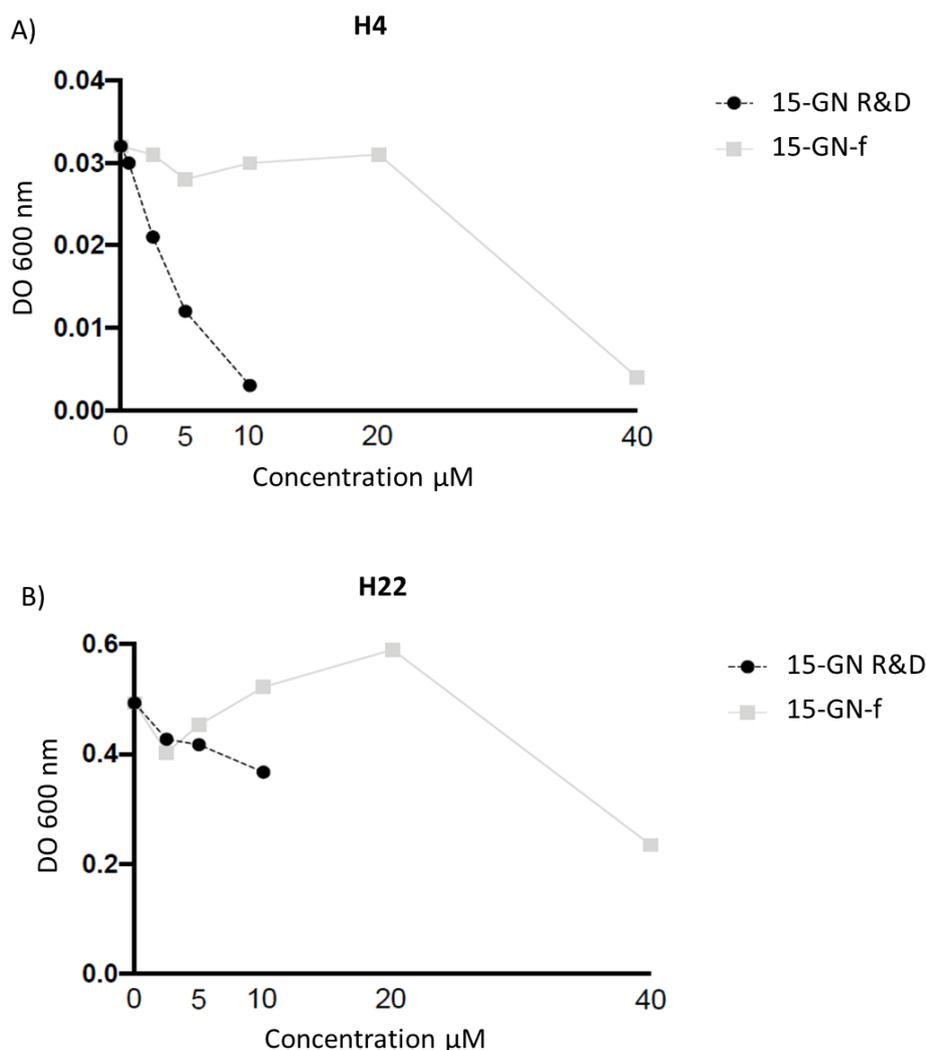


Figure 32. Comparaison des activités antibactériennes de la 15GN commerciale et de **15-GN-f** sur *P. aeruginosa*. A) Densité optique à 600 nm en fonction de la concentration en protéine après 4 heures d'incubation. B) Densité optique à 600 nm en fonction de la concentration en protéine après 22 heures d'incubation.

Pour les deux durées d'incubation, aucun effet bactéricide de **15-GN-f** n'est observé pour une concentration inférieure ou égale à 20 μM . Seule une réduction de la densité optique survient lorsque la culture du pathogène est conduite avec 40 μM de **15-GN-f**. En revanche, la culture de *P. aeruginosa* avec seulement 2 μM de 15-GN commerciale permet d'observer un effet bactéricide après 4 heures d'incubation. L'effet est néanmoins beaucoup moins marqué après 22 heures de culture, durée au bout de laquelle l'effet bactéricide de la 15-GN n'a jamais été rapporté dans la littérature.

Notre incapacité à détecter une activité bactéricide de la 15-GN synthétique envers *P. aeruginosa* est en accord avec les conclusions de Clayberger *et al.* Comme eux, nous avons

produit une 15-GN dont la séquence est exempte de tout tag destiné à sa purification. Or Wei *et al.* rapportent une activité bactéricide d'une 15-GN recombinante portant 6 Histidines ce qui pourrait expliquer les différences d'activité observées. De surcroît, la 15-GN recombinante achetée chez R&D Systems montre une activité bactéricide significative alors que sa séquence est, elle aussi, augmentée d'un tag 10-His. Tout ceci s'accorde avec les éléments de discussion apportés par Finn *et al.* au sujet d'un effet de la présence de tags sur la fonctionnalité de la protéine. Enfin, nous avons clairement attesté dans les paragraphes précédents de la fonctionnalité de **15-GN-f** à travers des tests de chimiotaxie. Tous considérés, ces résultats remettent sérieusement en cause les conclusions tirées par Wei *et al.* dans leur étude de l'activité bactéricide de la granulysine 15 kDa.

A l'effet potentiel des tags de purification dans la séquence, s'ajoute également la présence d'une grande quantité de sels dans l'échantillon de 15-GN commerciale. La fiche technique du fabricant stipule que l'échantillon correspond à la lyophilisation de 125 µL d'une solution contenant 20 mM de Citrate de Sodium et 500 mM de NaCl. Ensuite, le fournisseur recommande la reconstitution de l'échantillon à 100 µg/mL dans du PBS avant son utilisation. Ainsi, l'ajout d'une dose de 15-GN au milieu de culture du pathogène s'accompagne d'une forte augmentation de la salinité. La concentration finale en sel au contact de la bactérie en fonction de la concentration en 15-GN dans le milieu est rapportée dans le Tableau 4. Or la présence dans le milieu de culture d'une telle quantité de sel pourrait avoir un effet sur la croissance de la bactérie.²⁶²

[15-GN R&D] (µM)	[NaCl] (mM)	[Na citrate] (mM)
10	359,2	14,4
5	179,6	7,2
2,5	89,8	3,6
1,25	44,9	1,8

Tableau 4. Variation de la concentration en NaCl et Na citrate en fonction de la concentration en 15-GN commerciale.

²⁶² Michon, A. L.; Jumas-Bilak, E.; Chiron, R.; Lamy, B.; Marchandin, H. *PLoS One*. **2014**, *9*, e90164.

Par conséquent, *P. aeruginosa* a été mis en culture avec des concentrations croissantes de NaCl, de citrate trisodique et des deux sels en combinaison. Les résultats sont reportés en Figure 33 et mis au regard de l'activité de la 15-GN commerciale.

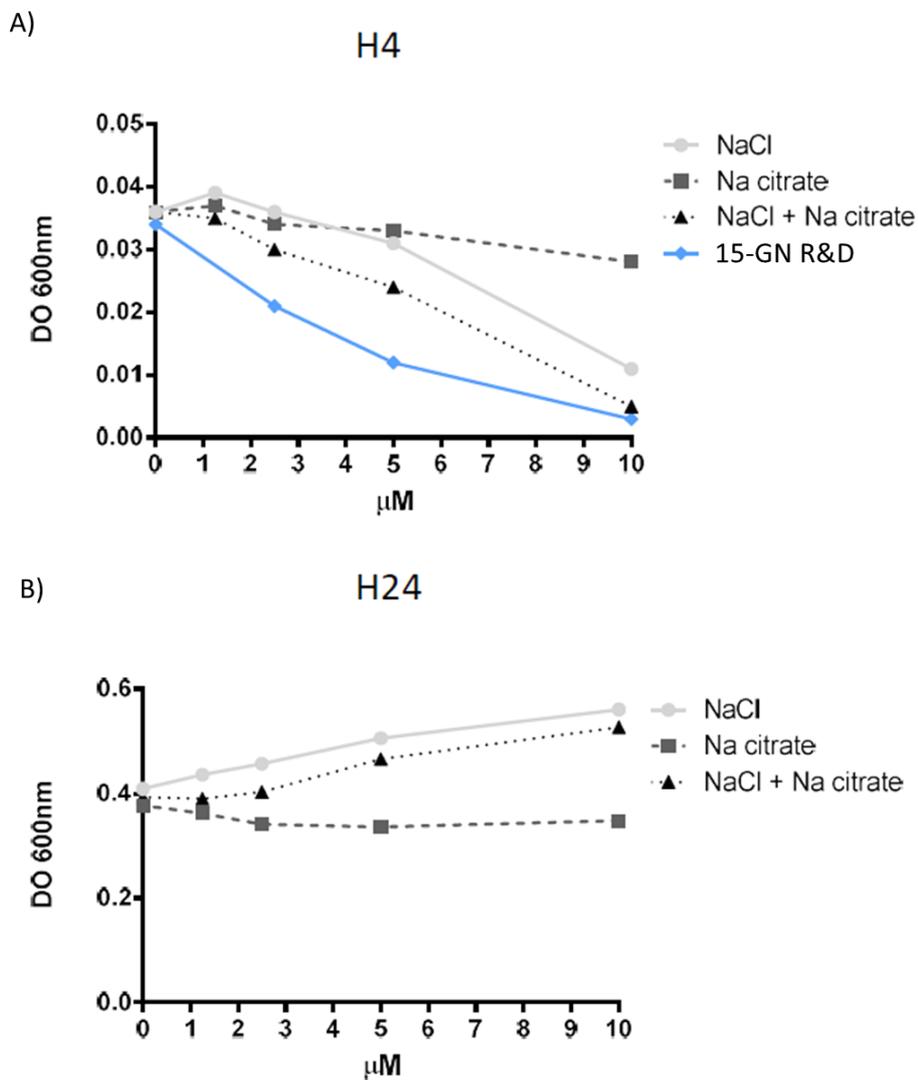


Figure 33. A) Comparaison de l'effet bactéricide de la 15-GN commerciale avec l'effet des sels présents dans l'échantillon après 4 heures d'incubation. B) Mesure de l'effet bactéricide des sels après 24 heures d'incubation.

Il en ressort que le citrate trisodique n'a aucun effet sur la croissance de *P. aeruginosa* après 4 ou 24 heures d'incubation. Par contre, le chlorure de sodium seul ou en combinaison avec le citrate de sodium semble avoir un effet bactériostatique à 4 heures ralentissant la culture de la bactérie (-0.7 log par rapport au contrôle). Ceci est certainement dû à une adaptation de la bactérie pour lui permettre de supporter une telle salinité, ce qui se traduit par une densité en bactérie plus élevée après 24 heures. Enfin, l'effet bactéricide de la 15-GN commerciale

observé à 10 μM après 4 heures d'incubation équivaut à l'effet obtenu avec la combinaison du NaCl et du citrate trisodique. Ainsi, il est possible d'émettre des réserves quant à l'activité bactéricide de la 15-GN commerciale qui ne semble due qu'à la grande quantité de sels présente dans l'échantillon.

En conclusion, l'étude de la 15-GN recombinante était jusqu'à présent limitée par la difficulté d'accès à cette protéine par les méthodes biologiques et par le manque de données concernant son repliement et sa structure tridimensionnelle. Nous avons montré dans ce chapitre l'efficacité de la synthèse chimique pour accéder à plusieurs milligrammes de 15-GN qui s'est révélée active au bas nanomolaire dans des tests de chimiotaxie. Bien qu'elle montre une activité chimiotactique cohérente avec les données de la littérature, la 15-GN synthétique s'est révélée dépourvue d'activité bactéricide envers *P. aeruginosa*, tranchant ainsi le débat qui existait encore autour de cette activité. Nous avons également montré que le repliement de cette protéine est complexe en raison de la présence d'un nombre impair de cystéines dans sa séquence. Le repliement oxydant de la granulysine 15 kDa est compliqué par la présence d'un motif Cys-Pro-Cys à son extrémité N-terminale et dont les propriétés redox sont tout à fait particulières. L'étude de ce motif inséré dans de courts peptides a apporté un véritable éclairage sur le comportement redox de ce motif et a fourni de précieuses informations pour l'optimisation du repliement de la protéine. Ces travaux ont également fait émerger un questionnement quant à l'implication de ce motif Cys-Pro-Cys dans l'activité de la 15-GN. L'absence de cette triade dans la séquence de la 9-GN pourrait par exemple expliquer les différences d'activités observées entre les deux isoformes. La capacité de la synthèse chimique à permettre l'accès à la 15-GN en quantité substantielle a d'ores et déjà permis d'importants progrès dans la caractérisation de ce composant essentiel de l'immunité. Mais le développement de ce procédé synthétique robuste ouvre également la voie à la synthèse de protéines analogues pour affiner encore sa caractérisation structurale et fonctionnelle, espérer mettre en avant des relations entre sa structure et ses activités, déchiffrer son mode d'action et même développer des analogues au potentiel thérapeutique.

Chapitre 4. Synthèse et caractérisation d'une chimiothèque d'analogues pour l'étude des relations structure-activité de la 15-GN

1. Synthèse et caractérisation de fragments de la 15-GN

L'étude bibliographique conduite au chapitre 2 a mis en avant les similitudes et les différences de propriétés biologiques qui existent entre la 15- et la 9-GN. Leur mécanisme de libération par les cellules cytotoxiques est, par exemple, tout à fait différent. La 9-GN est stockée dans des granules cytotoxiques contenant également de la perforine et des granzymes et qui sont libérés au contact d'une cellule infectée ou cancéreuse. En revanche, la 15-GN est stockée dans des granules distincts et le mécanisme déclenchant sa libération n'est pas connu. Ces deux protéines partagent des activités d'alarmine comme la chimiotaxie qui cependant ne s'exprime pas envers les mêmes populations de cellules immunitaires. L'induction de l'expression de facteurs proinflammatoires chez le monocyte est également une activité qu'elles partagent. Cependant, seule la 15-GN est connue pour activer la différenciation des monocytes en cellules dendritiques ainsi que leur maturation. Une autre différence notable dans leur activité biologique concerne leur cytotoxicité. Nous avons établi que la 15-GN en était dépourvue alors qu'il s'agit d'une activité indissociable de la 9-GN.

Au point de vue structural, la séquence de la 15-GN est à 60% composée de celle de la 9-GN. Également, les premières expériences de dichroïsme circulaire sur **15-GN-f** rapportées au chapitre précédent ont apporté de premiers éléments validant l'hypothèse selon laquelle la 15-GN disposerait d'hélices α rassemblées dans un cœur saposin-like dont la structure serait analogue à celle de la 9-GN. Autour de ce cœur saposin-like, les extrémités N- et C- terminales

propres à la 15-GN n'adopteraient pas de structures secondaires particulières et apparaîtraient désordonnées.

Tout ceci tend à montrer que des éléments de réponse importants concernant les relations structure-activité de la 15-GN peuvent être dégagés en liant les différences et similitudes structurales entre la 15- et la 9-GN à leurs différences et similitudes d'activité. Pour cela, il convient premièrement d'affiner la caractérisation structurale de **15-GN-f** pour valider ou non par l'expérience la pertinence du modèle qui nous accompagne depuis le début de cette étude. Approfondir l'étude des activités de ces protéines est également essentiel pour confirmer et espérer dégager de nouvelles différences ou similitudes d'activité. La différence majeure entre la 15- et la 9-GN réside dans la présence d'extensions N- et C-terminales peu structurées dans la 15-GN. Ceci soulève un questionnement important quant à leur rôle dans l'activité de la protéine. Enfin, le mécanisme de maturation protéolytique de la 15-GN en 9-GN n'est pas connu et nous pouvons nous interroger quant au devenir des deux extrémités N- et C-terminales lorsque celles-ci sont excisées. Ont-elles par exemple une activité propre ?

Ce sont toutes ces interrogations qui nous ont amené à entreprendre la synthèse des trois premiers analogues de la 15-GN rapportés dans cette première partie. La synthèse de la 9-GN a tout d'abord été conduite selon le même procédé que celui décrit pour la synthèse de la 15-GN. Là encore nous avons pu accéder à plusieurs milligrammes de protéine repliée et ainsi entreprendre une caractérisation de sa structure secondaire. Les extrémités N- et C-terminales de la 15-GN ont également été synthétisées et caractérisées afin d'étudier leur contribution à la structure tridimensionnelle de la 15-GN et à ses fonctions.

1.1. Synthèse de la granulysine 9 kDa (9-GN)

1.1.1. Synthèse et repliement

La stratégie synthétique utilisée ici est en tout point analogue à celle déjà décrite au chapitre 3 pour la synthèse de la 15-GN. La séquence de la 9-GN étant plus courte, le découpage diffère légèrement. Seul l'assemblage de trois segments peptidiques par NCL est nécessaire pour

accéder au polypeptide linéaire **9-GN-I** (Figure 34 A). Les sites de ligation sont inchangés permettant la réutilisation du segment central **B** déjà produit.

Le procédé démarre donc une nouvelle fois par la protection puis la tranthioestérification du segment B avant qu'il ne soit ligué au segment C-terminal **C** (Figure 34 B). Une fois déprotégé, le peptide **BC_{9-GN}** est engagé dans une réaction de NCL avec le court segment **A_{9-GN}** pour conduire au polypeptide linéaire **9-GN-I** avec un rendement global de 15% après purification (Figure 35).

- A)
- | | |
|---|--|
|  | DYRT |
|  | CLTIVQKLKKMVDKPTQRSVSNAAATRVCRTRGRSRWRDV |
|  | CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLR |

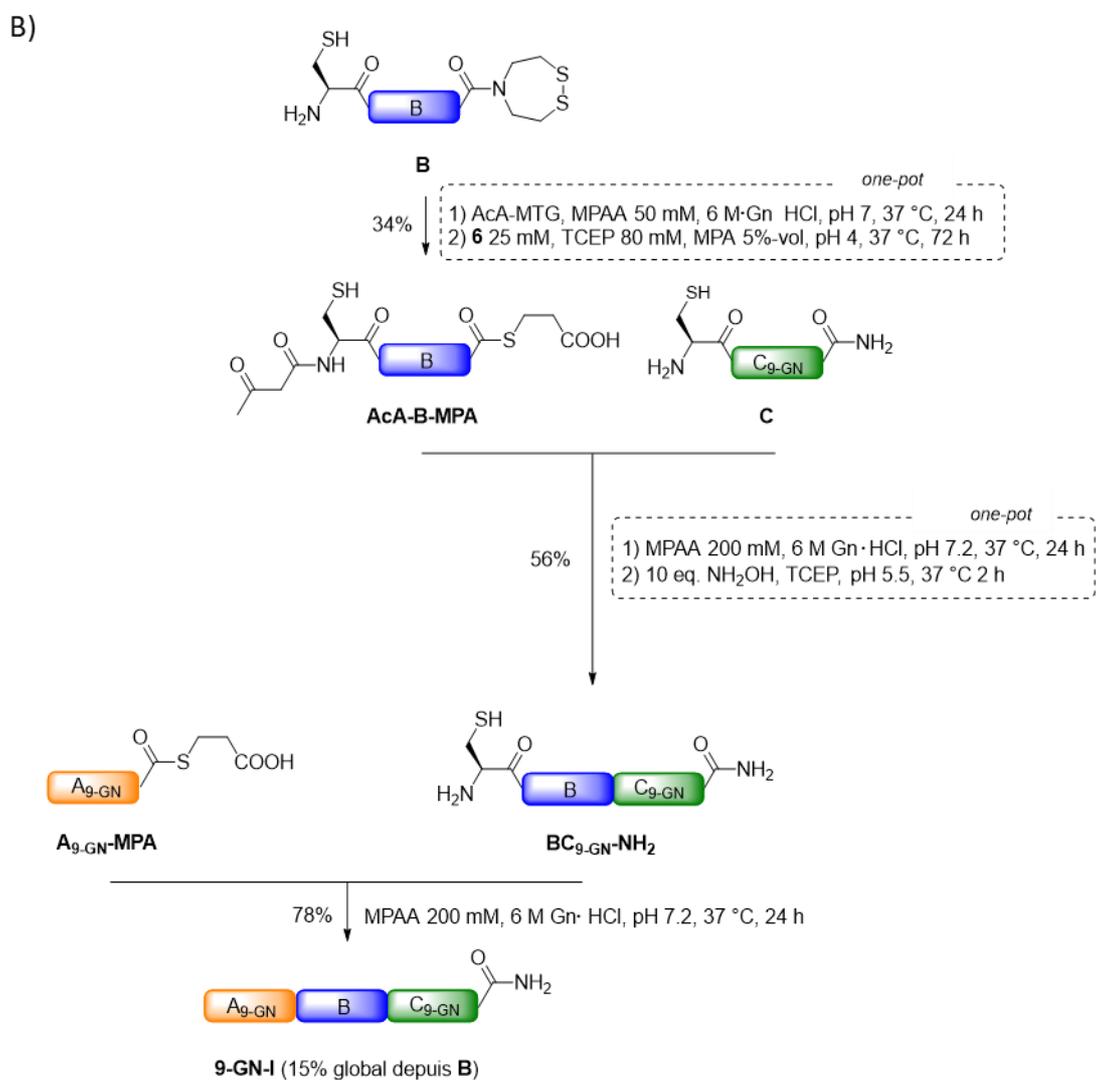


Figure 34. Synthèse chimique de la 9-GN linéaire. A) Segments peptidiques permettant l'assemblage de 9-GN-I. B) Adaptation du procédé de synthèse chimique précédemment développé à la synthèse de la 9-GN linéaire.

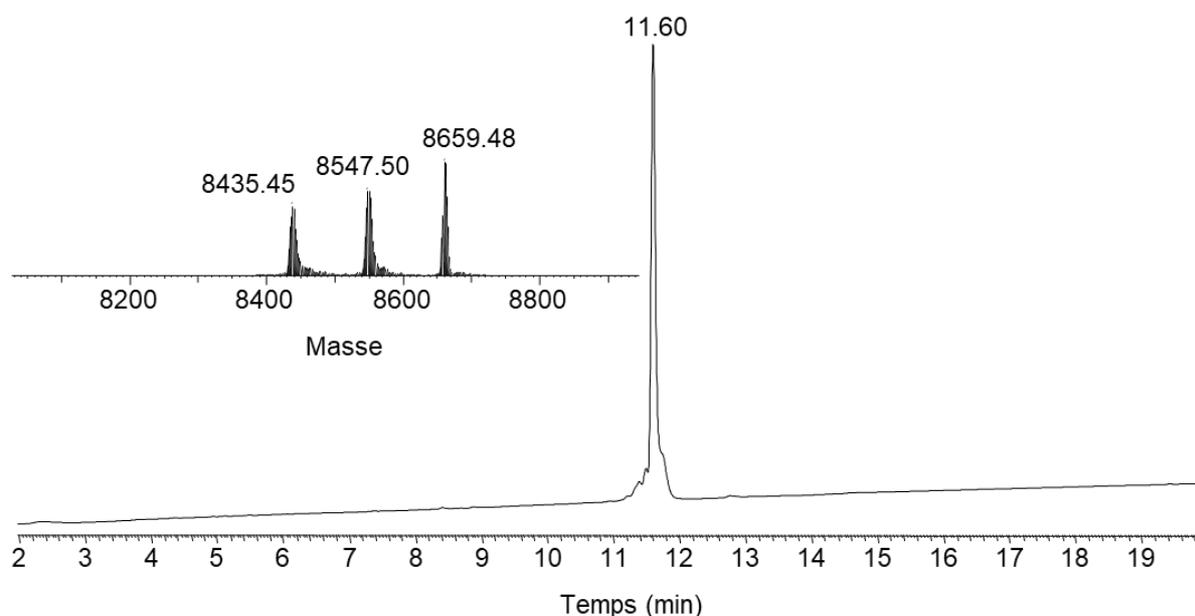


Figure 35. Analyse UPLC-MS du polypeptide **9-GN-I**. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Spectre de masse déconvolué, m/z calculé pour [M] (moyenne) 8435.79, trouvé 8435.45 (8547.50 [M+M_{TFA}], 8659.48 [M+2M_{TFA}]).

L'étape de repliement du polypeptide **9-GN-I** est elle aussi menée dans des conditions similaires au repliement de la 15-GN. Elle est conduite à 20 °C dans un tampon phosphate salin contenant 10% de glycérol, le système redox glutathion (1mM)/glutathion disulfure (0.2 mM) et 2 M de chlorhydrate de guanidine comme additif solubilisant. 7 jours ont été cette fois-ci nécessaires pour obtenir une forme repliée unique. Une analyse protéomique révèle la présence des ponts disulfure Cys69-Cys132 et Cys96-Cys107 caractéristiques de la structure tertiaire de la 9-GN recombinante décrite dans la littérature (Figure 36). L'absence de la triade Cys43-Pro44-Cys45 dans la séquence de la 9-GN facilite ensuite sa purification. L'intégralité du milieu de repliement est dialysée contre un tampon phosphate salin contenant 10% de glycérol. La protéine **9-GN-f** a été isolée avec un rendement de 80% (Figure 37).

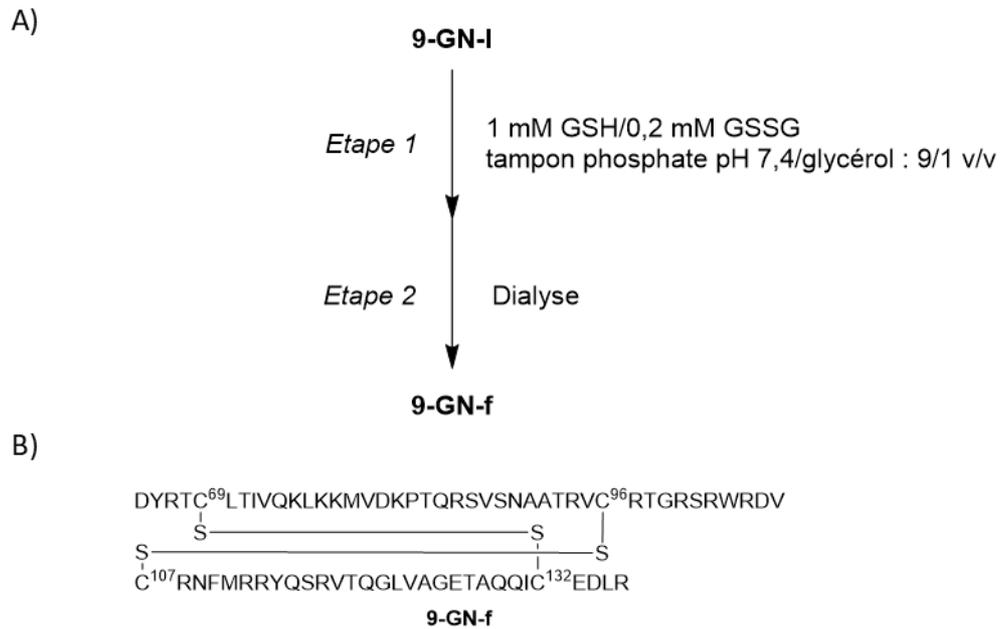


Figure 36. Repliement du polypeptide 9-GN-I. A) 9-GN-I est replié en présence du système redox glutathion (GSH)/glutathion disulfure (GSSG) puis dialysé contre un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10%-vol de glycérol B) Patron des ponts disulfure formés au sein de la proérine 9-GN-f.

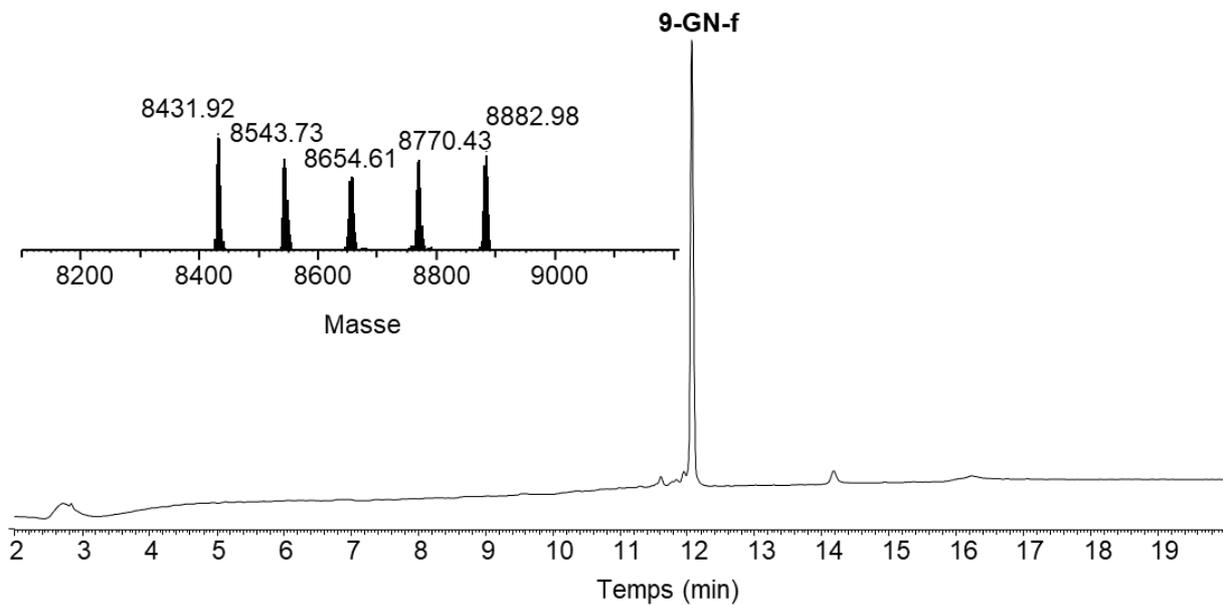


Figure 37. Analyse UPLC-MS de la protéine 9-GN-f. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Spectre de masse déconvolué, m/z calculé pour [M] (moyenne) 8431.79, trouvé 8431.92 (8543.73 [M+M_{TFA}], 8654.61 [M+2M_{TFA}], 8770.43 [M+3M_{TFA}], 8882.98 [M+4M_{TFA}]).

1.1.2. Caractérisation structurale

Maintenant que le patron des ponts disulfure de la 9-GN synthétique est déterminé, sa structure tridimensionnelle peut être caractérisée par la technique de dichroïsme circulaire. Selon la littérature, la structure de la 9-GN est exclusivement composée d'hélices α et de structures désordonnées. L'alpha hélicité de la protéine peut d'ailleurs être estimée entre 74% et 81%.^{222,146} L'analyse est conduite dans les mêmes conditions que pour la protéine **15-GN-f** : la protéine est dessalée par HPLC puis solubilisée à 12,8 μM dans un tampon phosphate 10 mM à pH 7,2. La moyenne de trois spectres enregistrés à 25 °C entre 185 et 260 nm par pas de 1 nm est présentée en Figure 38.

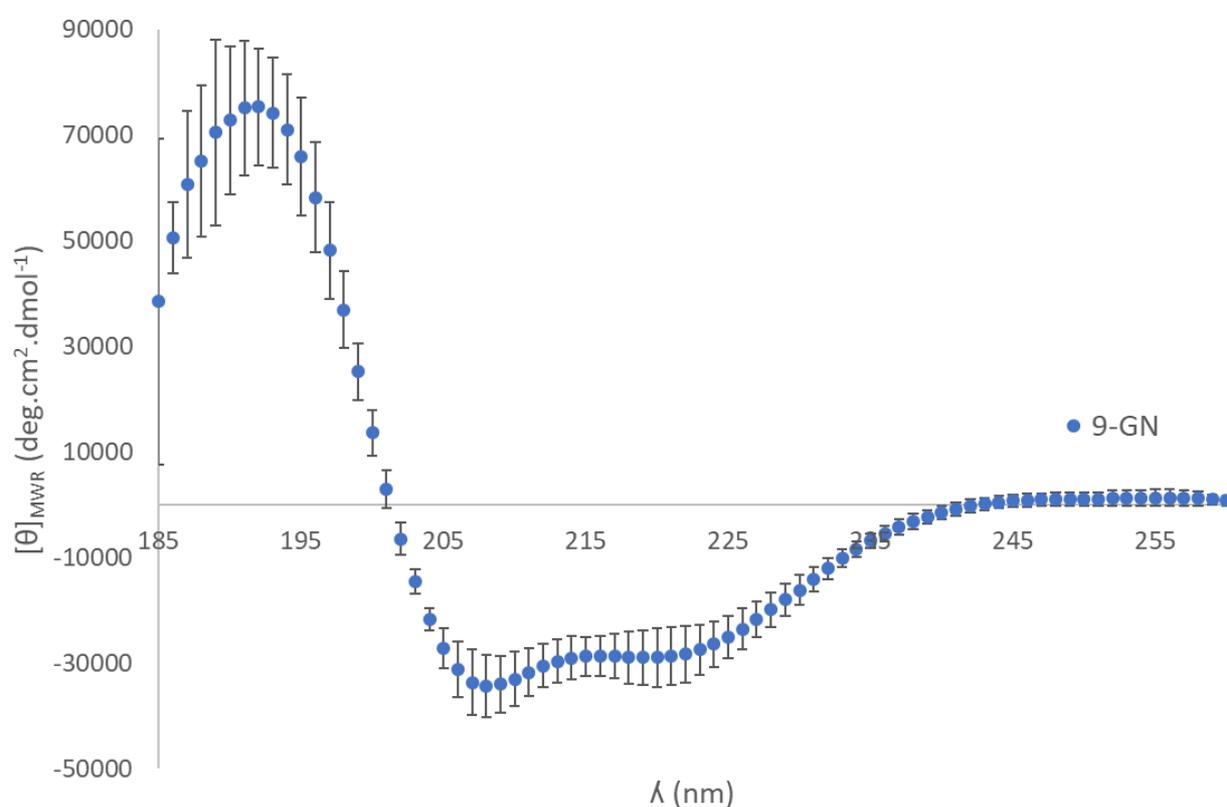


Figure 38. Spectre de dichroïsme circulaire de **9-GN-f**. **9-GN-f** est dissout à 12,8 μM dans un tampon phosphate à 10 mM et à pH 7,2. Le spectre est enregistré à 25 °C entre 185 et 260 nm par pas de 1 nm. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% calculé à partir de trois réplicats.

Le spectre montre un maximum d'ellipticité à 190 nm et deux minima à 208 et 222 nm caractéristiques des protéines fortement hélicoïdales. Sur la base de l'ellipticité à 222 nm, le taux d'hélices α calculé par la méthode de Greenfield et Fasman est égal à $79 \pm 7\%$.²⁵² Cette valeur expérimentale est en complet accord avec les données de la littérature et valide

l'ensemble du procédé de synthèse de la 9-GN. Associée à l'analyse UPLC-MS présentée en Figure 37, l'analyse par dichroïsme circulaire atteste de la qualité de l'échantillon de 9-GN produit par synthèse chimique.

1.1.3. Activité biologique

Ici encore, la fonctionnalité de la protéine synthétique a été testée pour son activité chimiotactique. La migration de monocytes purifiés du sang de donneurs en présence de 9-GN synthétique est montrée en Figure 39.

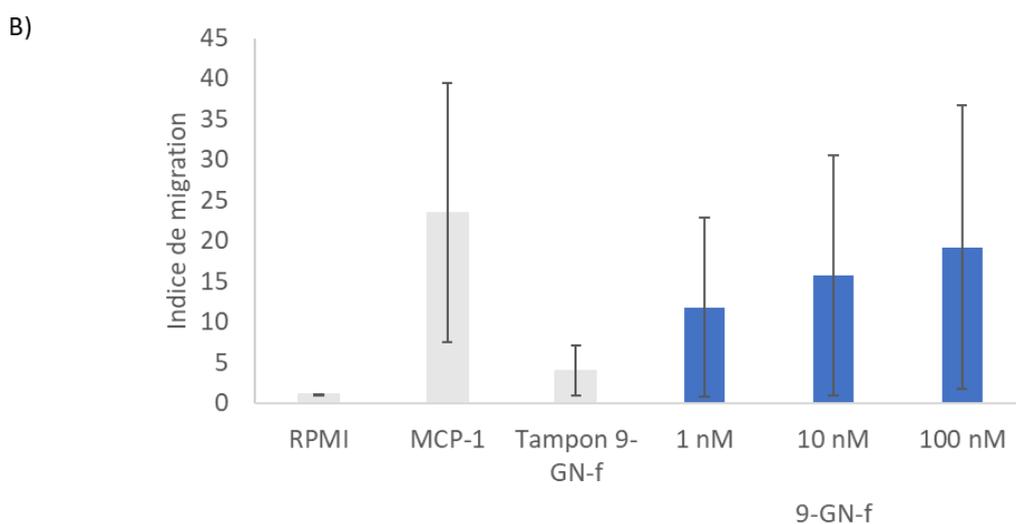
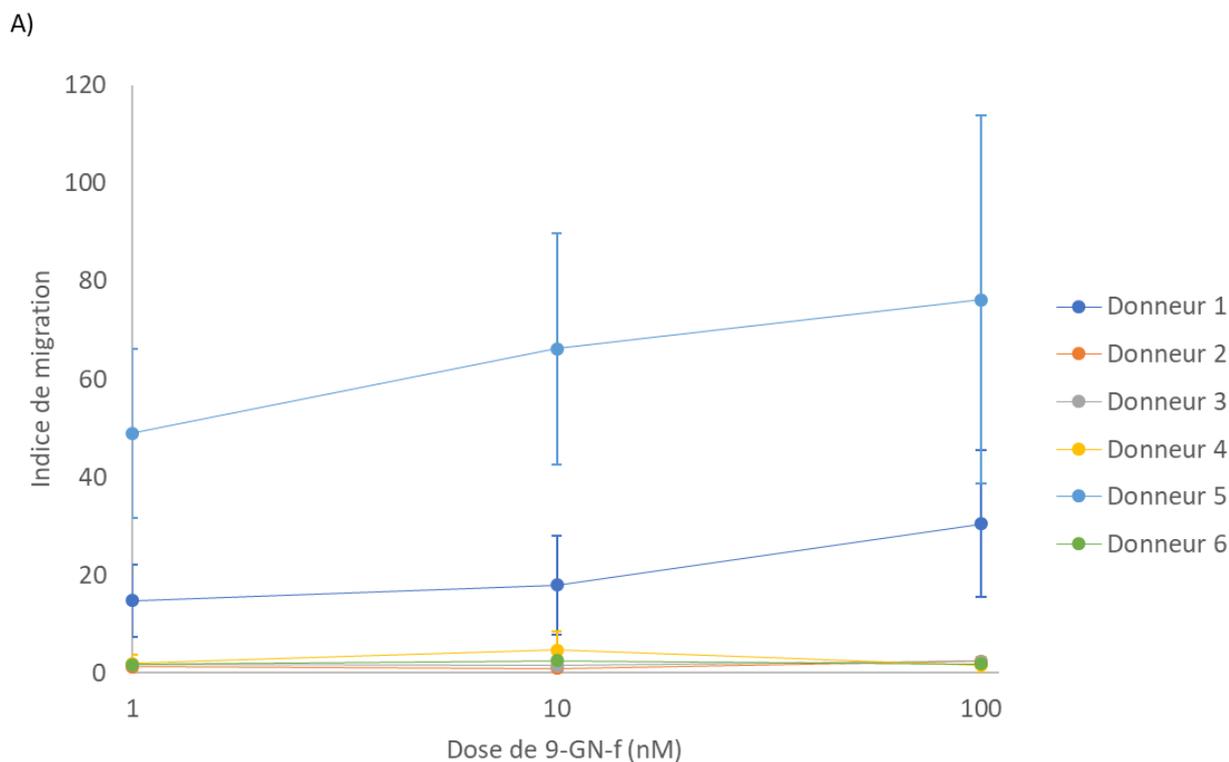


Figure 39. Activité chimiotactique de **9-GN-f** sur des monocytes primaires après 1 heure d'incubation. Les données sont exprimées par rapport à la migration observée dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté par 0.1% de sérum de veau fœtal. A) Dose-réponse (0-100 nM) pour 6 donneurs. Les expériences ont été répétées 9 fois et les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm écart type. B) Moyenne de l'indice de migration pour chaque dose. MCP-1 est utilisé comme contrôleur positif à 23 nM.

Dans les conditions de l'essai, la réponse à la protéine **9-GN-f** se traduit par un fort indice de migration des monocytes pour une dose allant de 1 à 100 nM. En plus de montrer la fonctionnalité biologique de **9-GN-f**, cette expérience valide également l'ensemble du procédé de synthèse chimique de la granulysine 15 kDa et de ses analogues. Appliqué à la

synthèse de la 9-GN, il permet d'accéder à une protéine capable d'attirer des monocytes dans la même gamme de concentration que la 9-GN produite dans des systèmes recombinants.

Toutefois, les résultats de chimiotaxie varient fortement en fonction du donneur ce qui se traduit par une erreur importante sur l'indice de migration moyen présenté en Figure 39 B. La comparaison de nos résultats avec les données de la littérature s'avère également difficile au-delà de la simple appréciation qualitative de l'action chimiotactique de **9-GN-f**. Deng *et al.* ne rapportent l'activité de la 9-GN recombinante que sur des monocytes isolés du sang d'un unique donneur. Les auteurs rapportent cependant une activité chimiotactique de la 9-GN recombinante sur plusieurs lignées monocytiques comme les cellules THP-1 ou U-937. Une évaluation de la capacité de **9-GN-f** à induire la migration de ces lignées s'avèrerait donc intéressante et permettrait de dégager un point de comparaison solide avec des résultats déjà rapportés. L'issue positive d'une telle expérience achèverait de valider la fonctionnalité de **9-GN-f**.

1.2. Synthèse de l'extrémité N-terminale de la 15-GN (N-ter_{15-GN})

L'extrémité N-terminale propre à la 15-GN s'étire du résidu Arg23 au résidu Leu62. Il s'agit donc d'un peptide de 40 résidus portant le motif Cys-Pro-Cys (43-45) dont nous avons commencé à explorer les propriétés au chapitre précédent. Sa synthèse peut être envisagée à partir du segment **A₁** déjà produit pour l'assemblage de la 15-GN et d'un segment **A₂** tronqué de ses 4 derniers résidus (**A₂-Nter**, Figure 40 A).

L'assemblage de ces deux segments consiste en une seule étape de ligation SEA (Figure 40 B). Le groupement SEA n'est ici pas converti en thioester d'alkyle avant la ligation. Il est directement déplacé par la cystéine N-terminale du segment **A₂-Nter**. Cette réaction est conduite à pH 5,5 en présence de TCEP et de MPAA. La température du milieu réactionnel est ici encore maintenue à 4 °C pour empêcher les réactions secondaires d'épimérisation de la sérine C-terminale du segment **A₁**. Le peptide **N-ter_{15-GN}** est isolé avec un rendement de 36% après purification (Figure 41).

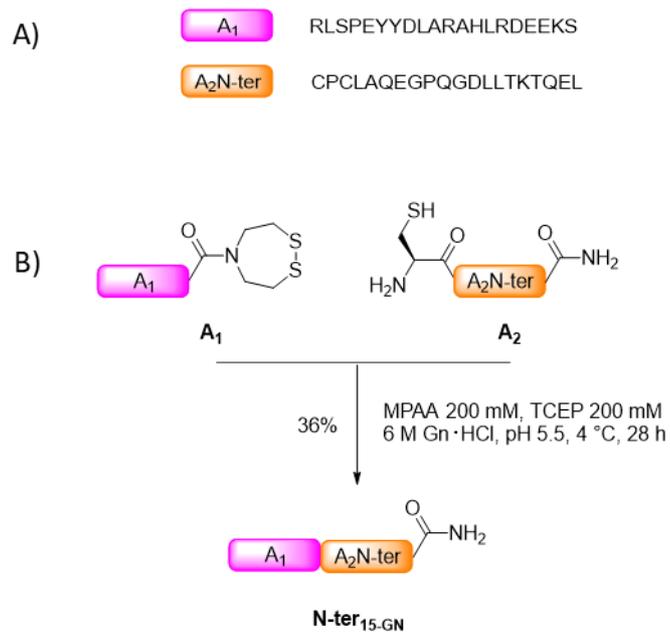


Figure 40. Synthèse chimique de **N-ter_{15-GN}**. A) Découpage de la séquence de la **N-ter_{15-GN}**. B) Assemblage des deux segments par ligation SEA.

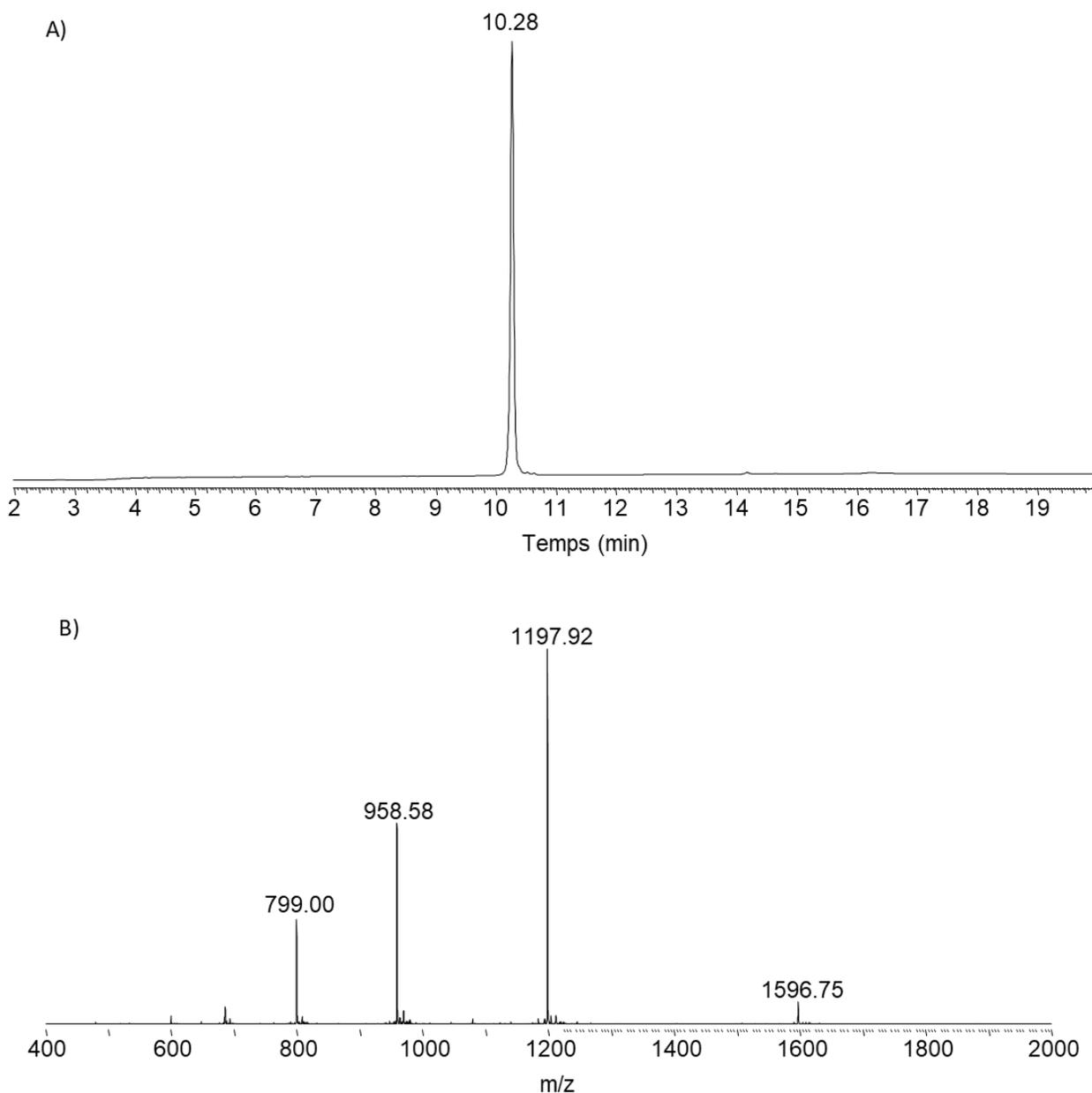


Figure 41. Analyse UPLC-MS du peptide **N-ter₁₅-GN**. A) Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. B) Trace MS : m/z 1596.75 ([M+3H]³⁺), 1197.92 ([M+4H]⁴⁺), 958.58 ([M+5H]⁵⁺), 799.00 ([M+6H]⁶⁺); calculé pour [M] (moyenne) : 4787.37, trouvé : 4787.47.

Lors de l'étude du repliement de la 15-GN, nous avons montré que la forme repliée majoritaire dans le mélange **15-GN-f** dispose d'un pont disulfure cyclisant la triade Cys43-Pro44-Cys45. Par conséquent, il apparaît logique de conduire l'étude structurale et fonctionnelle du peptide **N-ter₁₅-GN** lui aussi oxydé. L'oxydation contrôlée du peptide est également un avantage pour sa conservation. Forcer dès à présent la formation de ce disulfure empêchera la formation de produits d'oxydation non désirés. Si l'étude de ce peptide sous forme réduite venait à être

envisagée, le disulfure liant les cystéine 43 et 45 pourrait être facilement ouvert par l'action d'un agent réducteur fort comme la TCEP. Le peptide **N-ter₁₅-GN** est donc oxydé à l'iode en milieu acide puis purifié par HPLC (**N-ter₁₅-GN-f**, Figure 42, Figure 43).

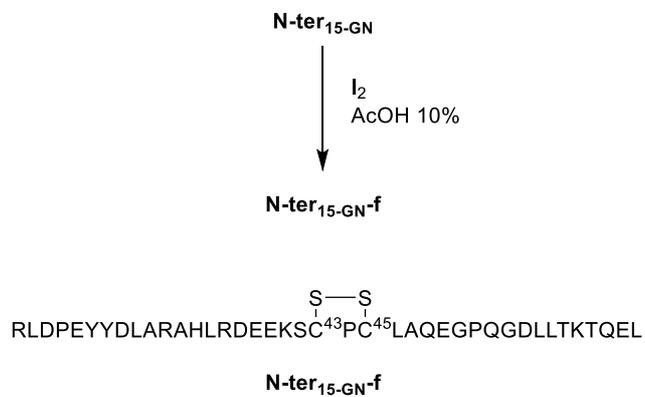


Figure 42. Oxydation du peptide *N-ter₁₅-GN*

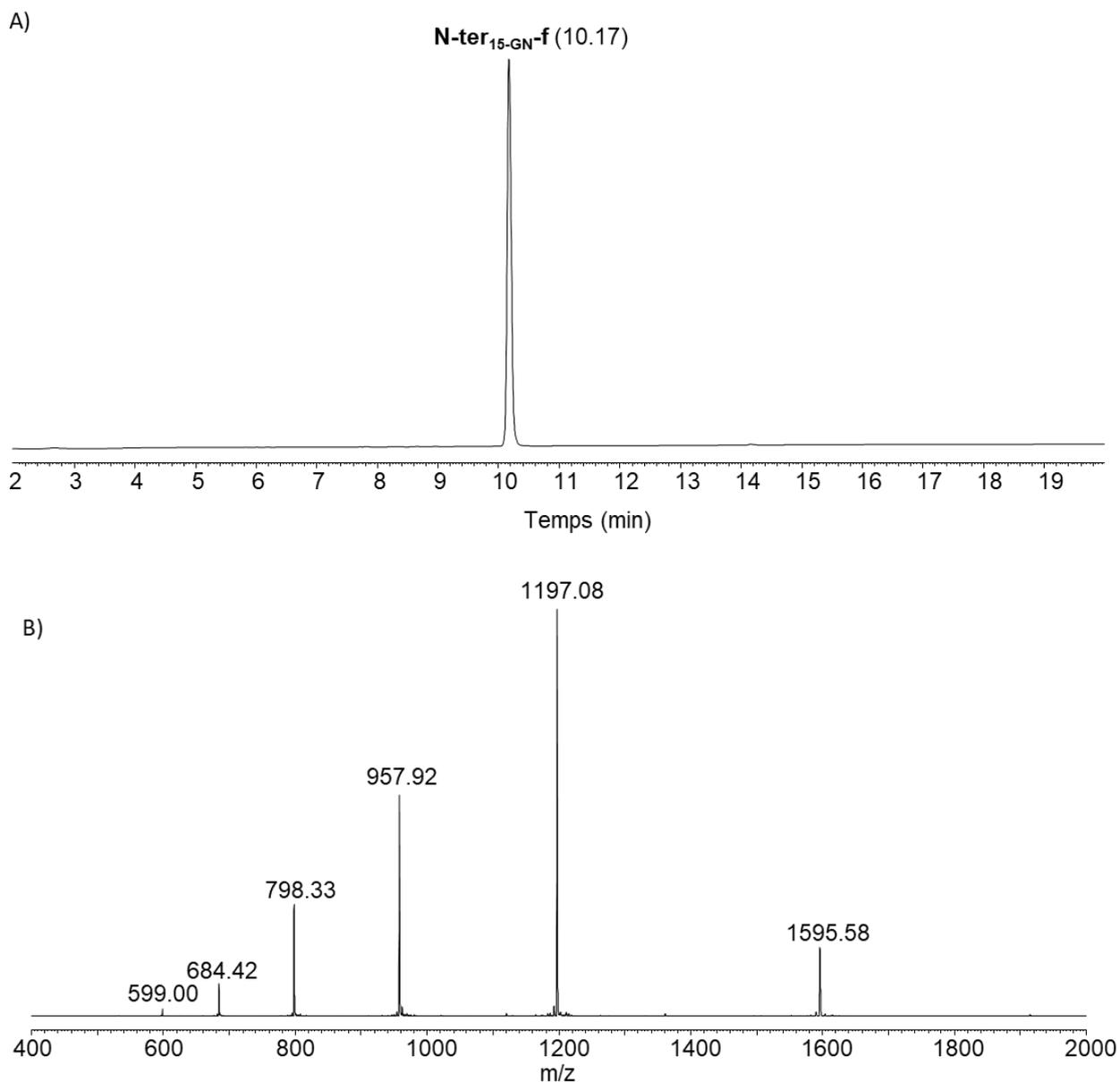


Figure 43. Analyse UPLC-MS du peptide **N-ter_{15-GN-f}**. A) Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. B) Trace MS : m/z 1595.58 ([M+3H]³⁺), 1197.08 ([M+4H]⁴⁺), 957.92 ([M+5H]⁵⁺), 798.33 ([M+6H]⁶⁺); calculé pour [M] (moyenne) : 4785.37, trouvé : 4784.17.

1.3. Synthèse de l'extrémité C-terminale de la 15-GN (C-ter_{15-GN})

L'extrémité C-terminale de la 15-GN s'étire des résidus Leu137 à Leu145 et représente donc un court peptide amide de 9 résidus. Sa synthèse est réalisée par Fmoc-SPPS et le peptide **C-ter_{15-GN}** est obtenu avec un rendement de 40% après purification (Figures S 16 et S 17, Annexe 1).

1.4. Etude en dichroïsme circulaire

L'accès à ces trois premiers fragments de la 15-GN (**9-GN-f**, **N-ter_{15-GN-f}** et **C-ter_{15-GN}**) permet d'envisager une étude en dichroïsme circulaire pour tester notre modèle structural pour la 15-GN. Grâce à lui, nous avons formulé l'hypothèse que la 15-GN se structure en un cœur saposin-like compact formé de 5 hélices α . A cette structure centrale fortement organisée, viennent s'ajouter les extrémités N- et C-terminales qui elles ne présentent pas de structures secondaires de type hélice α ou brin β .

Nous avons donc comparé le spectre de dichroïsme circulaire de **15-GN-f** à la somme pondérée des spectres de la 9-GN et des extrémités N- et C-terminales acquis séparément. En effet, de la même manière que le spectre de dichroïsme circulaire d'une protéine peut être considéré comme une combinaison linéaire des spectres caractéristiques des différentes structures secondaires, il peut également être considéré la combinaison linéaire des spectres des différents domaines d'une protéine pris séparément. Ces domaines doivent toutefois être indépendant et ne pas s'influencer mutuellement dans la protéine complète. Ainsi, en pondérant chacun des spectres de chacun des domaines par le poids qu'il représente dans la séquence de la protéine entière, nous pouvons tenter de reconstituer un spectre pour la 15-GN et le comparer au spectre expérimental. Si les deux spectres concordent, il est ensuite possible d'identifier quel domaine de la séquence porte en majorité les structures secondaires.

N-ter_{15-GN-f} et **C-ter_{15-GN}** purifiés par HPLC sont respectivement solubilisées à 14,1 et 89,5 μM dans un tampon phosphate 10 mM à pH 7,2. La moyenne de trois spectres enregistrés à 25 °C entre 185 et 260 nm par pas de 1 nm est présentée en Figure 44 A et B. Les spectres des protéines **15-GN-f** et **9-GN-f** sont également reportés en Figure 44 C et D respectivement.

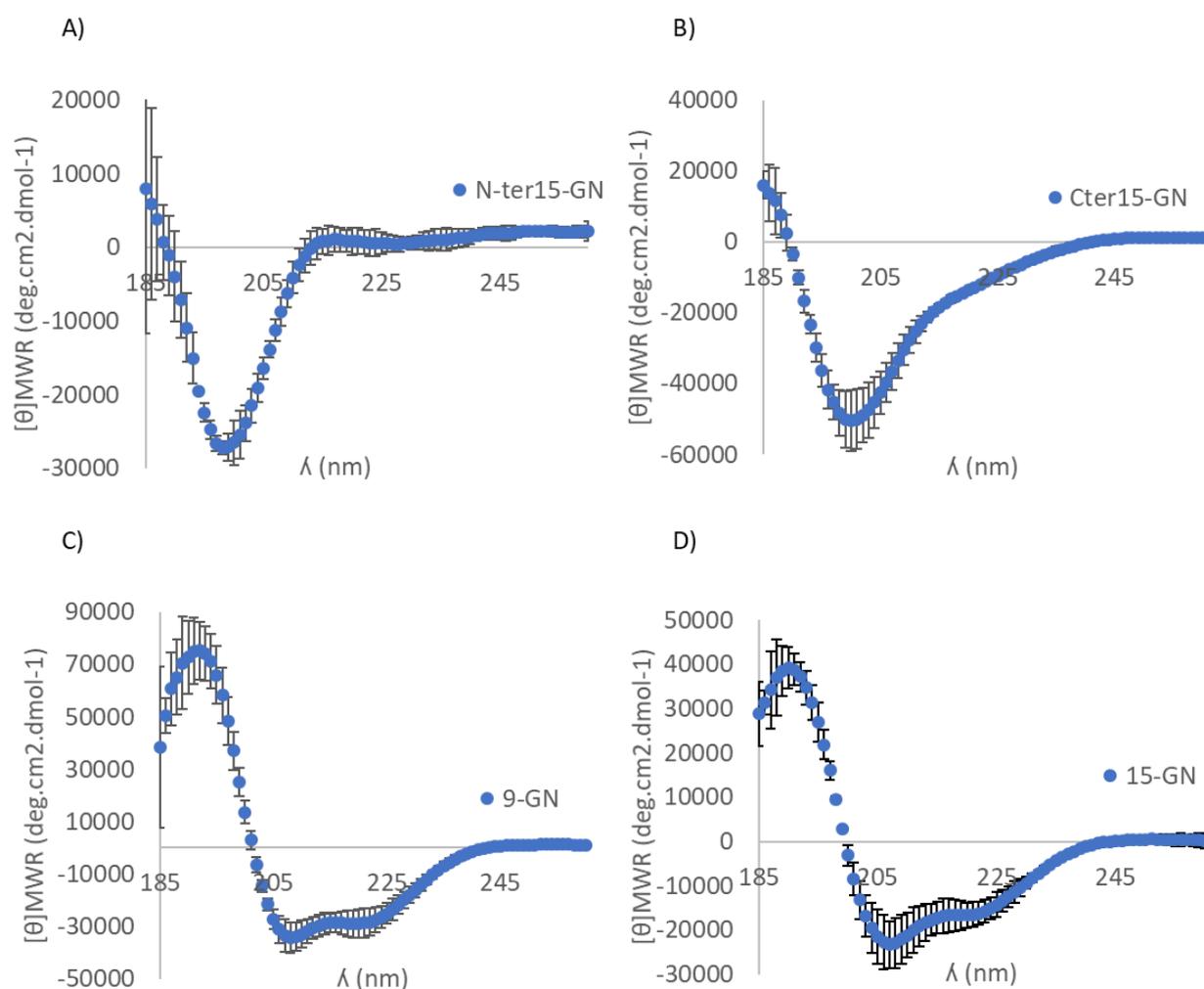


Figure 44. A) Spectre de dichroïsme circulaire de **N-ter₁₅-GN-f**. **N-ter₁₅-GN-f** est dissout à 14,1 μM dans un tampon phosphate à 10 mM et à pH 7,2. Le spectre est enregistré à 25 °C entre 185 et 260 nm par pas de 1 nm. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% calculé à partir de trois réplicats. B) Spectre de dichroïsme circulaire de **C-ter₁₅-GN**. **C-ter₁₅-GN** est dissout à 89,5 μM dans un tampon phosphate à 10 mM et à pH 7,2. Le spectre est enregistré à 25 °C entre 185 et 260 nm par pas de 1 nm. Les barres d'erreurs représentent l'intervalle de confiance à 95% calculé à partir de trois réplicats. C) Spectre de dichroïsme circulaire de **9-GN-f**. D) Spectre de dichroïsme circulaire de **15-GN-f**.

Les spectres de **N-ter₁₅-GN-f** et **C-ter₁₅-GN** montrent tous deux des profils caractéristiques de peptides désordonnés. Les valeurs d'ellipticité à 190 nm étant exclusivement négatives pour les deux peptides, la présence de structures ordonnées comme des hélices α ou des brins- β est peu probable. La déconvolution des spectres par le serveur Dichroweb fournit d'ailleurs une contribution égale à $(-1 \pm 3)\%$ des hélices α dans **N-ter₁₅-GN-f**.

N-ter_{15-GN-f}, **9-GN-f** et **C-ter_{15-GN}** représente respectivement 40, 74 et 9 résidus des 123 que compte la séquence de la 15-GN. Une reconstitution du spectre de la 15-GN à partir des spectres de ces trois domaines peut être réalisée grâce à la combinaison linéaire suivante.

$$Spectre_{15-GN} = \frac{40}{123} \times Spectre_{N-ter_{15-GN}} + \frac{74}{123} \times Spectre_{9-GN} + \frac{9}{123} \times Spectre_{C-ter_{15-GN}}$$

L'intervalle de confiance à 95% associé à ce spectre reconstruit est calculé comme suit.

$$IC_{95\%} = \left[\bar{x} - \frac{t_{0.95} \times \sigma}{\sqrt{n}}; \bar{x} + \frac{t_{0.95} \times \sigma}{\sqrt{n}} \right]$$

Pour la moyenne \bar{x} observée avec l'écart type σ sur un échantillon de taille n .

D'où,

$$IC_{95\%} = \left[\bar{x} - \frac{4,3 \times \sigma}{\sqrt{3}}; \bar{x} + \frac{4,3 \times \sigma}{\sqrt{3}} \right]$$

Avec,

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{40}{123}\right)^2 \times Var_{N-ter_{15-GN}} + \left(\frac{74}{123}\right)^2 \times Var_{9-GN} + \left(\frac{9}{123}\right)^2 \times Var_{C-ter_{15-GN}}}$$

Et,

$$Var = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Le tracé de ce spectre calculé est présenté en Figure 45 superposé au spectre expérimental de la 15-GN.

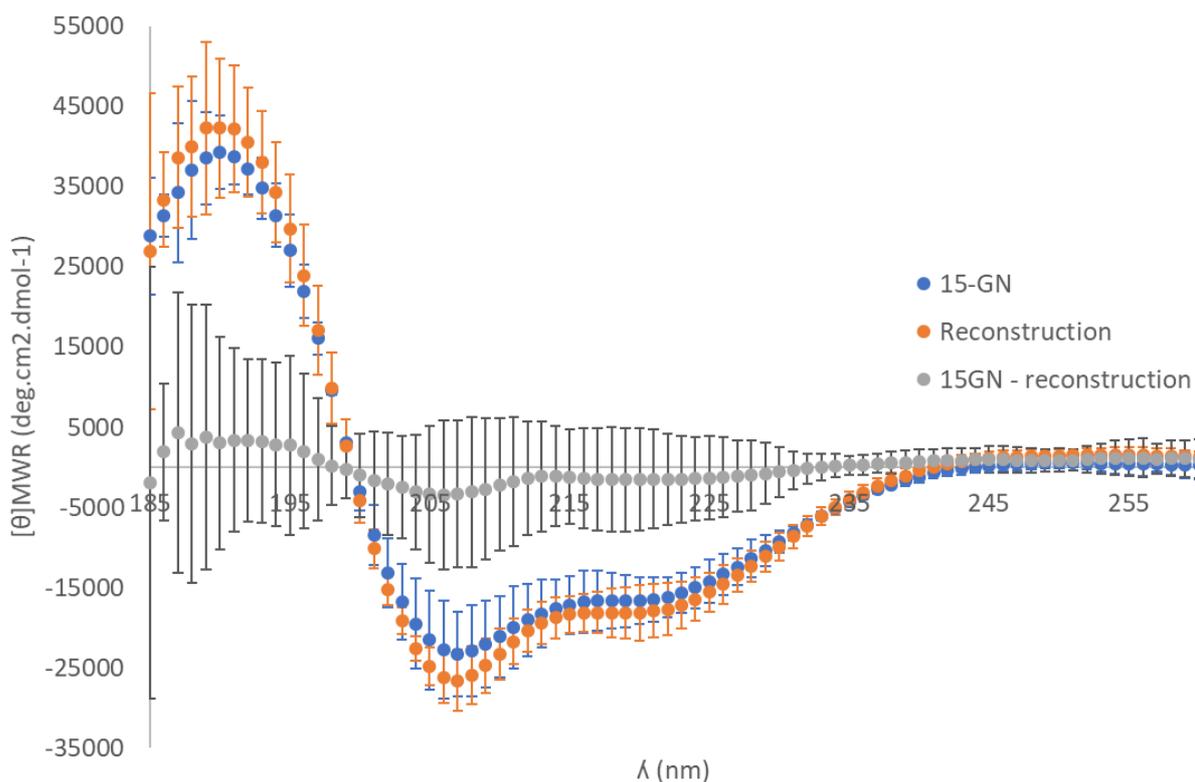


Figure 45. Comparaison du spectre de dichroïsme circulaire de la 15-GN reconstruit à partir des spectres de N-ter15-GN-f, 9-GN-f et C-ter15-GN-f avec le spectre expérimental de 15-GN-f. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%

Les courbes reconstruites et expérimentales sont très proches et la courbe grise représentant la soustraction des deux spectres oscille faiblement autour de 0. En tout point, le spectre calculé s'inclue dans l'intervalle de confiance à 95% du spectre expérimental montrant ainsi la pertinence de notre approche de reconstitution du spectre de la 15-GN par combinaison linéaire.

En conclusion, l' α -hélicité de la 15-GN peut être considérée comme la somme des α -hélicités de N-ter_{15-GN-f}, de 9-GN-f et de C-ter_{15-GN}. Les deux extrémités N- et C-terminales ne disposant pas d'hélices α , l'intégralité des structures secondaires est donc portée par le domaine 9-GN. De plus, l' α -hélicité déterminée expérimentalement pour la 9-GN synthétique est en accord avec les données de cristallographie présentes dans la littérature et montrant la structuration de cette protéine en un domaine saposin-like de 5 hélices α . Tous considérés, ces résultats montrent que la structure tridimensionnelle de la 15-GN peut être résumée à cœur saposin-like compact de structure tout à fait analogue à l'isoforme 9-GN. Autour de ce domaine central

organisé, s'articulent des extrémités N- et C-terminales propres à la 15-GN et dépourvues de structures secondaires.

1.5. Activités biologiques

1.5.1. Comparaison des activités chimiotactique de **15-GN-f**, **9-GN-f** et **N-ter_{15-GN-f}**

En raison de sa faible taille et donc de sa faible contribution à la séquence de la 15-GN, l'activité biologique de **C-ter_{15-GN}** n'a pas été évaluée. L'activité chimiotactique de **N-ter_{15-GN-f}** a, quant à elle, été testée dans les mêmes conditions que lors des caractérisations de **9-GN-f** et **15-GN-f**. Les résultats pour 6 donneurs de monocytes sont présentés en Figure 46 et l'indice de migration moyen est présenté avec ceux de **15-GN-f** et **9-GN-f** en Figure 46 B.

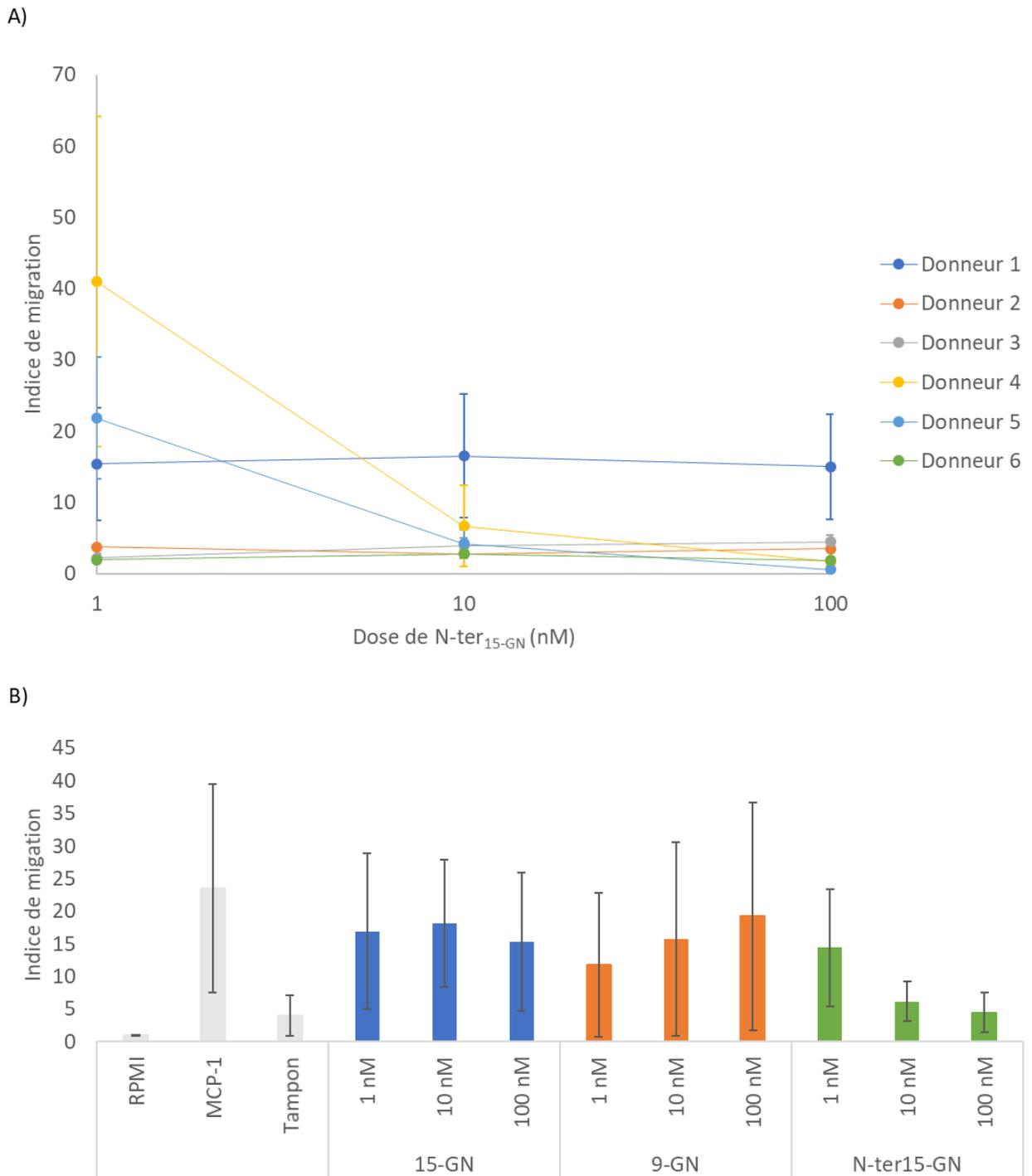


Figure 46. Activité chimiotactique de **N-ter15-GN-f** sur des monocytes primaires après 1 heure d'incubation. Les données sont exprimées par rapport à la migration observée dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté par 0.1% de sérum de veau fœtal. A) Dose-réponse à **N-ter15-GN-f** (0-100 nM) pour 6 donneurs. Les expériences ont été répétées 9 fois et les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm écart type. B) Moyenne de l'indice de migration pour chaque dose de **15-GN-f**, **9-GN-f** et **N-ter15-GN-f**. MCP-1 est utilisé comme contrôle positif à 23 nM.

Ces résultats montrent que le peptide **N-ter15-GN-f** correspondant aux résidus Arg23-Leu62 semble lui aussi doté d'une activité chimiotactique envers les monocytes. Bien qu'elle n'ait pu

être évaluée que sur un petit nombre de donneurs, l'activité chimiotactique de **N-ter₁₅-GN-f** paraît s'exprimer à des concentrations bien plus faibles que celles observées pour la 15 et la 9-GN.

De manière intéressante, nous observons un décalage de la valeur maximale de l'indice de migration vers les hautes concentrations nanomolaires dans le cas de la 9-GN. À l'inverse, l'indice de migration maximal pour **N-ter₁₅-GN-f** est obtenu pour la concentration de 1 nM. L'activité de la 15-GN est quant à elle maximale pour la dose intermédiaire de 10 nM laissant ainsi supposer une contribution importante des résidus 23 à 62 dans l'activité chimiotactique de la 15-GN sur les monocytes. Pour le confirmer, de nouveaux essais de chimiotaxie pourraient être entrepris à des concentrations inférieures à 1 nM et supérieures à 100 nM. Il s'agirait de déterminer la dose pour laquelle la réponse à **9-GN-f** et à **N-ter₁₅-GN-f** est maximale et de confirmer un effet chimiotactique de **N-ter₁₅-GN-f** à très faible concentration.

1.5.2. Comparaison des activités immunomodulatrices de 15-GN-f, 9-GN-f et N-ter₁₅-GN-f

Dans notre recherche de nouvelles activités de la granulysine 15 kDa, nous avons souhaité évaluer son activité immunomodulatrice sur les macrophages humains. Dans leurs travaux, Tewary *et al.* se sont appuyés sur l'activation de macrophages murins pour mettre en avant l'implication du récepteur TLR4 dans la réponse à la 15-GN. Or la granulysine 15 kDa n'est pas présente chez la souris et aucun résultat d'immunomodulation sur des macrophages humains par cette protéine n'a été rapporté à ce jour.

Pour tenter d'apporter un éclairage sur cette fonction potentielle de la 15-GN, nous avons quantifié l'expression des cytokines proinflammatoires IL-8 et IP-10 chez des macrophages M1 (proinflammatoires) et M2 (antiinflammatoire) en réponse à **15-GN-f** et aux premiers analogues synthétisés. L'interleukine-8 est une chimiokine produite par une grande variété de cellules sanguines ou tissulaires. Elle est notamment connue pour recruter et activer les neutrophiles au site d'une infection.²⁶³ L'IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10 ou CXCL10) est une chimiokine connue pour recruter et activer les leucocytes comme les lymphocytes T, les

²⁶³ Bickel, M. *J Periodontol.* **1993**, *64*, 456-460.

éosinophiles, les monocytes ou les cellules NK.²⁶⁴ Le résultat du dosage par ELISA de ces deux protéines dans les surnageants de macrophages M1 et M2 dérivant des monocytes d'au moins 3 donneurs stimulés ou non par le LPS et incubés 24 h avec chacun des analogues est présenté en Figure 47.

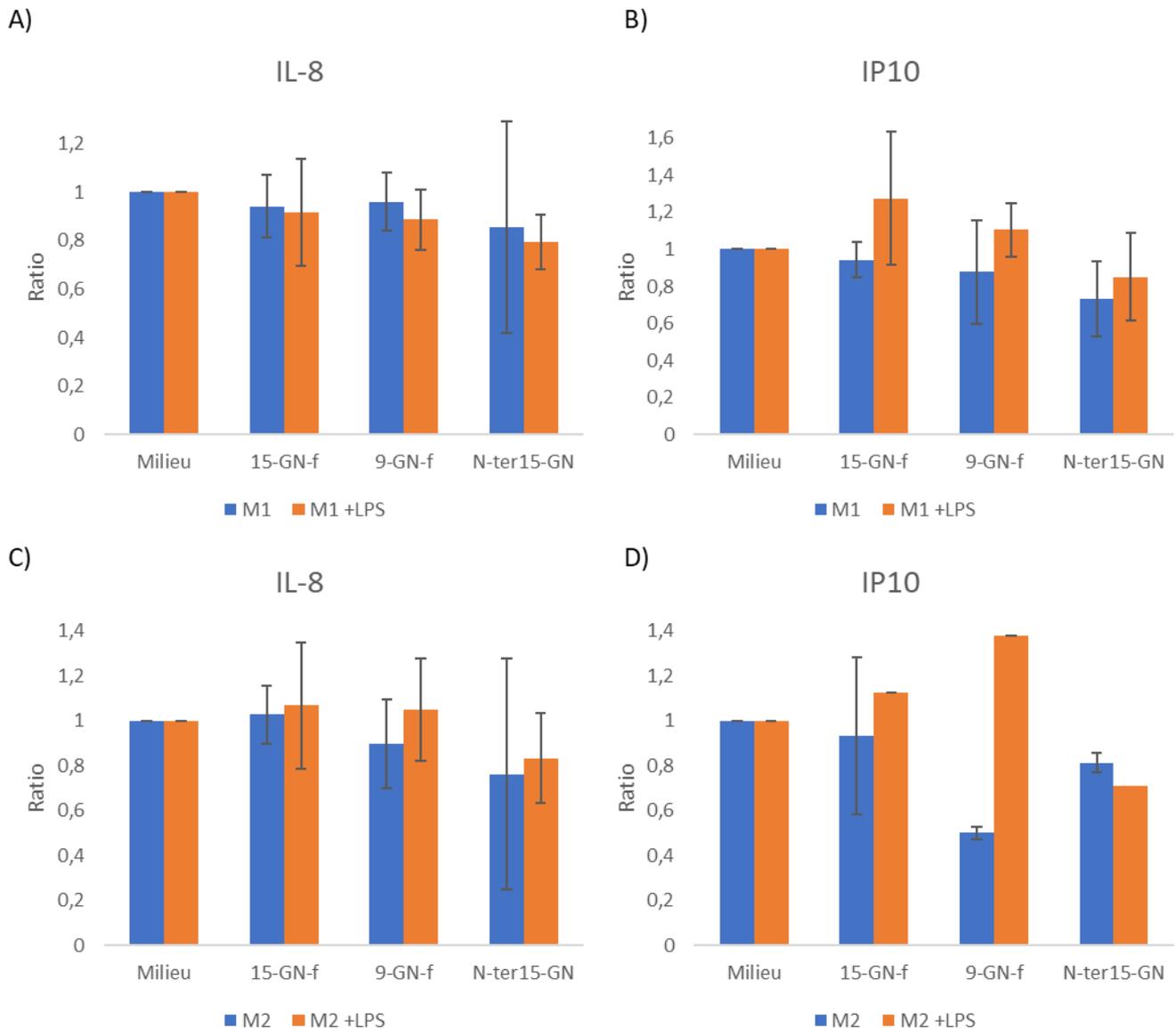


Figure 47. Expression des chimiokines IL-8 et IP-10 par des macrophages M1 et M2 dérivant de monocytes humains purifiés activés ou non par le LPS après 24 h d'incubation avec 10 nM de **15-GN-f**, **9-GN-f** ou **Nter15-GN-f**. Les données sont exprimées par rapport à l'expression dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal et contenant des antibiotiques. La moyenne d'au moins trois réplicats est ici présentée sauf pour l'expression d'IP-10 par les macrophages M2 activés au LPS (une seule valeur) A) Ratio de l'expression d'IL-8 par les macrophages M1 activés ou non au LPS. B) Ratio de l'expression d'IP-10 par les macrophages M1 activés ou non au LPS. C) Ratio de l'expression d'IL-8 par les macrophages M2 activés ou non au LPS. D) Ratio de l'expression d'IP-10 par les macrophages M2 activés ou non au LPS.

²⁶⁴ Vazirinejad, R.; Ahmadi, Z.; Kazemi Arababadi, M.; Hassanshahi, G.; Kennedy, D. *Neuroimmunomodulation* **2014**, *21*, 322-330.

De manière tout à fait intéressante, la granulysine native **15-GN-f** n'a qu'un très faible effet sur la production de ces deux chimiokines par les macrophages M1 et M2. En revanche, la quantité d'IP-10 dans le surnageant de ces mêmes cellules traitées par la 9-GN est significativement inférieure. La 9-GN pourrait donc être dotée d'une activité de régulation négative des macrophages M1 et M2. Cette activité n'est pas partagée par les deux isoformes et s'avère donc particulièrement utile pour comprendre le rôle de l'extrémité N-terminale N-ter_{15-GN}. Les mêmes dosages conduits sur des surnageants de macrophages traités par **N-ter_{15-GN-f}** montrent également une activité d'immunomodulation négative de ces cellules. L'effet est observable pour les deux chimiokines et les quantités d'IP-10 exprimées sont d'ailleurs bien inférieures à celles observées lors du traitement par la 9-GN.

La tendance d'une modulation négative par N-ter_{15-GN} se confirme également lorsque les macrophages M1 et M2 sont également traités par le LPS. Le LPS est un composant majeur de la membrane externe des bactéries Gram négatives bien connu pour mimer l'effet d'une infection.²⁶⁵ Dans ces conditions, **N-ter_{15-GN-f}** permet encore une réduction significative des quantités d'IL-8 et d'IP-10 produites par les macrophages M1 et M2 alors que l'effet de la 15-GN n'est pas significatif. Qu'il s'agisse des macrophage M1 ou M2, le léger effet inhibiteur observé en réponse à 10 nM de **9-GN-f** et sans activation n'est plus observable lorsqu'ils sont activés par le LPS. Notons ici qu'il est impossible de commenter l'effet de régulation positive de l'expression d'IP-10 après le traitement par **9-GN-f** des macrophages M2 activés. À ce stade, l'expérience n'a pas pu être répétée.

Avec les données de chimiotaxie précédemment discutées, ces résultats suggèrent que le peptide correspondant à l'extrémité N-terminale de la 15-GN est doté d'une activité biologique propre. Il ne s'agit là que de résultats préliminaires mais il n'est pas à exclure que sa séquence porte des déterminants moléculaires lui permettant de jouer un rôle dans le recrutement et l'activation/inhibition de cellules immunitaires soit en tant que molécule propre, soit en tant que constituant de la séquence de la 15-GN. Son activité chimiotactique s'avère d'ailleurs particulièrement intéressante puisqu'elle semble s'exprimer à très faible

²⁶⁵ Yücel, G.; Zhao, Z.; El-Batrawy, I.; Lan, H.; Lang, S.; Li, X.; Buljubasic, F.; Zimmermann, W. H.; Cyganek, L.; Utikal, J.; Ravens, U.; Wieland, T.; Borggreffe, M.; Zhou, X. B.; Akin, I. *Sci Rep* **2017**, *7*, 2935.

concentration. D'autant que nous avons clairement établi que ce domaine de la 15-GN n'était pas ou peu structuré et qu'il est accessible au solvant selon notre modèle structurale. Tout ceci va dans le sens de possibles interactions entre ce domaine de la 15-GN et son environnement.

Ces premiers essais de caractérisation de l'activité immunomodulatrice des 9- et 15-GN sur les macrophages représentent une étape importante vers une meilleure compréhension des fonctions de ces deux protéines dans la réponse immunitaire. Parmi les deux isoformes, la 9-GN semble disposer d'une activité d'inhibition des macrophages proinflammatoires et antiinflammatoires. Face à cela, la 15-GN ne présente pas d'activité immunomodulatrice significative sur ces populations cellulaires. Il s'agit par conséquent d'une activité importante pour espérer comprendre les différences de fonction et de mode d'action des deux isoformes. Pour cela, il conviendrait d'étudier plus en profondeur cette fonction en quantifiant par exemple l'expression d'autres cytokines en réponse à la granulysine et en traçant également des courbes de dose-réponse. Nous pourrions également observer l'effet des granulysines 9 et 15 kDa sur l'expression de récepteurs liés à la réponse immunitaire comme les récepteurs CD16 ou CD64 impliqués dans la reconnaissance de complexes immuns ou encore les protéines impliquées dans la présentation d'antigènes peptidiques comme les protéines membranaires de la famille HLA. Ceci s'accompagnerait également de la multiplication du nombre de donneurs afin de dégager des résultats statistiquement pertinents.

2. Synthèse et caractérisation d'analogues pour l'étude du repliement de la 15-GN et de l'implication des cystéines dans sa structure et ses fonctions.

Dans le paragraphe précédent, nous avons discuté les premiers résultats indiquant que l'extrémité N-terminale de la 15-GN serait dotée d'activités chimiotactiques et immunomodulatrices propres. C'est d'ailleurs parmi ces 40 résidus N-terminaux que se situe le motif Cys43-Pro44-Cys45 dont nous avons déjà discuté lors du repliement de la 15-GN synthétique. Ce motif est en effet responsable de la pluralité des formes repliées observées. Pour rappel, dans les conditions optimales de repliement, deux formes repliées **15-GN-f1** et **15-GN-f2** sont principalement obtenues. La première, minoritaire, se caractérise par un motif CPC ouvert et dont l'une des deux cystéines est liée par pont disulfure à la cystéine 138. La forme majoritaire **15-GN-f2** dispose quant à elle d'un pont disulfure reliant les cystéines 43 et 45. Ces deux formes repliées ont d'ailleurs été obtenues après une étape de dialyse fortement oxydante dans le but de forcer la formation du lien disulfure. La proximité des cystéines 43 et 45 conduit de facto à la formation d'un pont disulfure contraint et donc facilement réductible en présence d'autres thiols. À ce titre, ce lien pourrait conférer à la protéine des propriétés redox particulières. D'autant que nous avons observé la dimérisation de la protéine lors du repliement et l'observation du même phénomène lors de l'étude sur un peptide modèle laisse supposer que la dimérisation pourrait intervenir au niveau du motif CPC. Enfin le repliement de la 9-GN s'est avéré beaucoup plus long que celui de la 15-GN. La 9-GN étant dépourvue de ce motif, l'activité redox particulière du motif CPC pourrait donc avoir un rôle à jouer dans le repliement de la granulysine.

À ce stade, il apparaît crucial de s'attacher à caractériser plus en profondeur le repliement de la 15-GN pour mieux comprendre son comportement et sonder ses propriétés redox. Cela passe nécessairement par une meilleure évaluation du rôle du motif CPC ainsi que de la contribution des autres cystéines de sa séquence. Mieux comprendre le repliement de la 15-GN permet également d'entrevoir la possibilité de la produire sous une forme repliée unique dont la structure et l'activité pourraient être plus facilement caractérisées. Par ailleurs, les propriétés redox de la 15-GN sont à rapprocher de son activité biologique. En effet, notre

modèle structural prévoit que la triade CPC se trouve en surface de la protéine, exposée à son environnement, et pourrait donc être impliquée dans les processus de reconnaissance moléculaire qui mènent aux activités de la 15-GN. Ce sont autant de réflexions qui ont guidé la synthèse des trois analogues présentée ici.

2.1. Synthèse et caractérisation de la granulysine 15 kDa Y66C (15-GN_{Y66C})

2.1.1. Synthèse et repliement

Comme nous l'avons évoqué au chapitre 3, plusieurs études ont mis en avant de fortes similitudes entre la granulysine et la NK-lysine porcine. Ce sont toutes deux des protéines fortement cationiques produites par les lymphocytes cytotoxiques puis stockées dans des granules et leurs activités biologiques sont similaires.¹³⁵ La 15-GN et la NK-lysine possèdent 43% de résidus identiques et 67% de similitude entre résidus.

Lors de la présentation du modèle structural généré par I-TASSER suite, nous avons noté la proximité spatiale entre la Cys138 de la 15-GN et la Tyr66. Dans la séquence de la NK-lysine, la position 66 est occupée par une cystéine. Or, nous avons jusqu'ici clairement établi que l'hétérogénéité du repliement de la 15-GN provenait du nombre impair de cystéines dont elle dispose. Apparier la Cys138 pourrait donc permettre de simplifier le profil de repliement de la 15-GN. En conséquence, nous avons entrepris la synthèse d'un analogue de la 15-GN muté en position 66 par une cystéine.

15-GN_{Y66C} a été assemblé selon le même procédé que celui précédemment appliqué à la synthèse des 15- et 9-GN (Figure 48). Sa synthèse fait intervenir les segments **A₁** (23-42), **B** (69-106) et **C** (107-136) déjà synthétisés ainsi que le segment **A₂Y66C** (43-68). L'ajout d'une cystéine supplémentaire dans la séquence n'a ni compliqué la production du segment **A₂** par Fmoc-SPPS, ni impacté le déroulement des étapes de ligation. Le polypeptide linéaire **15-GN_{Y66C}-I** a été isolé avec un rendement de 5,4% (Figure 49).

- A)
- A₁ RLSPEYYDLARAHLRDEEKS
 - A₂Y66C CPCLAQEGPQGDLLTKTQELGRD**C**RT
 - B CLTIVQKLKMKVDKPTQRSVSNAAATRVCRTRGRSRWRDV
 - C CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTGPL

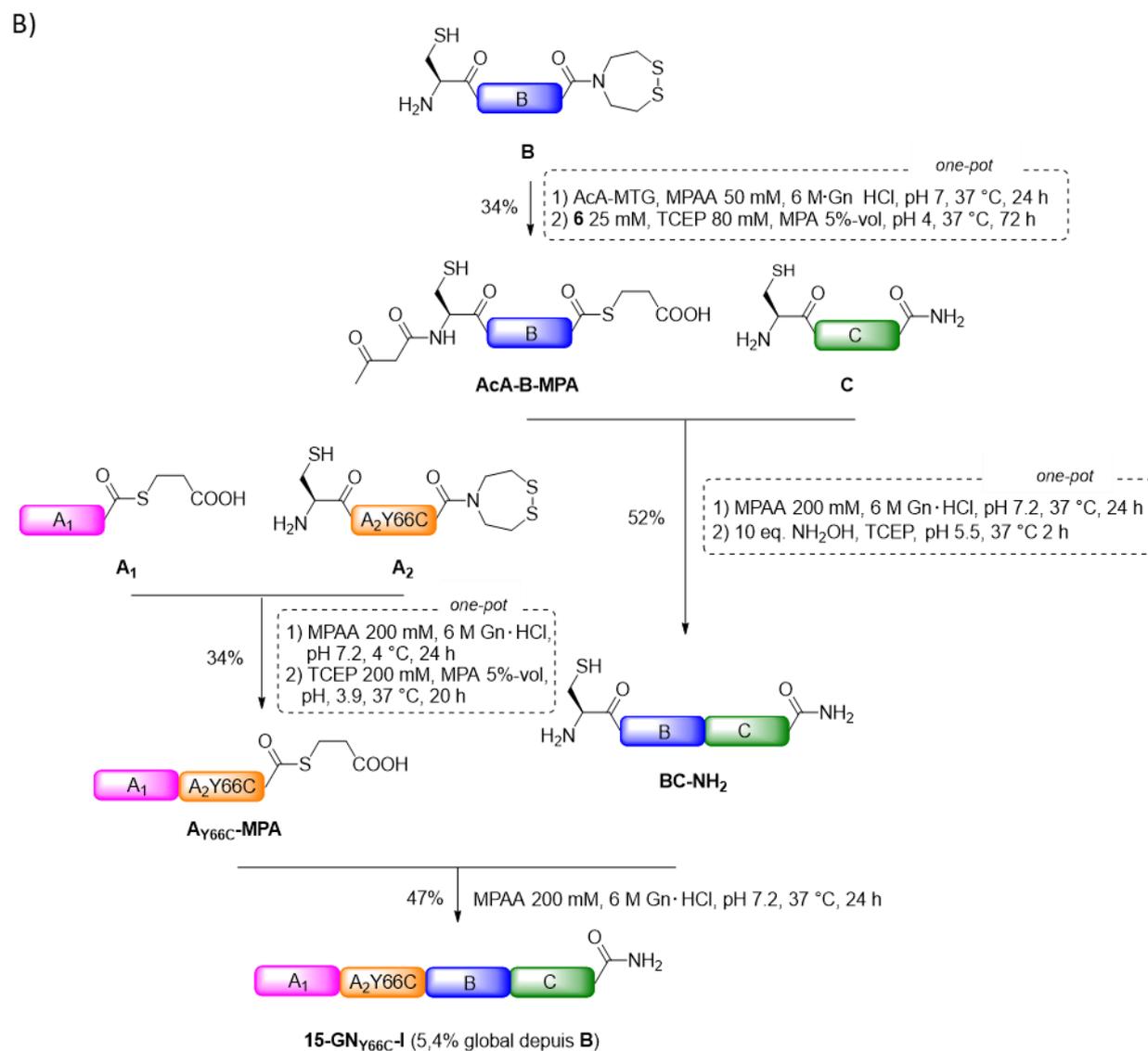


Figure 48. Synthèse chimique de la 15-GN_{Y66C} linéaire. A) Découpage de la séquence de 15-GN_{Y66C}. B) Adaptation du procédé de synthèse chimique précédemment développé à la synthèse de 15-GN_{Y66C}-I.

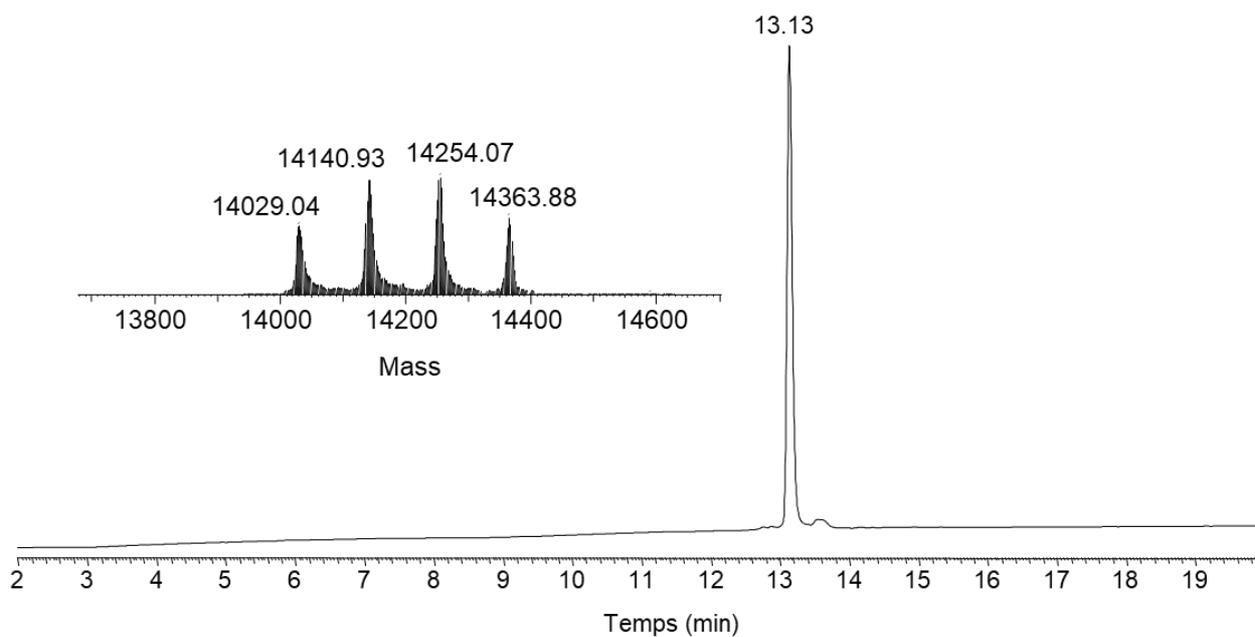


Figure 49. Analyse UPLC-MS du polypeptide **15-GN_{V66c}-I**. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Spectre de masse déconvolué, m/z calculé pour [M] (moyenne) 14028.18, trouvé 14029.04 (14140.93 [M+M_{TFA}], 14254.07 [M+2M_{TFA}], 14363.88 [M+3M_{TFA}]).

Le polypeptide **15-GN_{V66c}-I** a ensuite été replié. Pour cela, il a été dissout à 60 μM dans un tampon phosphate à pH 7,4, contenant 10% en volume de glycérol et un mélange de glutathion oxydé et de glutathion réduit (GSH 1 mM / GSSG, 0,2 mM). Après 46 h à température ambiante, l'analyse UPLC du milieu de repliement révèle la présence d'une forme repliée largement majoritaire (Figure 50).

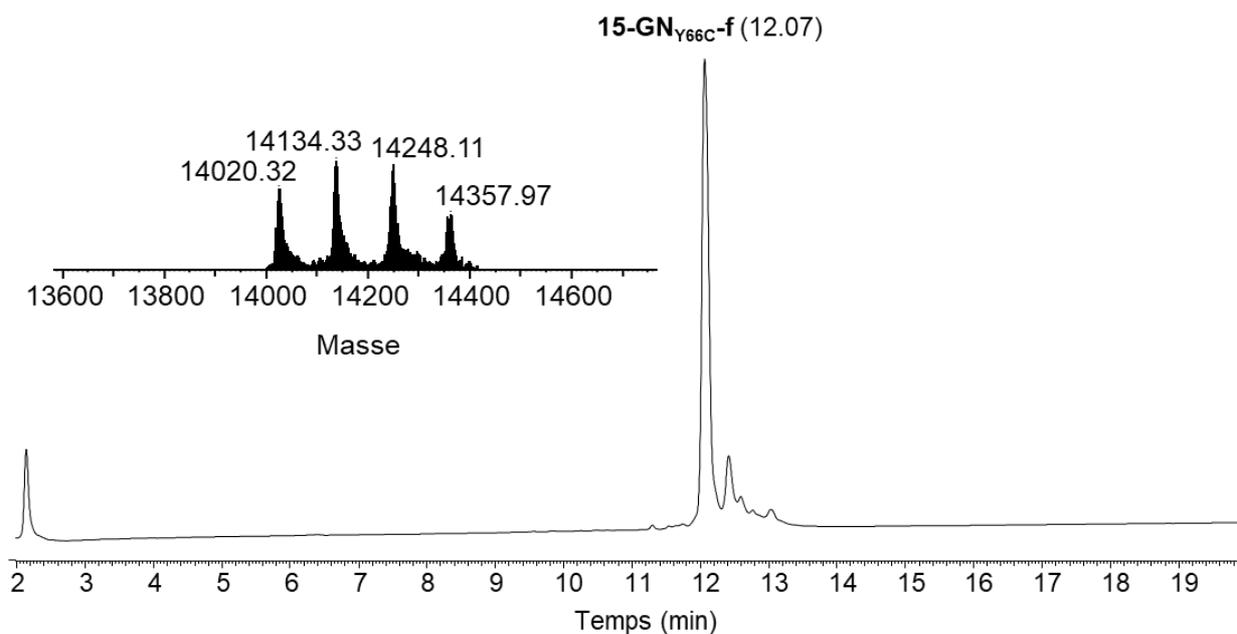


Figure 50. Analyse UPLC-MS du milieu de repliement de **15-GN_{Y66C}-I** après 46 h. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Spectre de masse déconvolué, m/z calculé pour [M] (moyenne) 14020.18, trouvé 14020.32 (14134.33 [M+M_{TFA}], 14248.11 [M+2M_{TFA}], 14357.97 [M+3M_{TFA}]).

L'écart de masse avec le polypeptide linéaire est de 8 Da, toutes les cystéines sont donc appariées en ponts disulfure. L'étape de dialyse oxydante visant à la fermeture du pont reliant les Cys43 et 45 n'a donc pas été jugée utile. La protéine a été dialysée une nuit contre un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10% en volume de glycérol. Contre toute attente, l'analyse LC-MS du milieu dialysé révèle l'apparition d'une nouvelle espèce dont la masse correspond à celle d'un dimère de 15-GN_{Y66C} (t_R = 12,30 min, Figure 51)

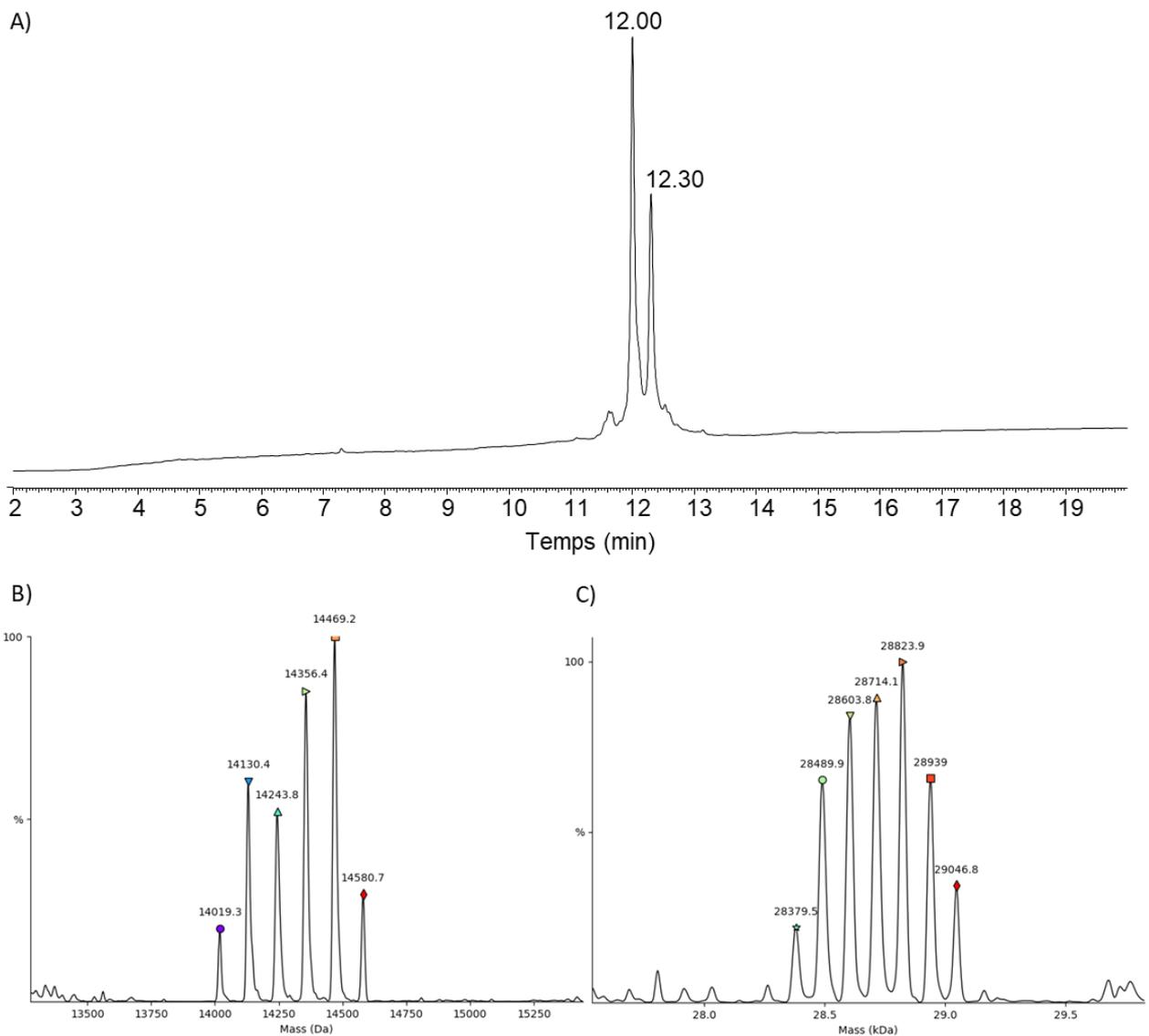


Figure 51. Analyse UPLC-MS après dialyse du milieu de repliement de **15-GN_{v66c-I}**. A) Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. B) Spectre de masse déconvolué pour $t_R = 12.00$, m/z calculé pour $[M]$ (moyenne) 14020.18, trouvé 14019.3 C) Spectre de masse déconvolué pour $t_R = 12.30$, m/z calculé pour $[M]$ (moyenne) 28040.36, trouvé 28037.4 (28379.5 $[M+3M_{TFA}]$, 28489.9 $[M+4M_{TFA}]$, 28603.8 $[M+5M_{TFA}]$, 28714.1 $[M+6M_{TFA}]$, 28823.9 $[M+6M_{TFA}]$, 28939.0 $[M+7M_{TFA}]$, 29046.8 $[M+8M_{TFA}]$).

Le caractère covalent de ce dimère a été démontré au moyen d'expériences HPLC à plus haute température au cours desquelles la coalescence des deux pics n'a jamais été observée. La dimérisation survient au cours de la dialyse où la décroissance des concentrations en glutathion oxydé et réduit entraîne une variation non contrôlée du potentiel redox du milieu. L'évolution du potentiel redox vers de plus faibles valeurs, c'est-à-dire l'augmentation du ratio réducteur/oxydant pourrait entraîner l'ouverture, la redistribution de certains ponts disulfure et la dimérisation.

Pour minimiser la dimérisation, une étape de dialyse oxydante a de nouveau été introduite (tampon phosphate, 10%-vol glycerol, 10 mM GSSG). Celle-ci permet, une fois le repliement mené à terme, d'éliminer le glutathion réduit en s'assurant que la protéine évolue dans un milieu largement oxydant ne permettant pas l'ouverture des ponts disulfure. La protéine est ensuite dialysée contre un tampon phosphate contenant 10% en volume de glycérol. Comme espéré, la dialyse oxydante a permis l'élimination du glutathion réduit sans impacter le profil UPLC de la protéine repliée (Figure 52 A). Cependant, la seconde dialyse contre le tampon phosphate a, elle, conduit à l'obtention d'un mélange complexe dont les différents constituants n'ont pas pu être séparés (Figure 52 B).

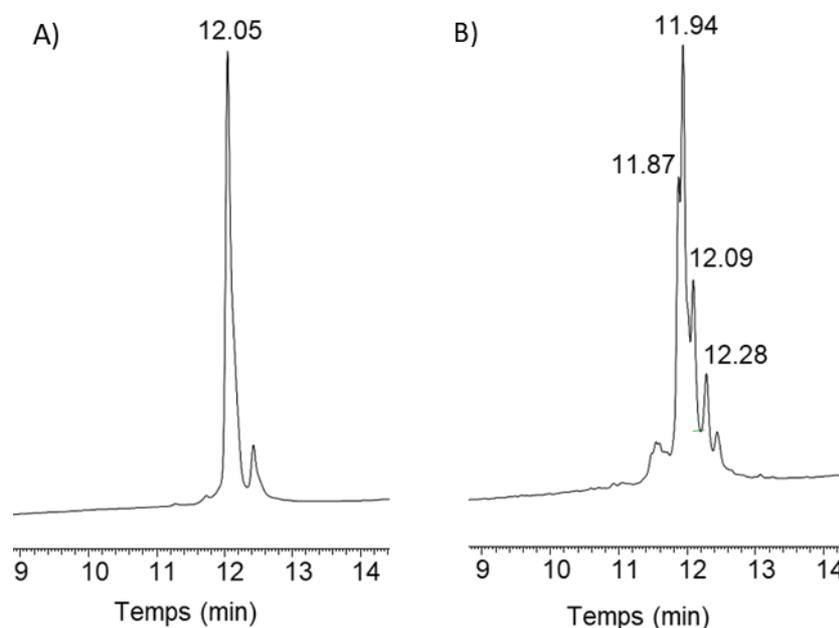


Figure 52. A) Analyse UPLC après dialyse oxydante du milieu de repliement de **15-GN_{V66C}-I**. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. B) Analyse UPLC après dialyse oxydante et dialyse du milieu de repliement de **15-GN_{V66C}-I**. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm.

L'échec de ces deux premières expériences suggère que la dialyse n'est pas une technique adaptée à la purification de la forme repliée **15-GN_{V66C}-f**. En effet, il s'agit d'une technique de purification lente pouvant laisser le temps à la protéine d'évoluer en fonction des propriétés physicochimiques de son environnement. Notre attention s'est donc portée sur la chromatographie en phase inverse pour la purification de cette protéine puisqu'elle remplit les conditions de rapidité désirées. Après repliement, l'intégralité du milieu est donc injectée

dans un système HPLC semi-préparatif, le pic correspondant à la protéine est collecté, lyophilisé et la poudre obtenue est redissoute dans l'eau avant d'être analysée (Figure 53 A, Figure 54). Ce n'est qu'à l'issue de ce processus que la forme repliée unique **15-GN_{Y66C-f}** a pu être isolée. Suite à cela, l'analyse protéomique a confirmé la présence du patron caractéristique du domaine saposin-like (Cys69-Cys132, Cys96-Cys107) (Figure 53 B). Les deux cystéines constituant le motif CPC sont appariées et la cystéine artificiellement introduite en position 66 est engagée dans un lien disulfure avec la Cys138.

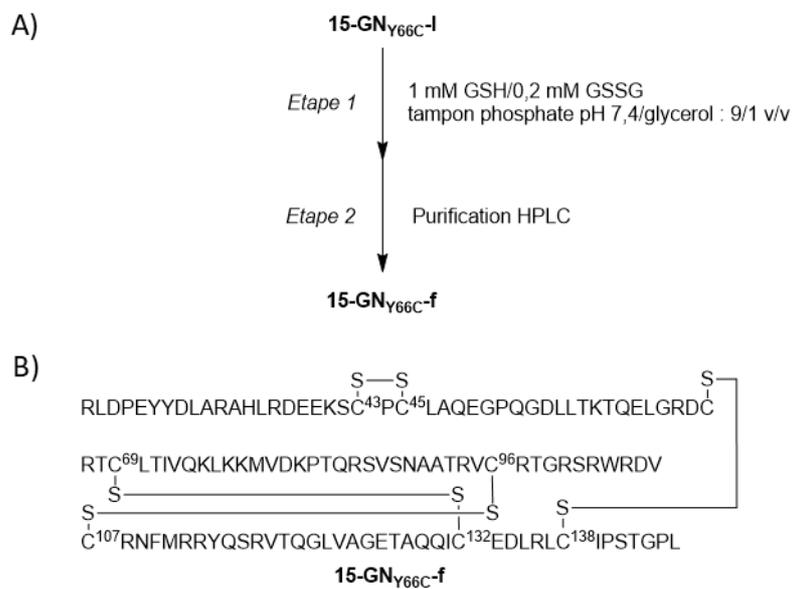


Figure 53. Repliement du polypeptide **15-GN_{Y66C-I}**. A) **15-GN_{Y66C-I}** est replié en présence du système redox glutathion (GSH)/glutathion disulfure (GSSG) puis purifié par HPLC semi préparative. B) Patron des ponts disulfure de **15-GN_{Y66C-f}**.

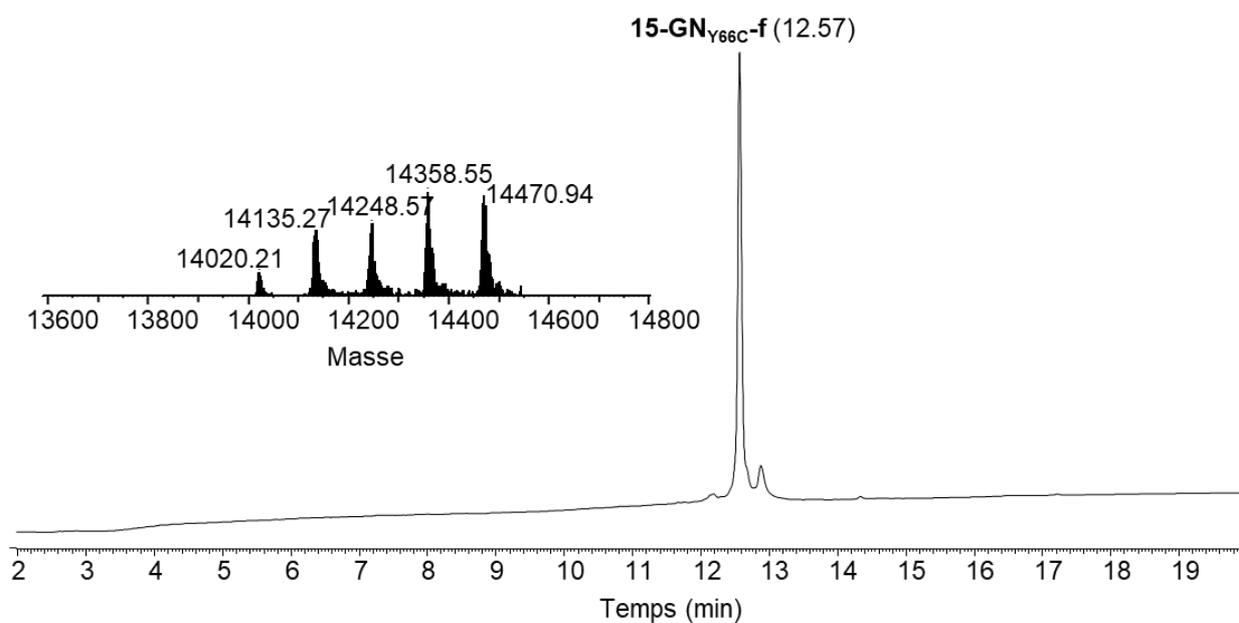
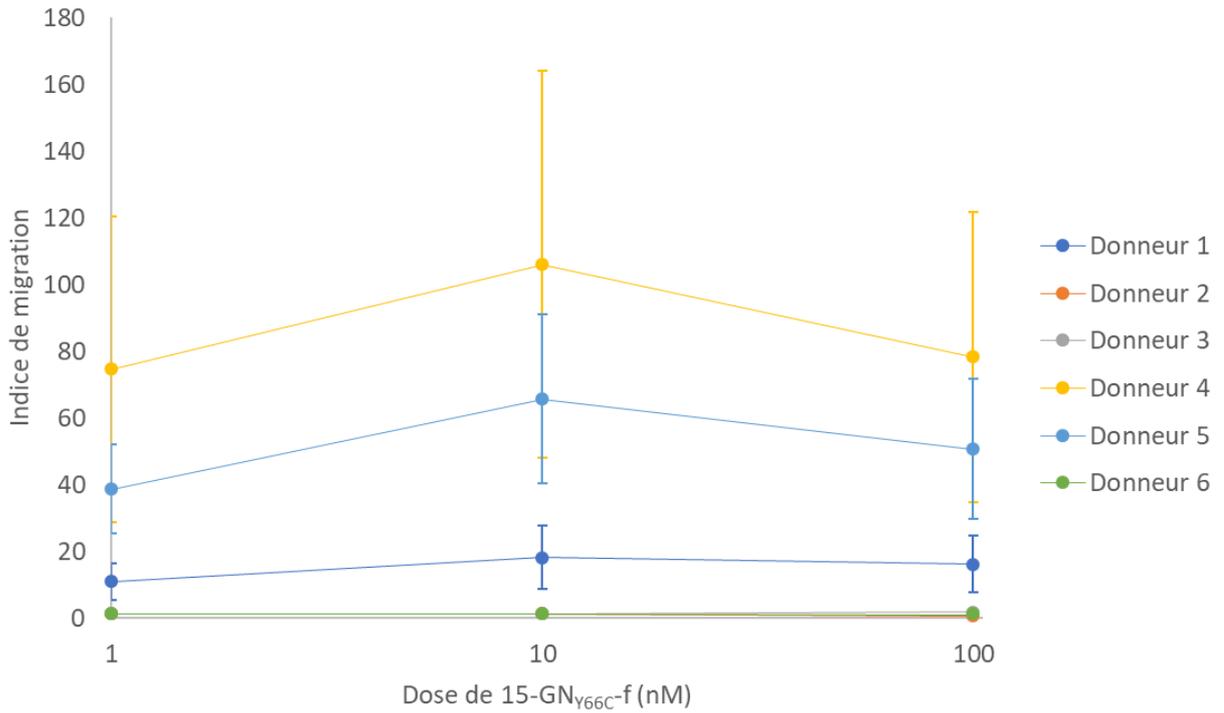


Figure 54. Analyse UPLC-MS de **15-GN_{Y66C}-f** après purification par HPLC semi-préparative. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Spectre de masse déconvolué, m/z calculé pour [M] (moyenne) 14020.18, trouvé 14020.21 (14135.27 [M+M_{TFA}], 14248.57 [M+2M_{TFA}], 14358.55 [M+3M_{TFA}], 14470.94 [M+4M_{TFA}]).

2.1.2. Activité biologique

Comme pour les précédents analogues, l'activité chimiotactique de **15-GN_{Y66C}-f** a été évaluée sur des monocytes humains. Les résultats sont regroupés en Figure 55.

A)



B)

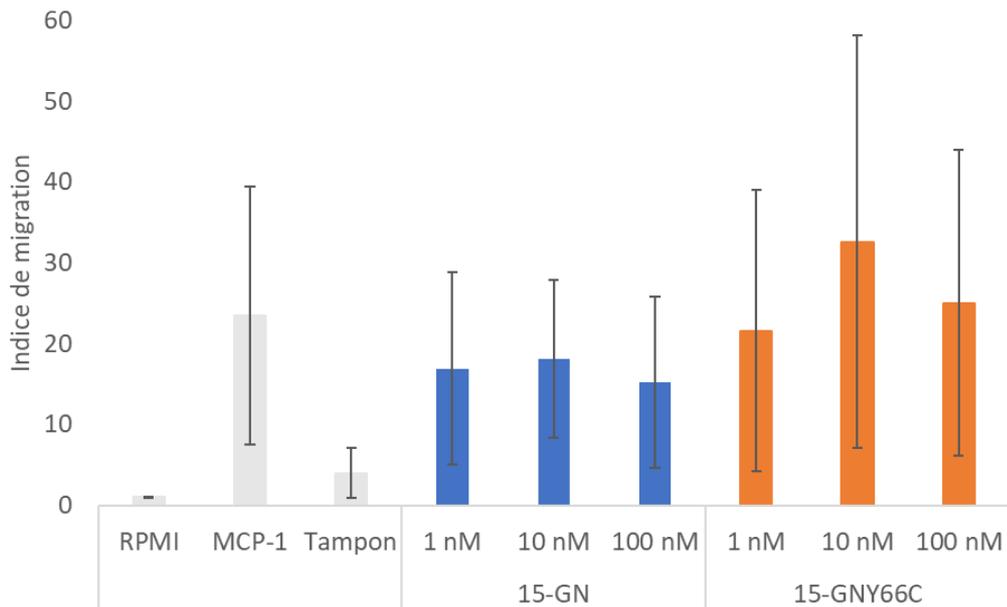


Figure 55. Activité chimiotactique de **15-GN_{V66C}-f** sur des monocytes primaires après 1 heure d'incubation. Les données sont exprimées par rapport à la migration observée dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté par 0.1% de sérum de veau fœtal. A) Dose-réponse à **15-GN_{V66C}-f** (0-100 nM) pour 6 donneurs. Les expériences ont été répétées 9 fois et les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm écart type. B) Moyenne de l'indice de migration pour chaque dose de **15-GN-f** et **15-GN_{V66C}-f**. MCP-1 est utilisé comme contrôle positif à 23 nM.

Malgré la mutation en position 66, la protéine conserve une activité chimiotactique significative. Comme la protéine native, **15-GN_{Y66C}-f** présente un profil dose-réponse en cloche avec un maximum d'activité à 10 nM. L'indice de migration à 10 nM de **15-GN_{Y66C}-f** dépasse d'ailleurs celui constaté en réponse à 23 nM de MCP-1. L'erreur sur l'indice de migration est cependant plus importante que pour la 15-GN. Les monocytes des donneurs 1, 4 et 5 répondent fortement à cet analogue tandis que la réponse des monocytes des trois autres donneurs est très faible. La forte variabilité de la réponse chimiotactique en fonction du donneur accompagne jusqu'à maintenant tous les essais de chimiotaxie entrepris. Malgré cela, et comme nous avons pu le faire pour les analogues précédents, nous pouvons affirmer que la protéine mutante **15-GN_{Y66C}-f** est dotée d'une activité chimiotactique tout à fait semblable à celle de la 15-GN native. Il s'agit là d'un résultat important puisque nous disposons à présent d'une méthode permettant de produire une 15-GN fonctionnelle sous une forme repliée unique. Celle-ci pourrait s'avérer plus facilement cristallisable rendant possible la résolution de sa structure par diffraction des rayons X. En gardant également en tête que la 15-GN pourrait un jour trouver une application thérapeutique, disposer d'une voie d'accès à une forme repliée unique est un véritable atout.

La fonctionnalité de cette protéine mutante étant démontrée, nous avons souhaité évaluer son activité immunomodulatrice sur les macrophages M1 et M2 et la comparer aux activités des 9- et 15-GN. Les résultats sont présentés en Figure 56.

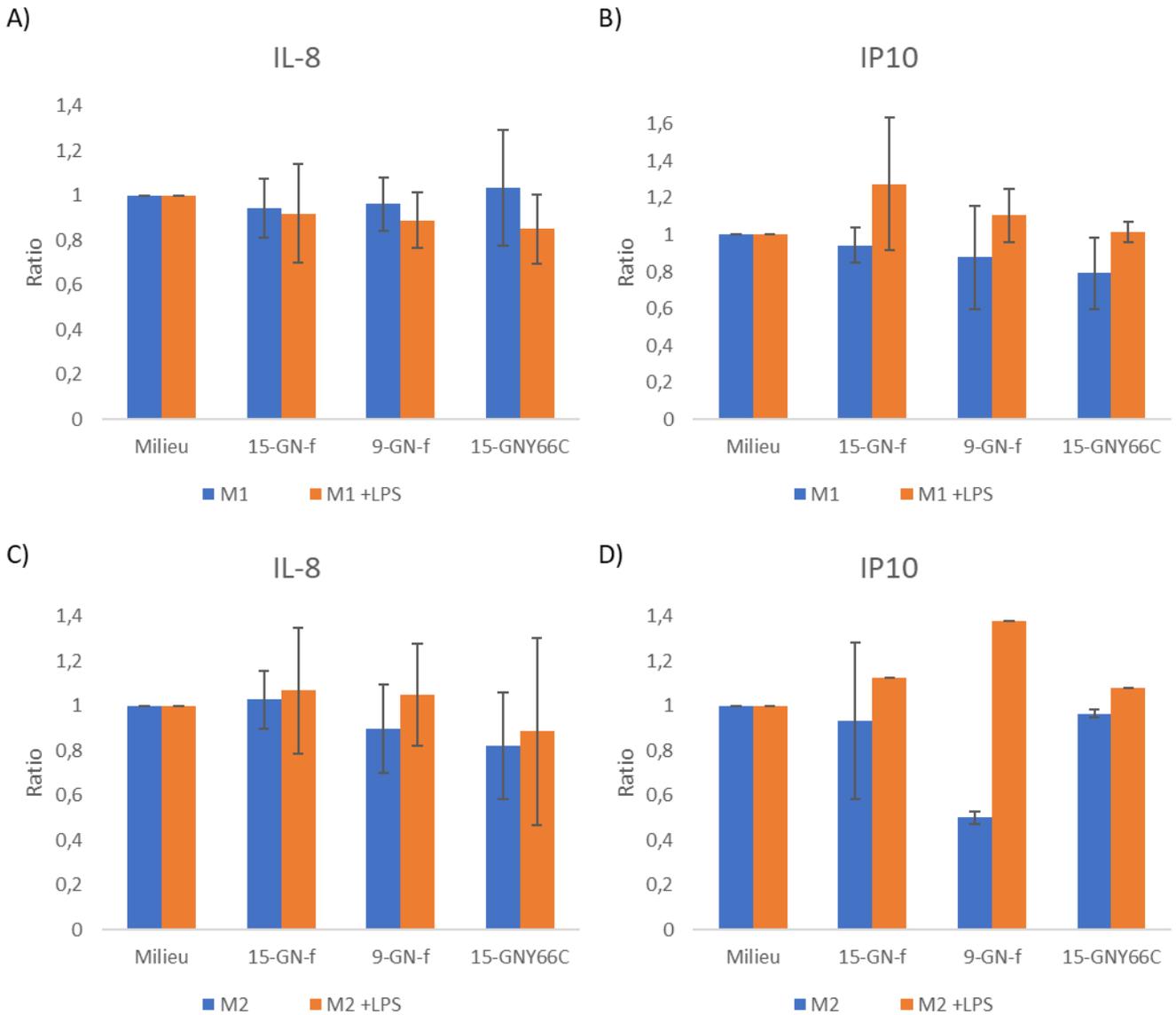


Figure 56. Expression des chimiokines IL-8 et IP-10 par des macrophages M1 et M2 dérivant de monocytes humains purifiés activés ou non par le LPS après 24 h d'incubation avec 10 nM de **15-GN-f**, **9-GN-f** ou **15-GN_{V66C}-f**. Les données sont exprimées par rapport à l'expression dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et contenant des antibiotiques. La moyenne d'au moins trois réplicats est ici présentée sauf pour l'expression d'IP-10 par les macrophages M2 activés au LPS (une seule valeur) A) Ratio de l'expression d'IL-8 par les macrophages M1 activés ou non au LPS. B) Ratio de l'expression d'IP-10 par les macrophages M1 activés ou non au LPS. C) Ratio de l'expression d'IL-8 par les macrophages M2 activés ou non au LPS. D) Ratio de l'expression d'IP-10 par les macrophages M2 activés ou non au LPS.

A l'inverse de la 15-GN native, **15-GN_{V66C}-f** semble disposer d'une activité inhibitrice de la production d'IP-10 par les macrophages M1 et d'IL-8 par les macrophages M2. Cette tendance s'observe également lors de la stimulation des cellules au LPS. Cette activité rejoint celle déjà observée pour la 9-GN.

15-GN_{Y66C}-f se distingue principalement de la 15-GN native par l'absence de résidus de cystéine non appariés en pont disulfure intramoléculaire. **15-GN-f** est en effet un mélange de deux formes repliées : **15-GN-f1** pour laquelle une des cystéines du motif CPC est engagée dans un disulfure avec une molécule de glutathion et **15-GN-f2** qui présente un motif CPC fermé et un adduit glutathion en position 138. Or, ces résultats laissent présager une différence d'activité immunomodulatrice des macrophages humains entre ces deux protéines. L'absence de cystéines libres pourrait donc se présenter comme une condition potentielle pour cette activité. Ceci pourrait s'expliquer par une modification importante des propriétés redox de la protéine due au complet appariement des cystéines.

2.2. Synthèse et caractérisation de la granulysine 15 kDa C138A (15-GN_{C138A})

A l'inverse du mutant Y66C pour lequel une cystéine a artificiellement été introduite, un deuxième analogue mutant portant une alanine en lieu et place de la cystéine 138 a été synthétisé. Et ceci, afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la présence d'un nombre impair de cystéines dans la 15-GN native expliquerait à elle seule l'obtention d'un mélange de formes repliées. Cette cystéine 138 étant laissée libre lors du repliement de la protéine native, il s'agissait d'évaluer son implication dans le processus de repliement et son influence sur la forme finalement obtenue.

C'est selon un schéma de synthèse strictement identique à celui déjà employé pour la synthèse des analogues précédents que la protéine 15-GN_{C138A} a été produite. Cette stratégie synthétique est rappelée en Figure 57.

- A)
- A₁ RLSPEYYDLARAHLRDEEKS
 - A₂ CPCLAQEGPQGDLTKTQELGRDYRT
 - B CLTIVQKLKMMVDKPTQRSVSNAATRVCRTGRSRWRDV
 - C_{C138A} CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLAIPSTGPL

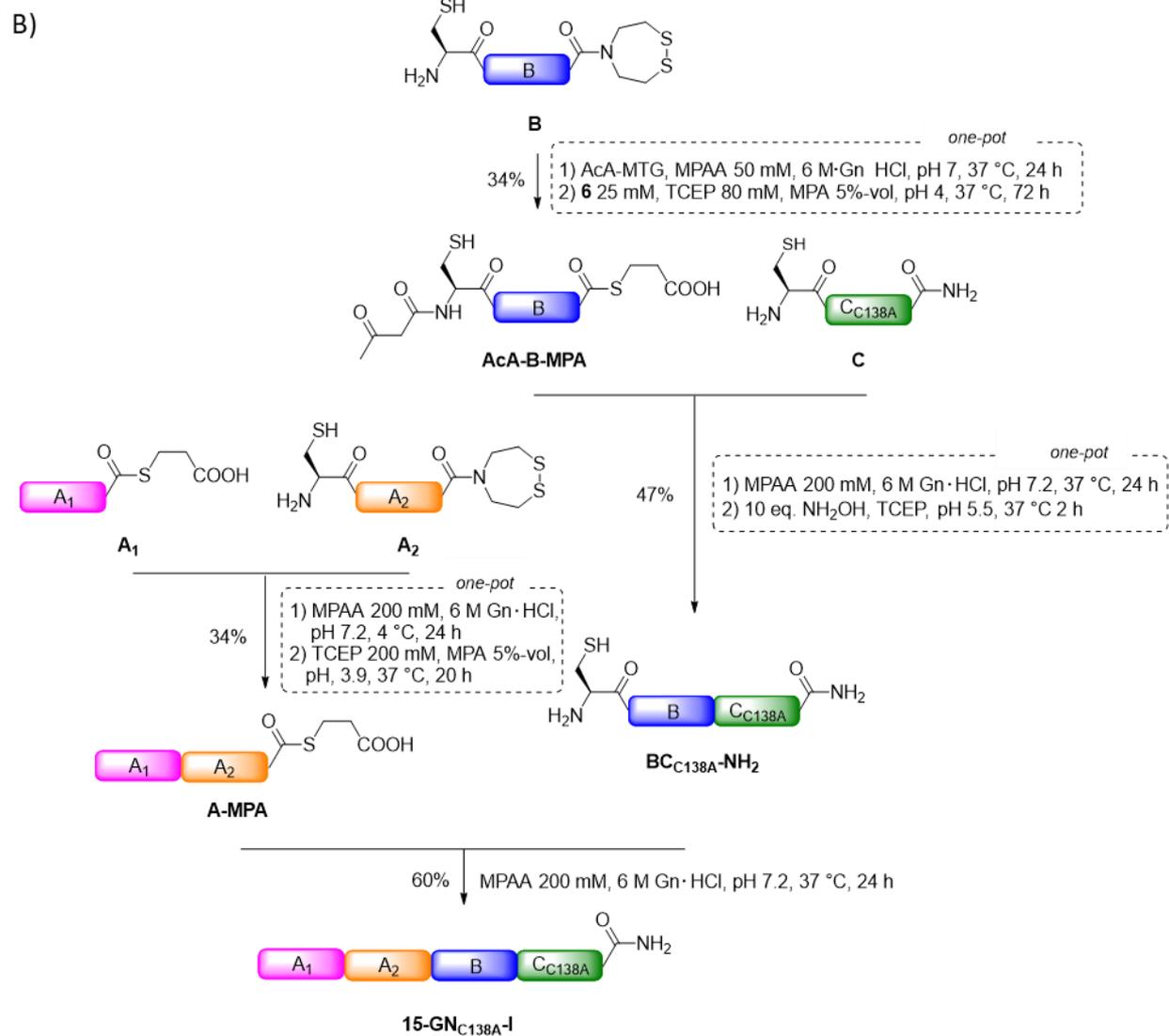


Figure 57. Synthèse chimique de la 15-GN_{C138A} linéaire. A) Découpage de la séquence de 15-GN_{C138A}. B) Adaptation du procédé de synthèse chimique précédemment développé à la synthèse de 15-GN_{C138A}-I.

Il s'agit toujours d'un procédé en 4 étapes visant à l'assemblage de 4 segments peptidiques. Celle-ci révèle encore une fois sa grande modularité puisque la modification de séquence est introduite dans le segment C-terminal **C**. Les autres segments de départ correspondent à des peptides déjà synthétisés pour produire les autres analogues. L'ensemble de cette séquence

réactionnelle a permis d'obtenir 6,2 mg de cette protéine avec un rendement global de 10% (Figure 58) et dont 538 μg ont été engagés dans un essai de repliement. Ici encore, les conditions développées pour les analogues précédents ont été employées (Figure 59 A). Le profil UPLC du milieu de repliement à l'équilibre est présenté en Figure 59.

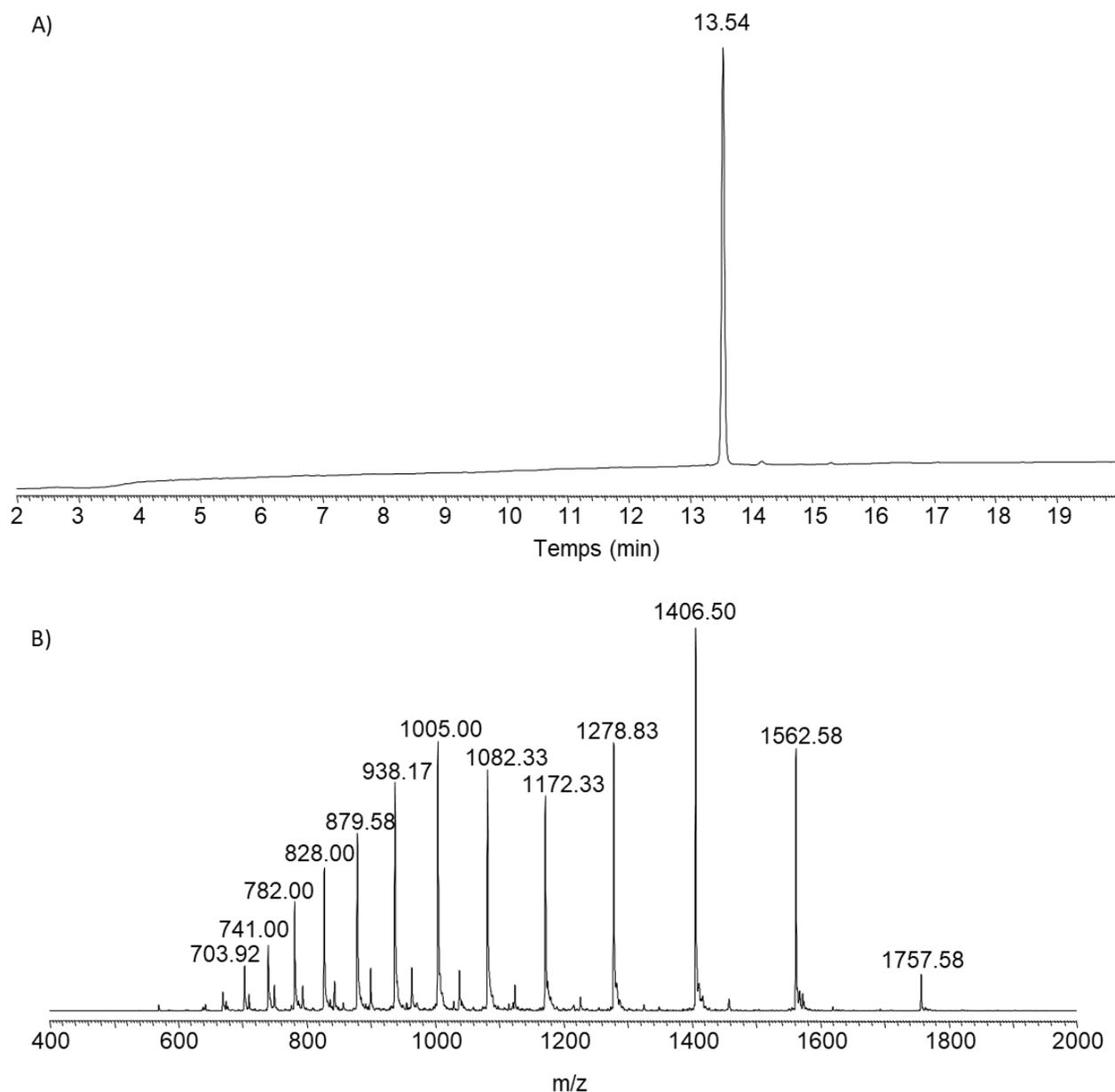
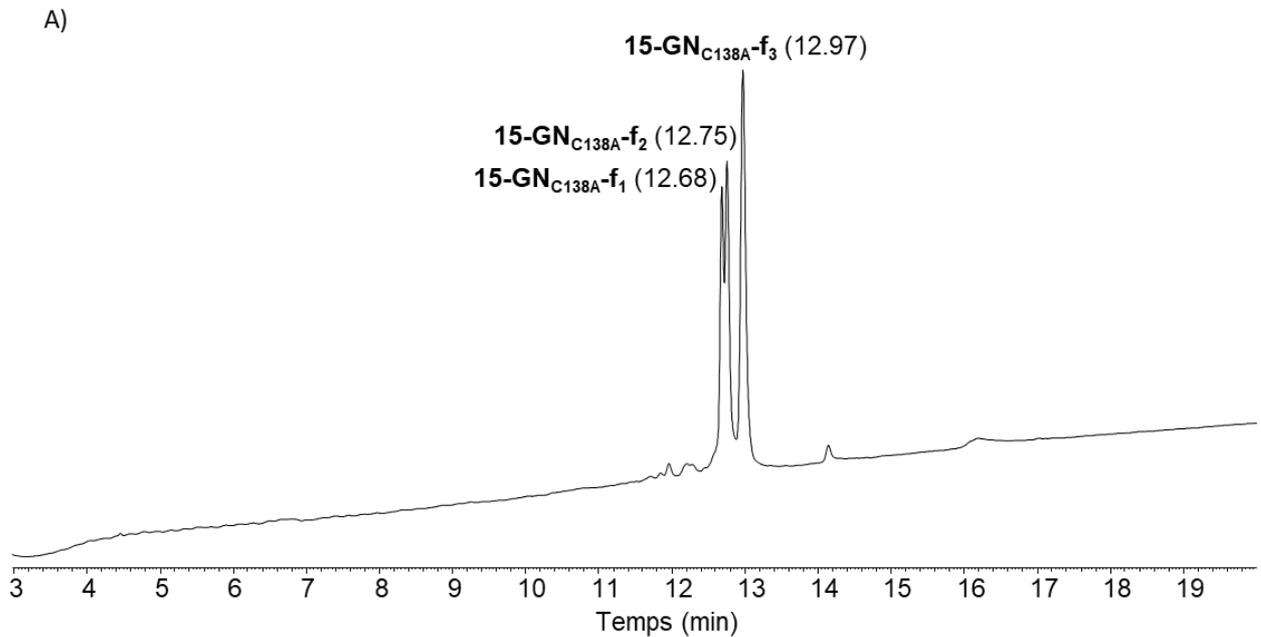


Figure 58. Analyse UPLC-MS du polypeptide **15-GN_{C138A}-I**. A) Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. B) Trace MS (enregistrée avec la température de source réglée à 450 °C et la température du capillaire à 450 °C : m/z 1757.58 ([M+8H]⁸⁺), 1562.58 ([M+9H]⁹⁺), 1406.50 ([M+10H]¹⁰⁺), 1278.83 ([M+11H]¹¹⁺), 1172.33 ([M+12H]¹²⁺), 1082.33 ([M+13H]¹³⁺), 1005.00 ([M+14H]¹⁴⁺), 938.17 ([M+15H]¹⁵⁺), 879.58 ([M+16H]¹⁶⁺), 828.00 ([M+17H]¹⁷⁺), 782.00 ([M+18H]¹⁸⁺), 741.00 ([M+19H]¹⁹⁺), 703.92 ([M+20H]²⁰⁺); calculé pour [M] (moyenne) : 14056.15, trouvé : 14056.72.



B)



Figure 59. A) Analyse UPLC-MS du milieu de repliement de **15-GN_{C138A}-I** après 137 h. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. C) Patron des ponts disulfure des formes **15-GN_{C138A}-f1**, **-f2** et **-f3**.

Trois formes repliées différentes ont pu être isolées. Elles diffèrent par les partenaires d'oxydation des cystéines 43 et 45 qui constituent le motif CPC. Parmi les trois formes, une première correspond à un motif CPC ouvert et dont les cystéines sont appariées chacune à une molécule de glutathion (**15-GN_{C138A}-f1**, Figure 59). Une deuxième dispose d'un motif CPC

fermé (**15-GN_{C138A}-f2**). Enfin, une troisième forme est détectée. Il s'agit d'un dimère pour lequel deux entités 15-GN_{C138A} sont reliées entre elles par deux ponts disulfure au niveau de ce même motif CPC (**15-GN_{C138A}-f3**).

Tout ceci révèle que la complexité du profil de repliement de la 15-GN native n'est pas uniquement liée au nombre impair de cystéines qu'elle contient. Le retrait de la cystéine 138 a eu pour effet de complexifier d'avantage ce profil suggérant qu'elle joue un rôle important dans le processus de repliement de la protéine. Il nous est alors possible d'imaginer que cette cystéine libre puisse être dotée d'une action « correctrice ». Grâce aux échanges thiol/disulfures, elle participerait à inverser les réactions d'appariement qui ne conduisent pas à la forme la plus stable de la protéine comme par exemple la formation du dimère observé lors de cette expérience. L'obtention de ce dimère en grande proportion rappelle le repliement de la 15-GN native mais surtout la première expérience de repliement de l'analogue 15-GN_{Y66C}. Comme ici, nous cherchions à simplifier le profil de repliement en rendant pair le nombre de cystéines dans la séquence de la 15-GN. En comparaison avec le repliement de la protéine native ou un dimère n'était obtenu qu'en très faible proportion, l'issue semblable des repliements de 15-GN_{Y66C} et 15-GN_{C138A} tend à montrer que la présence d'un nombre impair de cystéines dans la séquence de la protéine minimise sa dimérisation *via* le motif CPC. Enfin le repliement de 15-GN_{C138A} démontre une fois de plus la complexité qui règne autour du motif CPC. Jusqu'ici, les différentes formes repliées de tous les analogues produits ont différé au niveau de ce motif. Son caractère facilement réductible en présence d'autres thiols a d'ailleurs été montré précédemment et la difficulté de le cycliser même en conditions fortement oxydantes imposent les étapes de dialyse oxydante mises en place lors des précédents repliements.

En raison de la complexité du profil de repliement de l'analogue 15-GN_{C138A}, aucun essai de caractérisation de son activité biologique n'a pour l'instant été envisagé.

2.3. Synthèse et caractérisation de la granulysine 15 kDa APA (15-GN_{APA})

2.3.1. Synthèse et repliement

Pour caractériser encore un peu plus l'implication du motif Cys43-Pro44-Cys45 dans le repliement et dans les différentes activités biologiques de la 15-GN, nous avons entrepris la synthèse d'un analogue dépourvu de ce motif. Pour cela, les cystéines 43 et 45 ont été substituées par des alanines.

Le procédé d'assemblage est encore une fois identique à celui décrit pour les autres analogues à la différence près que l'assemblage des segments **A₁** et **A₂** est rendu impossible par l'absence de la cystéine 43 qui servait à la ligation. L'intégralité du segment **A_{APA}** est donc synthétisée en SPPS. Le reste du processus d'assemblage est quant à lui conservé (Figure 60) et permet d'accéder à 3,1 mg de l'analogue 15-GN_{APA} avec un rendement global de 7% (Figure 61).

- A)
- A_{APA}** RLSPEYYDLARAHLRDEEKS**APA**LAQEGPQGDLTKTQELGRDYRT
- B** CLTIVQKLKMMVDKPTQRSVSNAATRVCRTGRSRWRDV
- C** CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTGPL

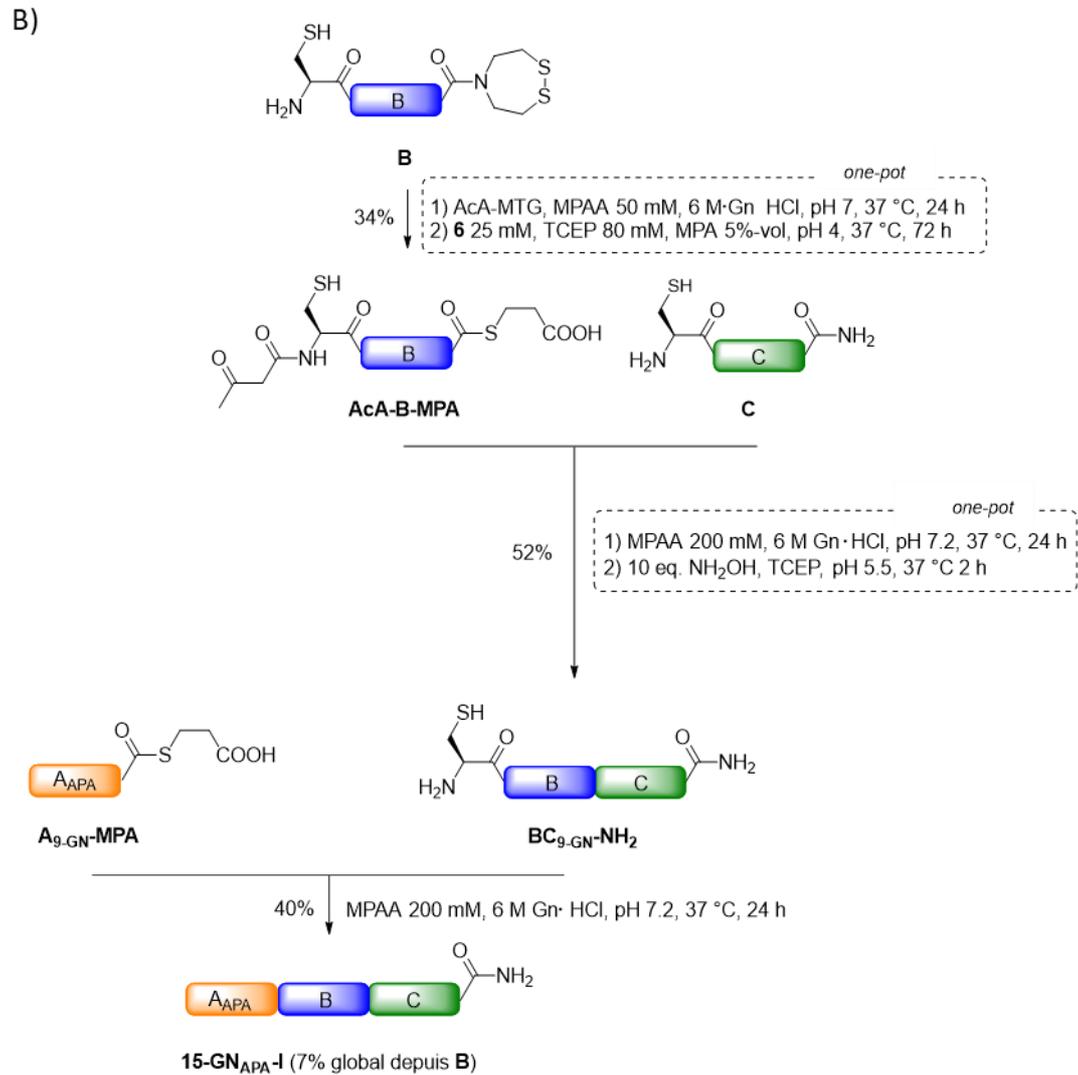


Figure 60. Synthèse chimique de la 15-GN_{APA} linéaire. A) Découpage de la séquence de 15-GN_{APA}. B) Adaptation du procédé de synthèse chimique précédemment développé à la synthèse de 15-GN_{APA-I}.

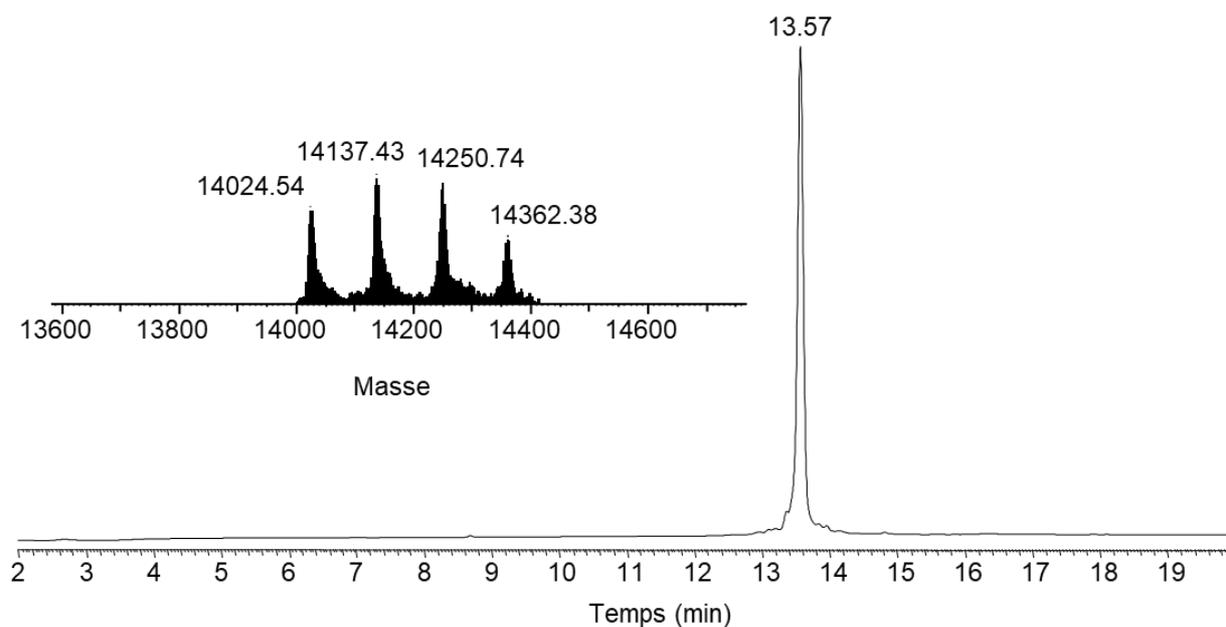


Figure 61. Analyse UPLC-MS du polypeptide **15-GN_{APA}-I**. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Spectre de masse déconvolué, m/z calculé pour [M] (moyenne) 14024.01, trouvé 14024.54 (14137.43 [M+M_{TFA}], 14250.74 [M+2M_{TFA}], 14362.38 [M+3M_{TFA}]).

Le polypeptide linéaire **15-GN_{APA}-I** est ensuite replié en utilisant toujours le même système redox, un mélange glutathion (1 mM)/glutathion disulfure (0,2 mM) dans un tampon phosphate salin à pH 7,4 et contenant 10%-vol de glycérol et 2 M de chlorhydrate de guanidine. L'équilibre est atteint après presque 10 jours et conduit à l'obtention d'une forme repliée unique (Figure 62). Son analyse protéomique révèle la présence des ponts disulfure Cys69-Cys132 et Cys96-Cys107 stabilisant le domaine saposin-like (Figure 63). Le milieu de repliement est ensuite dialysé 28 heures contre le tampon sans le système redox ni le chlorhydrate de guanidine et la protéine repliée 15-GN_{APA} est isolée avec un rendement de 78%.

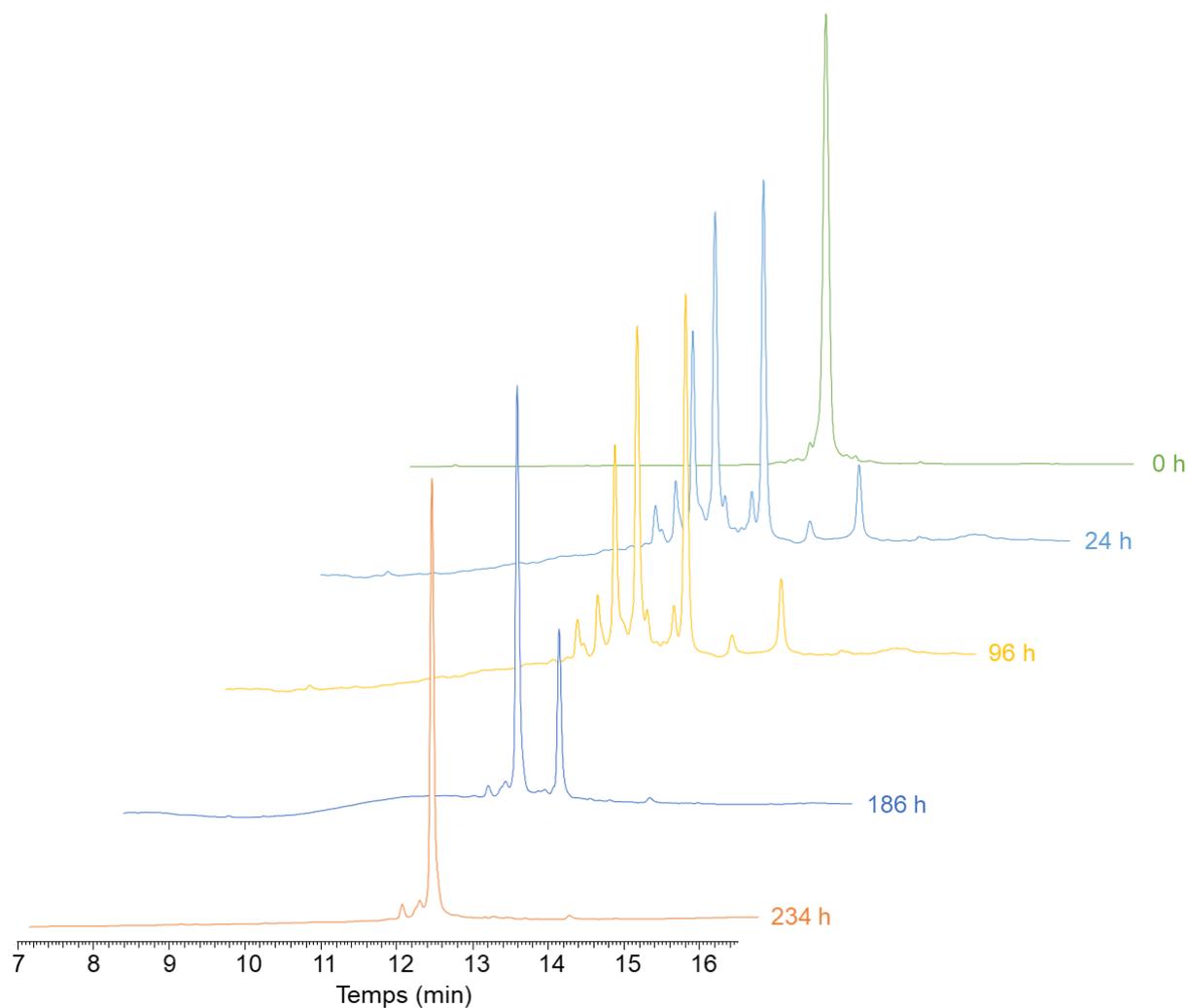


Figure 62. Suivi cinétique du repliement de **15-GN_{APA-I}**

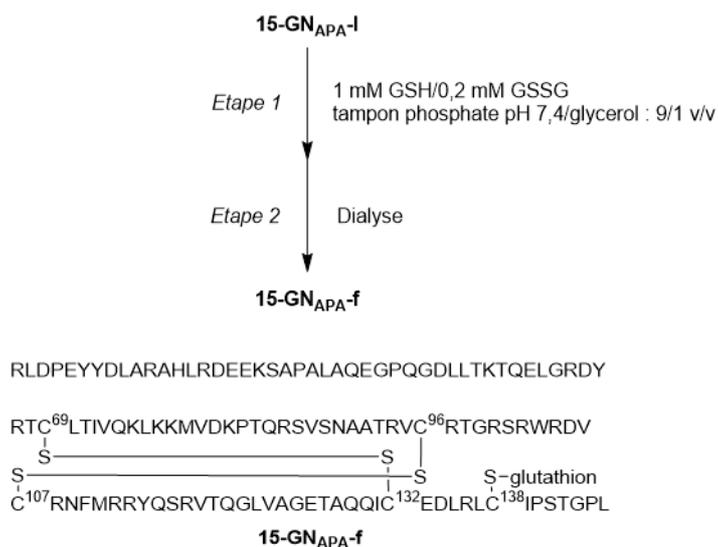


Figure 63. Repliement du polypeptide **15-GN_{APA-I}**. A) **15-GN_{APA-I}** est replié en présence du système redox glutathion (GSH)/glutathion disulfure (GSSG) puis dialysé. B) Patron des ponts disulfure de **15-GN_{APA-f}**.

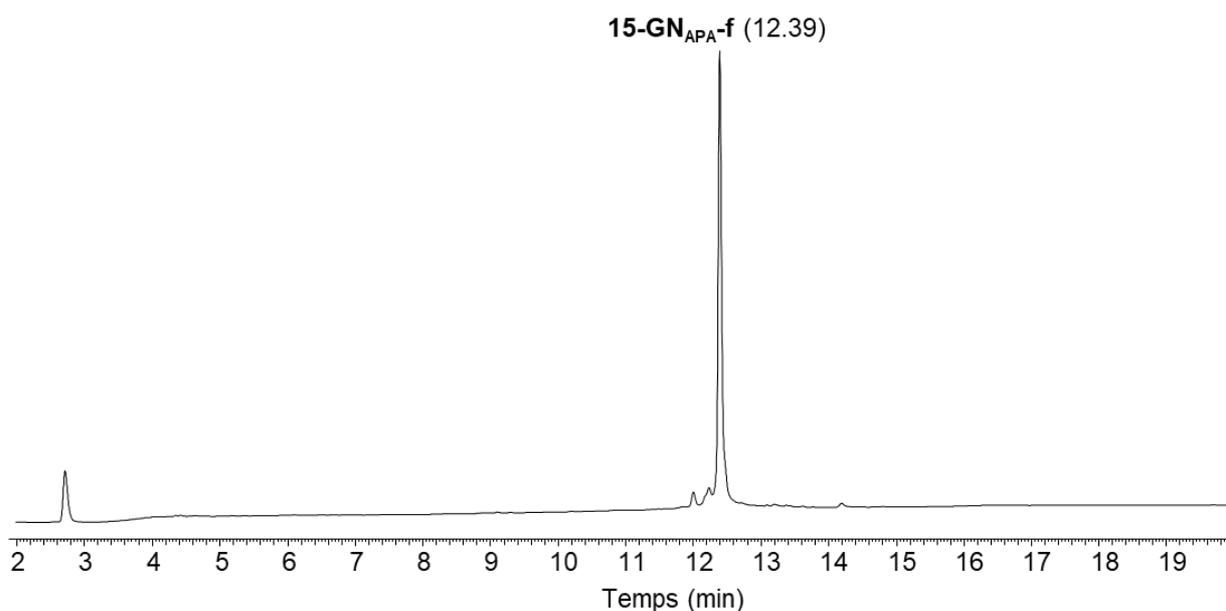


Figure 64. Analyse UPLC de la protéine **15-GN_{APA}-f** purifiée. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm.

Comme escompté, la mutation du motif CPC en APA permet une simplification importante du profil de repliement de la protéine (Figure 64). Comme pour la 9-GN, l'expérience de repliement est particulièrement longue. Or ces deux protéines se caractérisent par l'absence du motif CPC, mettant encore une fois en avant son caractère dynamisant. Nous pouvons également supposer qu'il joue un rôle de catalyseur de la formation des disulfures du domaine saposin-like qui sont encore ici conservés.

2.3.2. Activité biologique

A ce stade, l'activité chimiotactique de **15-GN_{APA}-f** n'a encore pu être déterminée. Cet analogue a malgré tout été caractérisé pour son activité immunomodulatrice sur les macrophages M1 et M2. Les résultats sont présentés en Figure 65 en relation avec les activités observées pour les 15- et 9-GN.

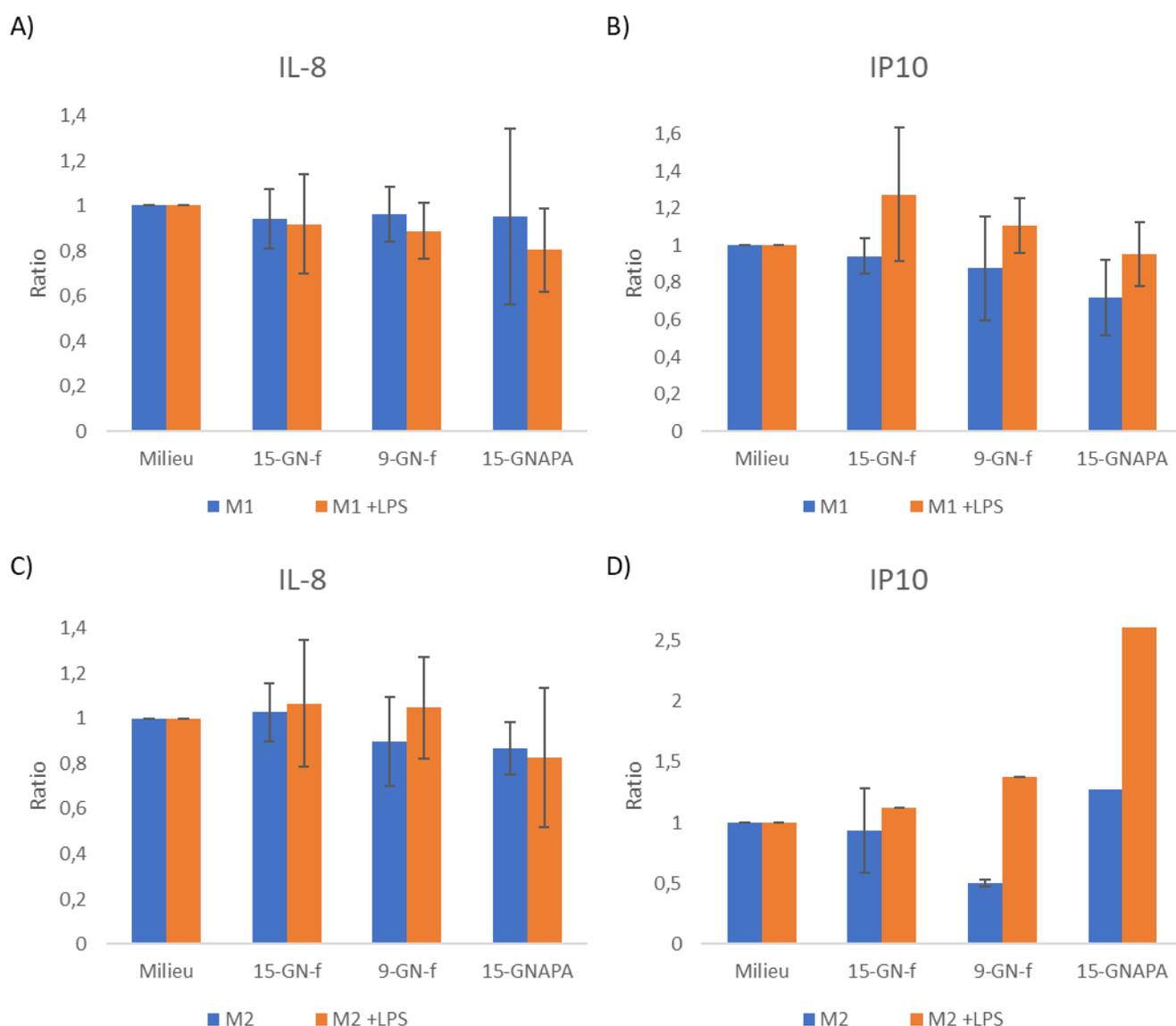


Figure 65. Expression des chimiokines IL-8 et IP-10 par des macrophages M1 et M2 dérivant de monocytes humains purifiés activés ou non par le LPS après 24 h d'incubation avec 10 nM de **15-GN-f**, **9-GN-f** ou **15-GN_{APA}-f**. Les données sont exprimées par rapport à l'expression dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et contenant des antibiotiques. La moyenne d'au moins trois réplicats est ici présentée sauf pour l'expression d'IP-10 par les macrophages M2 activés au LPS (une seule valeur) A) Ratio de l'expression d'IL-8 par les macrophages M1 activés ou non au LPS. B) Ratio de l'expression d'IP-10 par les macrophages M1 activés ou non au LPS. C) Ratio de l'expression d'IL-8 par les macrophages M2 activés ou non au LPS. D) Ratio de l'expression d'IP-10 par les macrophages M2 activés ou non au LPS.

Comme la 9-GN, l'analogue 15-GN_{APA} semble disposer d'une activité de régulation négative de l'expression d'IP-10 par les macrophages M1 et d'IL-8 par les macrophages M2. Dans ces deux cas, l'activation par le LPS ne modifie pas le profil de réponse. Ces deux protéines sont également dotées de la même capacité à inhiber légèrement la production d'IL-8 par les macrophages M1. L'absence de réplicats ne permet toutefois pas de discuter de l'action de **15-GN_{APA}-f** sur la production d'IP-10 par les macrophages M2

En conclusion, les différentes synthèses et repliements d'analogues de la 15-GN rapportés dans ce chapitre ont toujours mis en évidence la conservation du domaine saposin-like. Structurellement parlant, nous pouvons voir ces protéines comme constituées d'un domaine saposin-like avec des extensions N- et C-terminales peu structurées. La reconstruction du spectre de dichroïsme circulaire de la 15-GN à partir de ses trois domaines N-ter_{15-GN}, 9-GN et C-ter_{15-GN} vient supporter cette idée. La diversité des structures repliées obtenues au gré des différentes modifications nous renseigne sur l'origine de la complexité du repliement de la 15-GN native. Tout d'abord, le motif CPC porte à lui seul la responsabilité de la diversité structurale observée après repliement. Nous n'obtenons une simplification importante du profil de repliement que lorsque ce motif est absent. Notons également que plusieurs expériences de repliement de protéines analogues à la 15-GN ont révélé la propension de cette triade à dimériser. Face à cela, la cystéine 138, majoritairement non appariée en disulfure intramoléculaire dans la protéine native, pourrait apporter la dynamique nécessaire au réarrangement des formes mal repliées. Au-delà de sa seule implication dans la pluralité de formes repliées obtenues, le motif CPC semble jouer un rôle important dans la formation des ponts disulfure du domaine saposin-like. Dans le même milieu de repliement, ce domaine se conforme en 2 à 4 jours en présence du motif CPC contre 8 et 10 jours lorsqu'il est absent de la séquence de la protéine. Enfin, nous noterons également que l'étude du repliement de la 15-GN à travers la synthèse d'analogues nous a permis d'avoir accès à une protéine de forme repliée unique et disposant tout de même du motif CPC grâce à l'introduction d'une cystéine supplémentaire en position 66.

En plus du rôle qu'il joue dans le repliement de la protéine, nous avons également montré dans ce chapitre l'implication certaine du motif CPC dans les fonctions biologiques de la 15-GN. Jusqu'ici nous avons caractérisé l'immunomodulation des macrophages M1 et M2 par des analogues dépourvus de cette triade ou pour lesquels les cystéines 43 et 45 sont appariées en pont disulfures. Or une différence majeure entre tous ces analogues et la protéine native est leur capacité à réguler négativement l'expression d'IL-8 et d'IP10 par les macrophages M1 et M2. L'implication de ce motif dans l'activité immunomodulatrice est donc indiscutable et tous les résultats collectés tendent à montrer que l'état d'oxydation du motif CPC est une donnée importante pour l'activité immunomodulatrice. Nous pouvons dès lors supposer que la présence d'un motif CPC ouvert confère à la protéine d'autres activités, qui découlent d'autres

interactions moléculaires que celles impliquées dans l'immunomodulation des macrophages et qui rendent indétectable cette activité pour la protéine native. Tout ceci rappelle le comportement d'autres protéines dont l'activité est fortement dépendant de l'état d'oxydation des cystéines que contiennent leur séquence. C'est notamment le cas de HMGB1, une autre protéine aux propriétés d'alarmine produite par le lymphocyte NK. Dans sa configuration totalement réduite, HMGB1 interagit avec la chimiokine CXCL12 et cet hétérocomplexe est un chimioattractant des macrophages et fibroblastes murins ainsi que des monocytes humains via l'activation du récepteur CXCR4.^{266,267,268} HMGB1 peut également activer le récepteur RAGE pour induire également la chimiotaxie de cellules dendritiques immatures dérivant de monocytes.²⁶⁹ En revanche, l'oxydation en pont disulfure des Cys23 et Cys45 est requise pour l'interaction avec le récepteur TLR4 du macrophage conduisant à la production de cytokines.²⁷⁰

²⁶⁶ Venereau, E.; Casalgrandi, M.; Schiraldi, M.; Antoine, D. J.; Cattaneo, A.; De Marchis, F.; Liu, J.; Antonelli, A.; Preti, A.; Raeli, L.; Shams, S. S.; Yang, H.; Varani, L.; Andersson, U.; Tracey, K. J.; Bachi, A.; Uguccioni, M.; Bianchi, M. E. *J Exp Med* **2012**, 209, 1519–1528.

²⁶⁷ Kew, R. R.; Penzo, M.; Habel, D. M.; Marcu, K. B. *J. Immunol.* **2012**, 188, 2380–2386.

²⁶⁸ Schiraldi, M.; Raucchi, A.; Martínez Muñoz, L.; Livoti, E.; Celona, B.; Venereau, E.; Apuzzo, T.; De Marchis, F.; Pedotti, M.; Bachi, A.; Thelen, M.; Varani, L.; Mellado, M.; Proudfoot, A.; Bianchi, M. E.; Uguccioni, M. *J. Exp. Med.* **2012**, 209, 551–563.

²⁶⁹ Yang, D.; Chen, Q.; Yang, H.; Tracey, K. J.; Bustin, M.; Oppenheim, J. J. *J. of Leukoc. Biol.* **2007**, 81, 59–66.

²⁷⁰ Yang, H.; Hreggvidsdottir, H. S.; Palmblad, K.; Wang, H.; Ochani, M.; Li, J.; Lu, B.; Chavan, S.; Rosas-Ballina, M.; Al-Abed, Y.; Akira, S.; Bierhaus, A.; Erlandsson-Harris, H.; Andersson, U.; Tracey, K. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2010**, 107, 11942–11947.

Chapitre 5. Recherche d'un récepteur de la 15-GN

Les activités d'alarmine immunitaire de la 15-GN décrites dans la littérature ou rapportées dans les chapitres précédents interviennent à l'échelle du bas nanomolaire. La chimiotaxie et l'immunomodulation, qui sont deux des activités de la 15-GN sur lesquelles notre étude s'est jusqu'à présent concentrée sont par ailleurs bien connues pour découler de l'activation de récepteurs. L'effet spécifique des chimiokines sur leur cible cellulaire par exemple, s'exerce via leur liaison à différents membres de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs).²⁵⁹ A ce jour, 19 récepteurs « conventionnels » aux chimiokines (CCR1-10, CXCR1-6, GPR35/CXCR8, XCR1 et CX3CR1) ainsi que 4 récepteurs « atypiques » (ACKRs : ACKR1, ACKR2, ACKR3/CXCR7, and ACKR4) ont été identifiés chez l'homme.²⁷¹ Ces 23 récepteurs appartiennent à la classe A des récepteurs couplés à la protéine G et partagent un domaine transmembranaire canonique composé de 7 hélices α . Les travaux de Tewari *et al.* ont d'ailleurs montré que l'activité chimiotactique de la 9-GN pouvait être inhibée par la toxine pertussique.¹⁷¹ Cette toxine provoque l'ADP-ribosylation de l'isoforme Gi de la protéine G associée aux récepteurs aux chimiokines, inhibe ainsi le récepteur et empêche la chimiotaxie.²⁷² Les auteurs en ont donc conclu que l'activité chimiotactique de la 9-GN était liée à l'activation d'un des récepteurs aux chimiokines. Ils ont également montré que l'activité immunomodulatrice de la 15-GN procédait via l'activation du récepteur Toll-like 4. Les récepteurs Toll-like (TLR) sont un type de récepteurs de reconnaissance de forme (PRR) qui jouent un rôle clé dans le système immunitaire inné en l'avertissant de la présence d'infections microbiennes.²⁷³ L'activation des TLRs induit non seulement une réponse inflammatoire mais également le développement d'une immunité adaptative. L'inflammation induite par les TLRs est dépendante d'une voie de signalisation faisant intervenir la protéine MyD88. C'est d'ailleurs en observant l'absence d'expression de facteurs proinflammatoires par des

²⁷¹ Zhao, S.; Wu, B ; Stevens, R. C. *Structure* **2019**, 27, 405-408.

²⁷² Andreasen C, Carbonetti NH. *Infect Immun.* **2008**, 76, 5139-5148.

²⁷³ Delneste, Y.; Beauvillain, C.; Jeannin, P. *Med Sci* **2007**, 23, 67-74.

macrophages murins MyD88-KO que les auteurs ont montré l'implication de TLR4 dans l'activité immunomodulatrice de la 15-GN.

Toutefois, l'identité du récepteur impliqué dans l'action chimiotactique de la 9-GN n'a jamais été rapportée et rien à ce jour ne permet de prédire si la même activité pour la 15-GN procède via l'activation du même récepteur. Il est également possible d'imaginer que la 15-GN puisse se lier à plusieurs récepteurs, justifiant ainsi la pluralité de ses activités. Rappelons également les changements observés dans l'activité de la 15-GN en fonction de son état d'oxydation. Comme pour la protéine HMBG1 dont nous avons discuté en conclusion du précédent chapitre, la 15-GN pourrait lier différents partenaires en fonction de son état d'oxydation. Forts du développement d'un procédé synthétique robuste pour accéder à la 15-GN et à des protéines analogues fonctionnelles nous avons entrepris la production d'un analogue biotinylé afin de débiter la recherche du ou des récepteurs à la 15-GN. Après sa complète caractérisation, cet analogue a pu être intensément employé dans des expériences de cytométrie en flux, de microscopie confocale et d'analyses pull-down.

1. Synthèse et caractérisation d'un analogue biotinylé de la 15-GN

1.1. Synthèse et repliement

L'assemblage du polypeptide linéaire 15-GN_{biot} exploite une nouvelle fois le procédé synthétique rapporté au chapitre 3 pour la synthèse de la 15-GN native. Le découpage étant identique, les segments **A**₁, **A**₂ et **B** déjà produits sont réemployés pour cette synthèse. Seule la synthèse d'un nouveau segment **C** augmenté d'une lysine biotinylée en position C-terminale est nécessaire.

Le procédé démarre encore une fois par la protection puis la tranthioestérification du segment central **B** avant sa ligation au segment C-terminal **C**_{biot} (Figure 66). En parallèle, le segment N-terminal **A** est assemblé par NCL de ses précurseurs **A**₁-MPA et **A**₂-SEA^{off}. Une fois déprotégé,

le peptide **BC_{biot}** est ligué par NCL au segment **A** pour conduire au polypeptide linéaire **15-GN_{biot}-I** avec un rendement de 5,5% après purification (Figure 68).

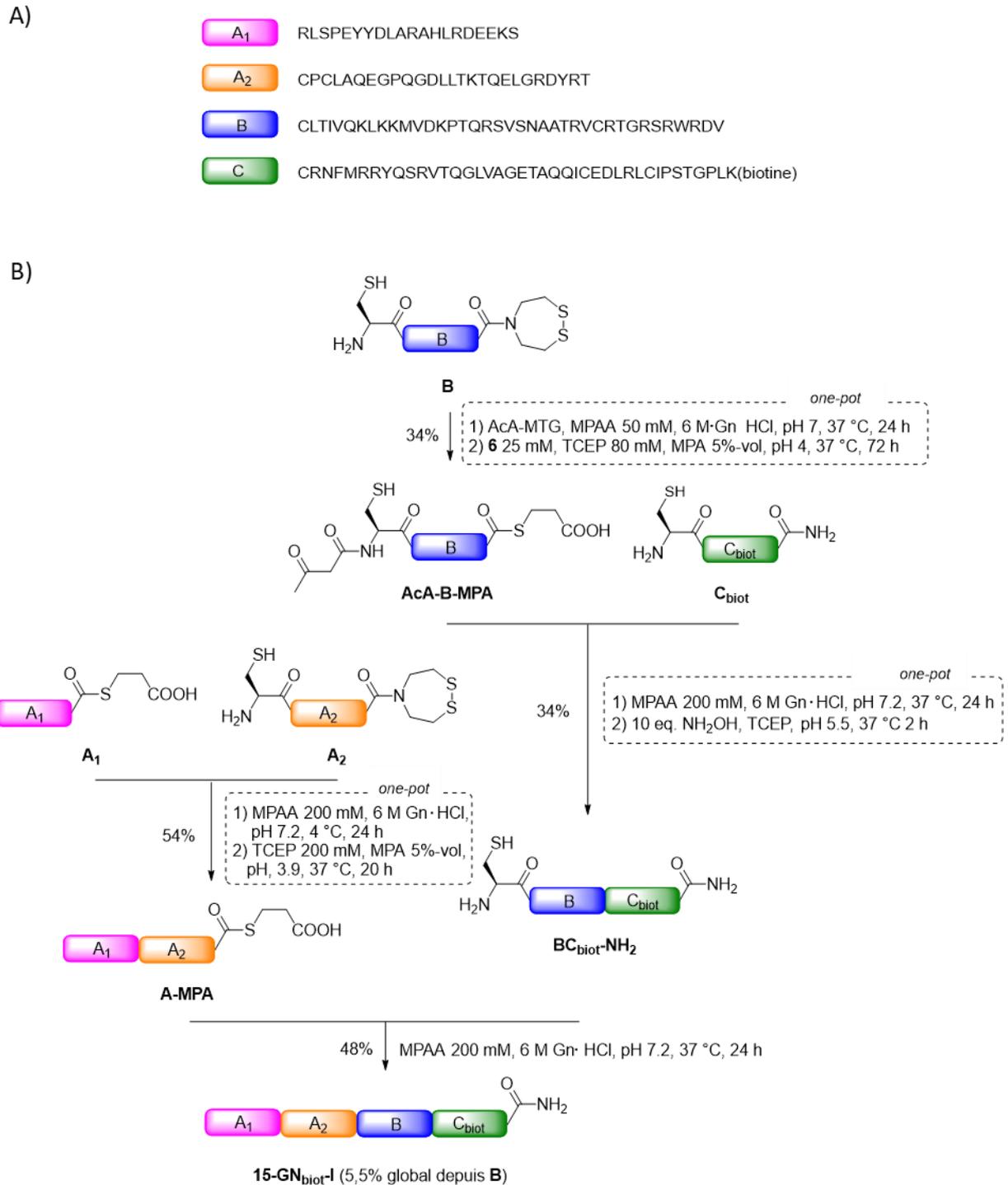


Figure 66. Synthèse chimique de la 15-GN_{biot} linéaire. A) Découpage de la séquence de 15-GN_{biot}. B) Adaptation du procédé de synthèse chimique précédemment développé à la synthèse de 15-GN_{biot}-I.

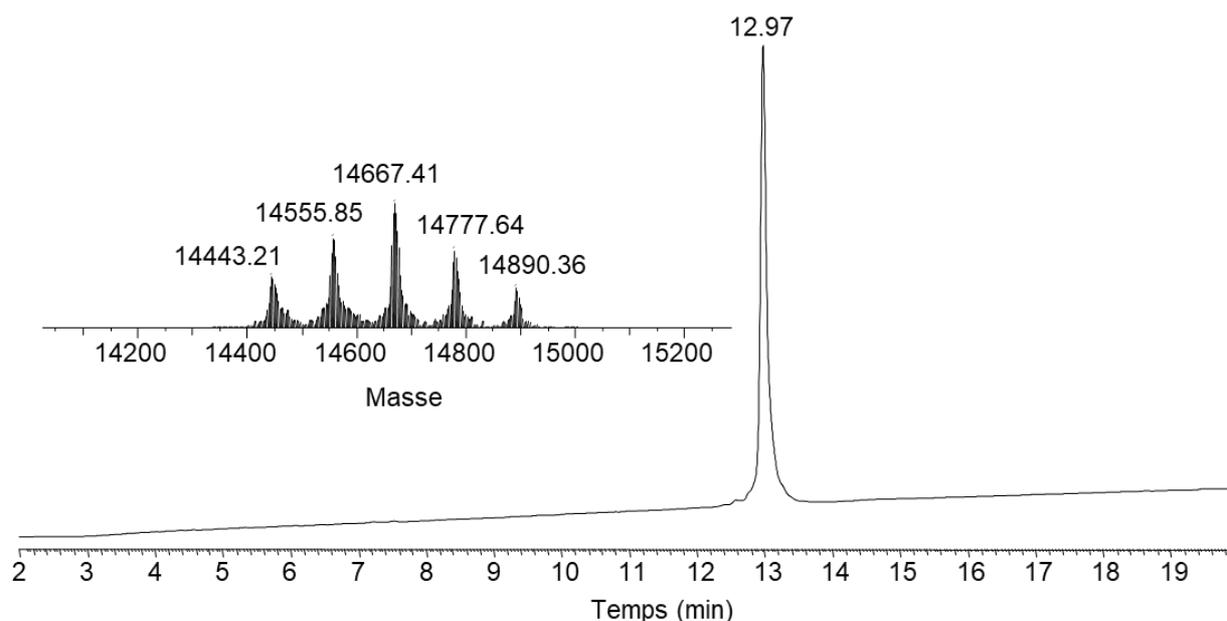


Figure 67. Analyse UPLC-MS du polypeptide **15-GN_{biot-I}**. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Spectre de masse déconvolué, m/z calculé pour [M] (moyenne) 14442.68, trouvé 14443.21 (14555.85 [M+M_{TFA}], 14667.41 [M+2M_{TFA}], 14777.64 [M+3M_{TFA}], 14890.36 [M+4M_{TFA}]).

Le repliement du polypeptide **15-GN_{biot-I}** est mené dans des conditions tout à fait identiques au repliement de la 15-GN native. Il est réalisé à 20 °C dans un tampon phosphate salin contenant 10% de glycérol, le système redox glutathion (1mM)/glutathion disulfure (0.2 mM) et 2M de chlorhydrate de guanidine comme additif solubilisant. L'évolution du milieu est suivie pendant 96 heures au bout desquelles l'état d'équilibre est atteint. Une première dialyse oxydante suivie d'une dialyse contre le tampon sans système redox ni additif de solubilisation permet d'aboutir à un profil identique à celui de la 15-GN native (Figure 69). Un mélange de deux formes repliées **15-GN_{biot-f1}** et **-f2** est isolé. L'analyse protéomique de chacune d'elle révèle dans les deux cas la présence des ponts disulfure Cys69-Cys132 et Cys96-Cys107 stabilisant le domaine saposin-like (Figure 68). Comme pour la 15-GN native, la forme majoritaire **15-GN-f2** dispose d'un pont disulfure cyclisant le motif Cys-Pro-Cys et dans le cas de la forme minoritaire **15-GN-f1**, une de ces deux cystéines est liée par pont disulfure à la Cys138.



Figure 68. Repliement du polypeptide **15-GN_{biot}-I**. A) **15-GN_{biot}-I** est replié en présence du système redox glutathion (GSH)/glutathion disulfure (GSSG), dialysé contre un tampon oxydant puis contre un tampon phosphate à pH 7,4 contenant 10%-vol de glycérol B) Patron des ponts disulfure des formes **15-GN_{biot}-f1** et **-f2**.

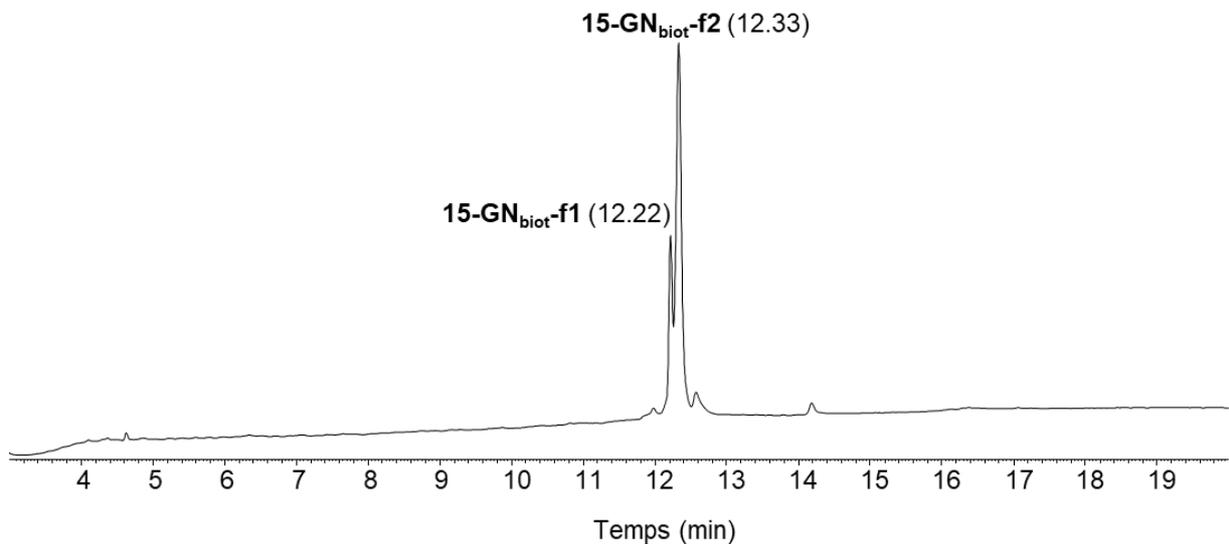


Figure 69. Analyse UPLC de la protéine **15-GN_{biot}-f** purifiée. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm.

1.2. Caractérisation structurale

Le repliement du polypeptide **15-GN_{biot-f}** permet, comme pour la protéine native, d'obtenir un mélange de deux formes repliées présentant la même distribution de leurs ponts disulfure. L'introduction d'une lysine biotinylée en position C-terminale n'a donc pas impacté le processus de repliement oxydant. En vue d'utiliser **15-GN_{biot-f}** comme un analogue marqué de la 15-GN, il est impératif de s'assurer que l'introduction du tag biotine n'a pas d'impact sur sa structure secondaire. Pour cela, le spectre de dichroïsme circulaire de **15-GN_{biot-f}** a été enregistré, il est présenté en Figure 70 en comparaison avec le spectre de la protéine native.

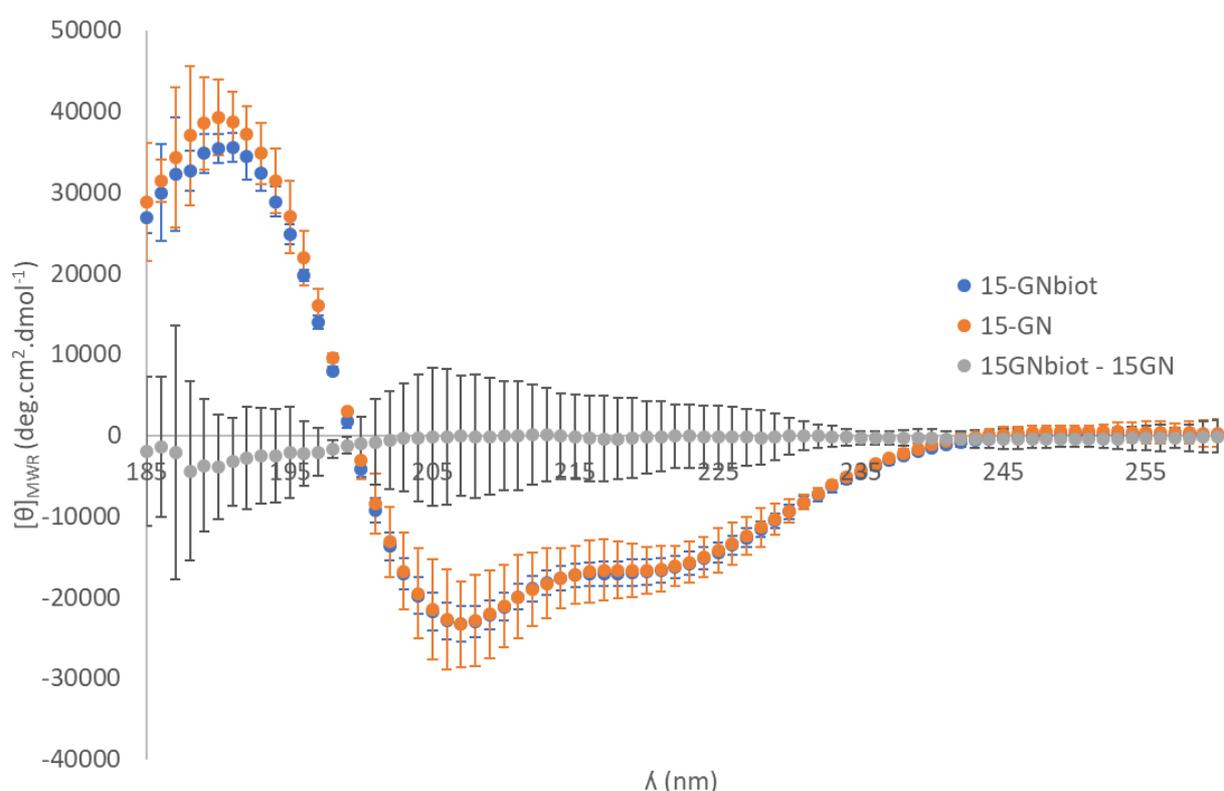


Figure 70. Comparaison des spectres de dichroïsme circulaire de **15-GN_{biot-f}** et **15-GN-f**. **15-GN_{biot-f}** est dissout à 17,4 μM dans un tampon phosphate à 10 mM et à pH 7,2. Le spectre est enregistré à 25 °C entre 185 et 260 nm par pas de 1 nm. Les barres d'erreurs représente l'intervalle de confiance à 95% calculé à partir de trois répliqués.

Hormis dans la zone relativement bruitée des faibles longueurs d'onde, les spectres de **15-GN-f** et **15-GN_{biot-f}** se superposent parfaitement. La courbe grise présentant la soustraction des deux spectres oscille d'ailleurs entre des valeurs négligeables de $[\theta]_{MWR}$ au-delà de 200 nm. Tout ceci confirme que les structures secondaires caractéristiques de la 15-GN repliée sont

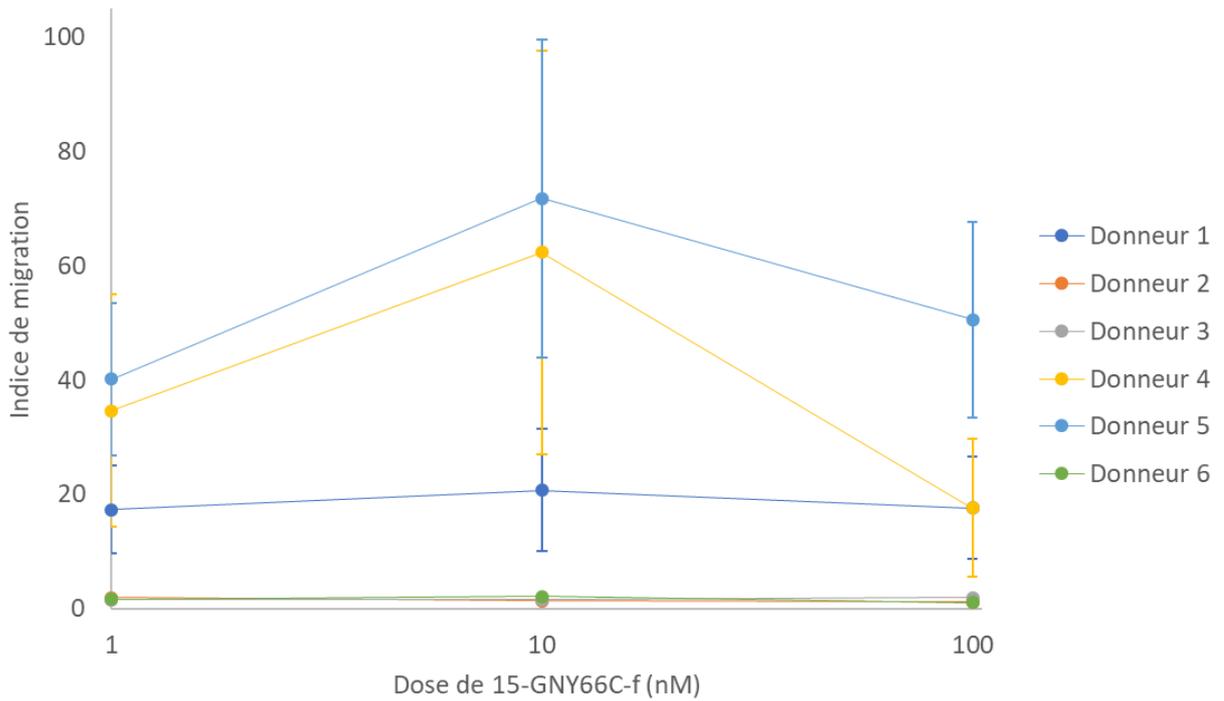
conservées dans **15-GN_{biot}-f**, et ce malgré l'introduction d'une lysine biotinylée à l'extrémité C-terminale.

1.3. Activité biologique

Plusieurs fois dans ce manuscrit nous avons rappelé que la présence d'un tag dans la séquence de la 15-GN pouvait avoir un effet délétère sur sa fonctionnalité. Les auteurs qui discutent ce phénomène s'appuient sur les différences d'activité biologiques observées entre une protéine de séquence native et des protéines portant des tags poly-histidines ou GFP. La taille du tag Lys-biotine introduit dans l'analogue 15-GN_{biot} est largement inférieure et nous pouvons espérer que son introduction ne modifie pas les activités biologiques de la protéine.

Pour le vérifier, la fonctionnalité de **15-GN_{biot}-f** a également été testée en comparant son activité chimiotactique à celle de la protéine native. Comme précédemment la migration des monocytes de 6 donneurs a été mesurée en réponse à cet analogue (Figure 71). L'indice de migration moyen face à **15-GN_{biot}-f** est présenté en Figure 71 B en relation avec celui observé pour **15-GN-f**.

A)



B)

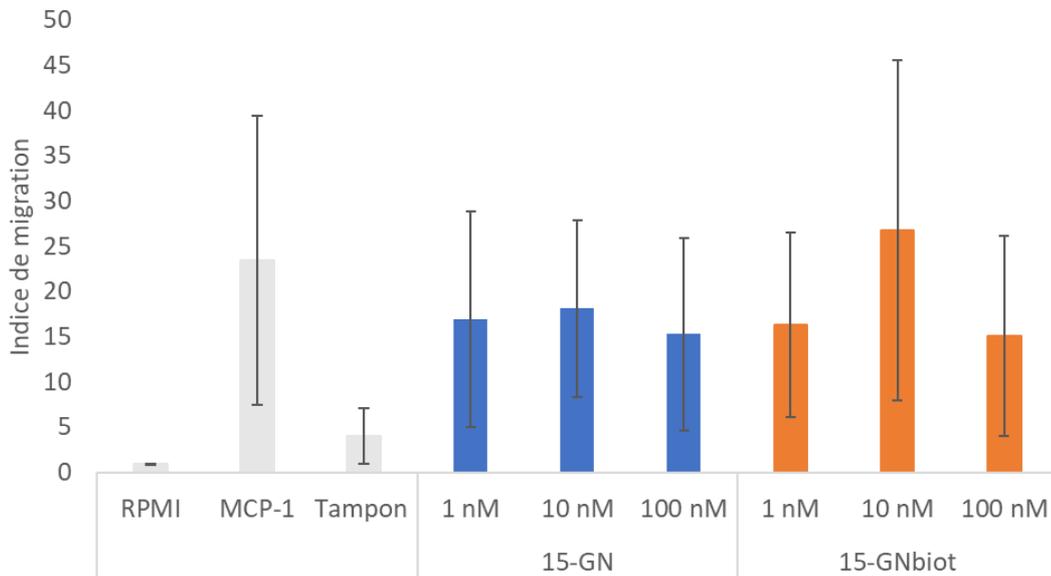


Figure 71. Activité chimiotactique de **15-GN_{biot}-f** sur des monocytes primaires après 1 heure d'incubation. Les données sont exprimées par rapport à la migration observé dans le milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté par 0.1% de sérum de veau fœtal. A) Dose-réponse à **15-GN_{biot}-f** (0-100 nM) pour 6 donneurs. Les expériences ont été répétées 9 fois et les résultats sont présentés sous la forme moyenne \pm écart type. B) Moyenne de l'indice de migration pour chaque dose de **15-GN-f** et **15-GN_{biot}-f**. MCP-1 est utilisé comme contrôlé positif à 23 nM.

Comme **15-GN-f**, **15-GN_{biot}-f** induit la migration des monocytes à de faibles concentrations nanomolaires. L'analogue biotinylé présente également une courbe de dose-réponse en cloche typique de l'activité chimiotactique de la 15-GN avec une réponse maximale autour de 10 nM (Figure 71 B). Ces données démontrent donc la pleine fonctionnalité de notre analogue marqué. En considérant l'identité des profils de repliement des 15-GN et 15-GN_{biot}, l'identité de leur spectre de dichroïsme circulaire ainsi que de leur activité chimiotactique, nous pouvons affirmer que l'introduction du tag Lys-biotine à l'extrémité C-terminale de la 15-GN n'impacte ni sa structure ni ses fonctions. Cet analogue devient donc un outil précieux pour la recherche du ou des récepteurs à la 15-GN.

2. Confirmation de l'existence d'un ou plusieurs partenaires de liaison

2.1. Cytométrie en flux

Les premières expériences mettant à contribution l'analogue 15-GN_{biot} ont été des essais de cytométrie en flux. La cytométrie en flux est une technique permettant la mesure simultanée de nombreux paramètres physiques d'une unique cellule comme sa taille ou sa granulométrie par exemple à mesure que les cellules en suspension sont envoyées une à une dans la chambre d'analyse.²⁷⁴ Son fonctionnement dépend des propriétés de diffusion de la lumière de la cellule analysée. Et celles-ci peuvent découler de la présence de marqueurs fluorescents ou d'anticorps marqués liant spécifiquement une molécule en surface ou à l'intérieur de la cellule.

Supposons que les cellules immunitaires portent bel et bien en surface un ou des récepteurs à la 15-GN. Lors d'une phase d'incubation avec la 15-GN, un lien se crée entre la protéine et cette/ces molécules en surface. **15-GN_{biot}-f** portant un motif biotine, elle peut ensuite être spécifiquement reconnue par une streptavidine conjuguée à un marqueur fluorescent. Tout ceci conduit alors au marquage spécifique du ou des récepteurs d'intérêt s'ils existent (Figure 72).

²⁷⁴ Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. *Crit Rev Biotechnol*, **2017**; 37, 163–176.

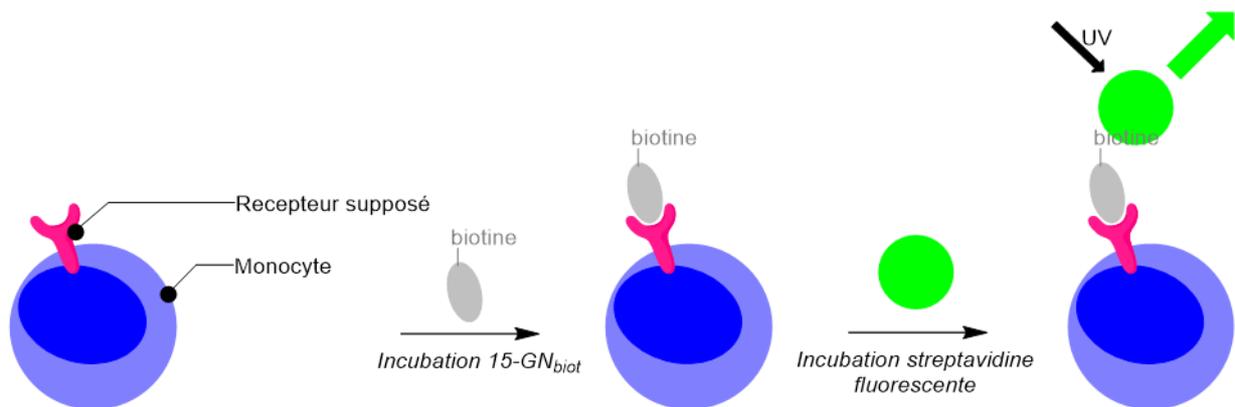


Figure 72. Principe du marquage fluorescent du supposé récepteur à la 15-GN par un complexe 15-GNbiot/streptavidine fluorescente.

Ces expériences de cytométrie en flux ont été conduites sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+, les lymphocytes B et les monocytes purifiés du sang d'un donneur ainsi que sur les lignées monocytiques THP-1 et U-937 (Figure 73). La Figure 74 regroupe les mêmes expériences menées sur les monocytes de trois donneurs individuels. L'intensité de fluorescence est reportée sur l'axe des abscisses tandis que l'axe des ordonnées représente le nombre de cellules.

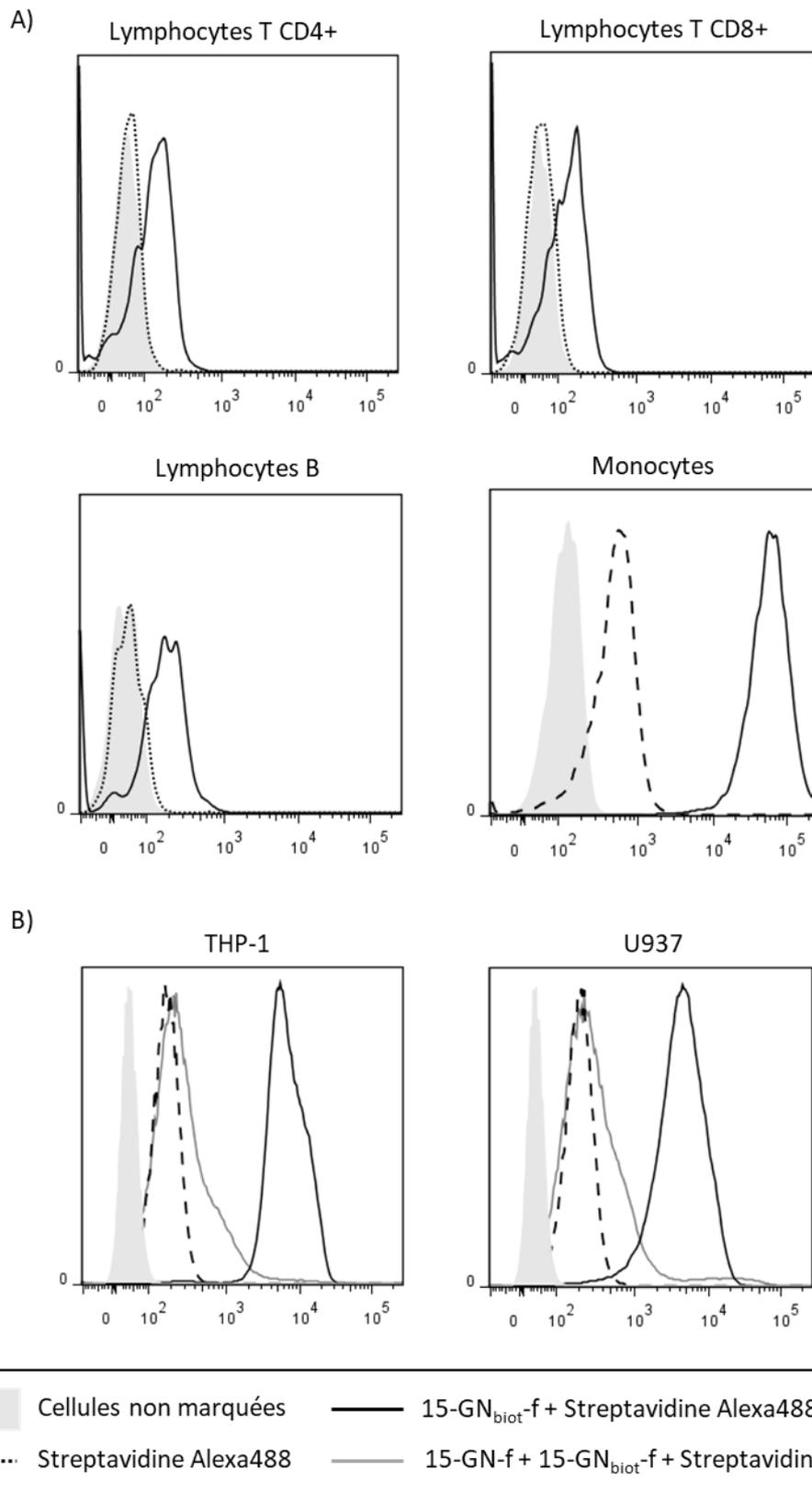


Figure 73. A) Marquage surfacique par **15-GN_{biot}-f** observé par cytométrie en flux sur des lymphocytes T CD4+, CD8+, des lymphocytes B et des monocytes isolés des cellules mononucléées sanguine périphériques. B) Test de compétition avec **15-GN-f** sur les lignées monocytiques THP-1 et U-937.

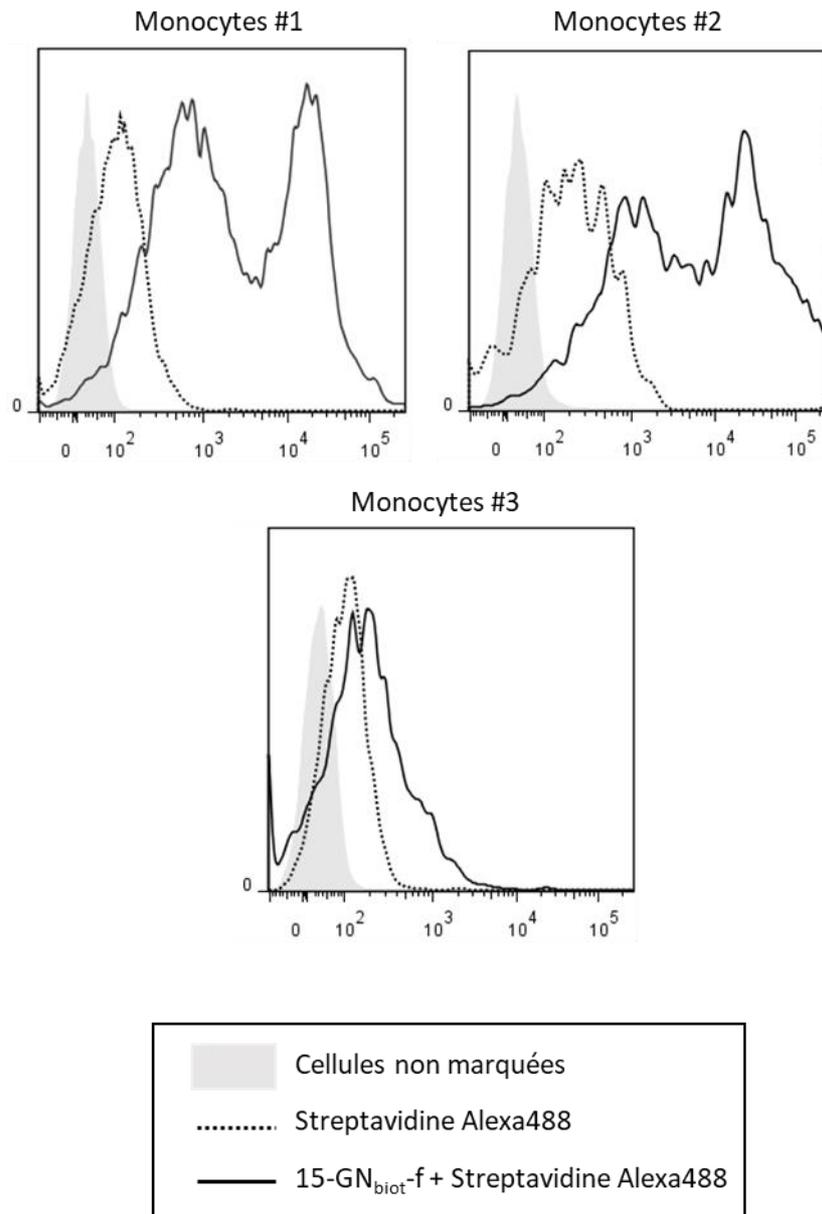


Figure 74. Marquage surfacique par **15-GN_{biot-f}** observé par cytométrie en flux sur des monocytes isolés des cellules mononucléées sanguine périphériques de trois donneurs individuels.

Pour chacune des populations cellulaires considérées, l'intensité de fluorescence augmente fortement lorsqu'elles sont incubées avec le complexe **15-GN_{biot-f}/Streptavidine AlexaFluor488**. Ce marquage est nettement supérieur au marquage non spécifique par la Streptavidine fluorescente seule illustré par la courbe en pointillé. De plus, lorsque les cellules THP-1 et U-937 sont en premier lieu incubées avec un large excès de granulysine native (courbe trait plein gris, Figure 73 B), l'intensité de fluorescence revient au niveau du marquage non-spécifique par la streptavidine seule. Ce premier traitement par la granulysine native

permet donc de saturer tous les sites de liaison possibles. La 15-GN biotinylée ne peut donc plus se lier en surface des cellules et mécaniquement, l'intensité de fluorescence revient à son niveau non-spécifique. Par ailleurs toutes les cellules sont fixées au formaldéhyde avant les différentes incubations. La liaison de la 15-GN à sa/ses cibles n'est donc possible qu'en surface des cellules. Ces observations viennent appuyer l'existence d'une liaison spécifique de la 15-GN à la surface de ces cellules immunitaires.

2.2. Fractionnement cellulaire

L'analogue biotinylé **15-GN_{biot}-f** a également été utilisé dans des expériences de fractionnement cellulaire dans le but de confirmer sa liaison à une molécule membranaire. Pour cela, les constituants d'un lysat de THP-1 préalablement incubées avec **15-GN_{biot}-f** sont séparés par centrifugation sur un gradient de sucrose. Cette technique consiste à séparer les protéines et complexes protéiques à travers un gradient de densité et sous l'effet de la centrifugation. Les molécules individuelles et les complexes stables sont résolus sur le gradient par leur vitesse de sédimentation lorsque l'échantillon est placé au-dessus du gradient ou de flottaison lorsqu'il est placé en dessous. En plus de la force centrifuge, la masse, la forme, la densité et le taux d'hydratation sont autant de paramètres qui influent sur ces vitesses et permettent ainsi la séparation des constituants du lysat.²⁷⁵ A l'issue de la centrifugation, le gradient est collecté par fraction et chacune d'elles est analysée par Western blot. La présence de marqueurs connus des différents compartiments cellulaires nous renseigne alors sur le caractère membranaire, cytosolique ou nucléaire de chacune des fractions.

Pour maximiser la durée de vie de l'interaction entre **15-GN_{biot}-f** et sa/ses cibles, les THP-1 sont lysées mécaniquement par plusieurs passages dans une aiguille. La séparation est ici réalisée par sédimentation puisqu'elle nécessite une centrifugation bien plus courte que par flottaison. L'analyse en Western blot des 9 fractions collectées après centrifugation est présentée en Figure 75. Les fractions sont numérotées par ordre croissant de densité.

²⁷⁵ Völkl A. Encyclopedia of Life Sciences (ELS) John Wiley & Sons, Ltd; Chichester: 2010. Ultracentrifugation.

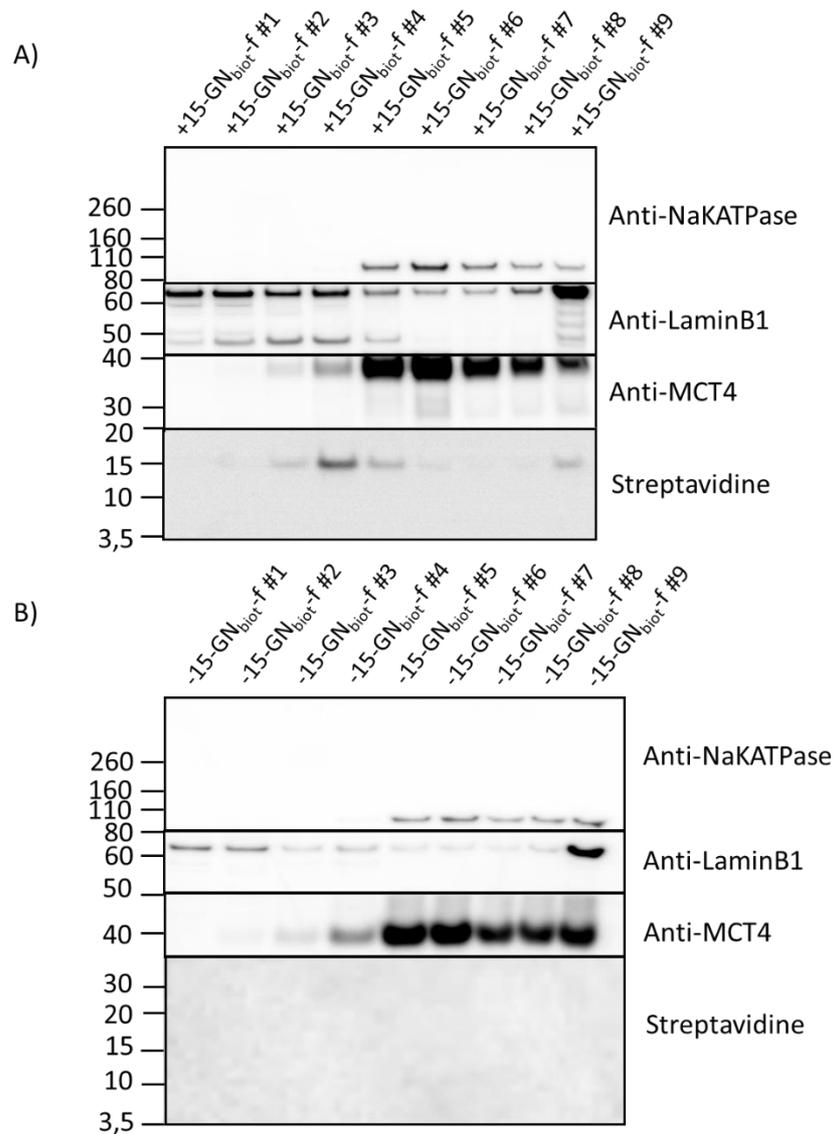


Figure 75. A) Analyse Western blot du fractionnement sur gradient de sucrose d'un lysat mécaniques de THP-1 préalablement incubés avec 15-GN_{biot}-f. B) Contrôle négatif, analyse Western blot du fractionnement sur gradient de sucrose d'un lysat mécaniques de THP-1.

Dans l'échantillon +15-GN_{biot}, la streptavidine révèle une bande à 15 kDa. Cette bande est absente de l'échantillon -15-GN_{biot}, le marquage de **15-GN_{biot}-f** par la streptavidine est donc spécifique. L'expérience démontre ainsi la présence de la 15-GN_{biot} dans les fractions 3 à 5 du lysat +15-GN_{biot}. C'est d'ailleurs dans ces fractions que commence à apparaître des bandes révélées par des anticorps dirigés contre Na/K ATPase et MCT4, deux protéines membranaires. La lamine B1 est quant à elle une protéine nucléaire dense et présente en majorité dans la dernière fraction. Sa présence dans les premières fractions témoigne de la

présence dans le lysat de cellules intactes. **15-GN_{biot}-f** est donc présente dans des fractions essentiellement membranaires. Il s'agit là d'un nouvel élément montrant l'existence d'interactions entre la 15-GN et une ou plusieurs molécules membranaires.

2.3. Microscopie confocale

Les résultats de cytométrie en flux et de fractionnement cellulaire ont ouvert la voie à la visualisation des interactions de la 15-GN à la surface des cellules immunitaires par microscopie confocale. Des THP-1, U-937 et des monocytes humains purifiés sont fixés puis incubés 30 minutes avec le complexe **15-GN_{biot}-f**/Streptavidine AlexaFluor488. Les noyaux des cellules sont également marqués au DAPI. Les images sont présentées en Figure 76 et Figure 77.

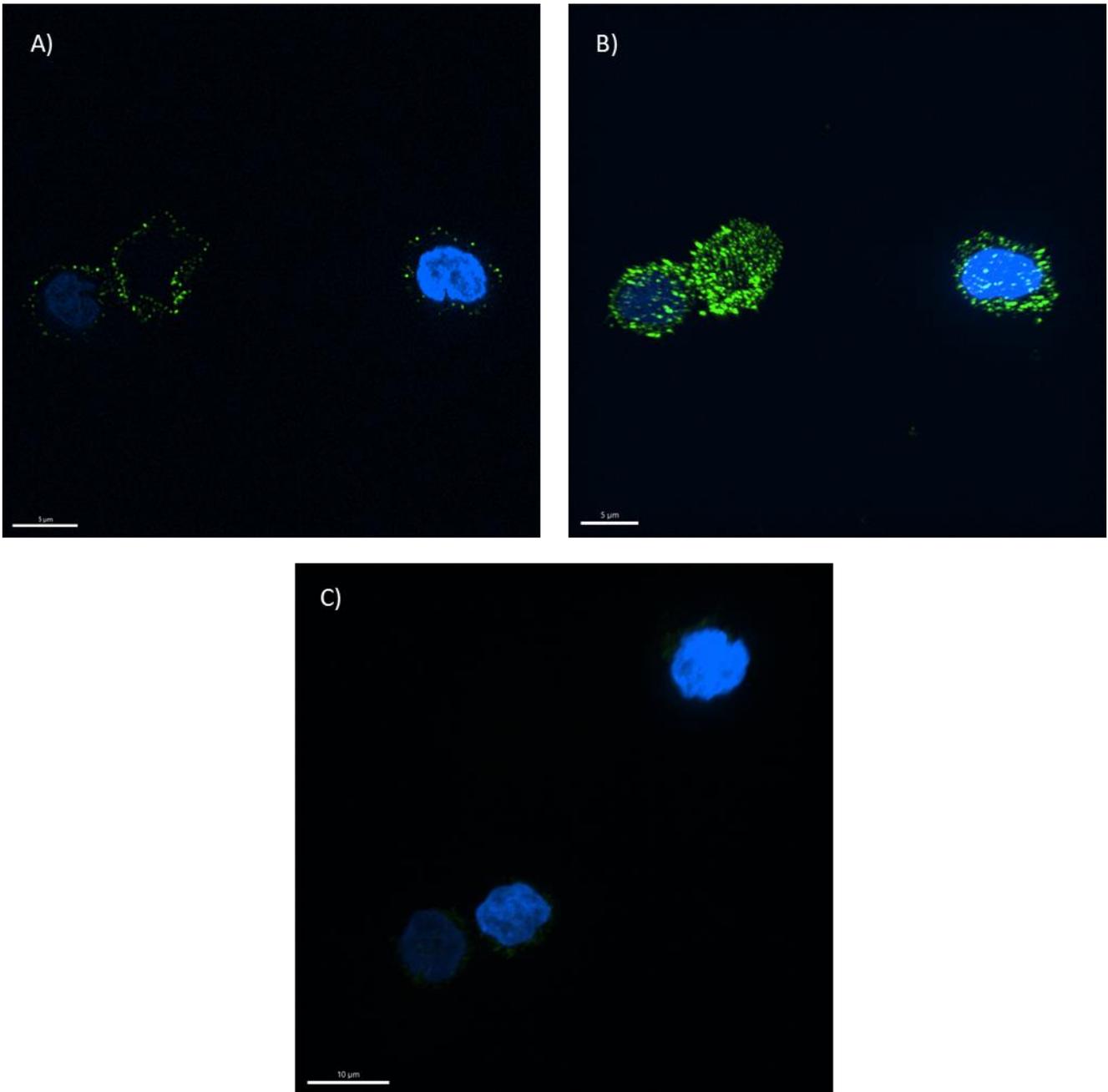


Figure 76. Images en microscopie confocale de THP-1 traitées par le complexe **15-GN_{biot-f}/Streptavidine AlexaFluor488**. A) Capture d'un unique plan focal. B) Reconstruction 3D de la pile d'images. C) Reconstruction 3D pour des THP-1 traitées uniquement par la Streptavidine AlexaFluor488

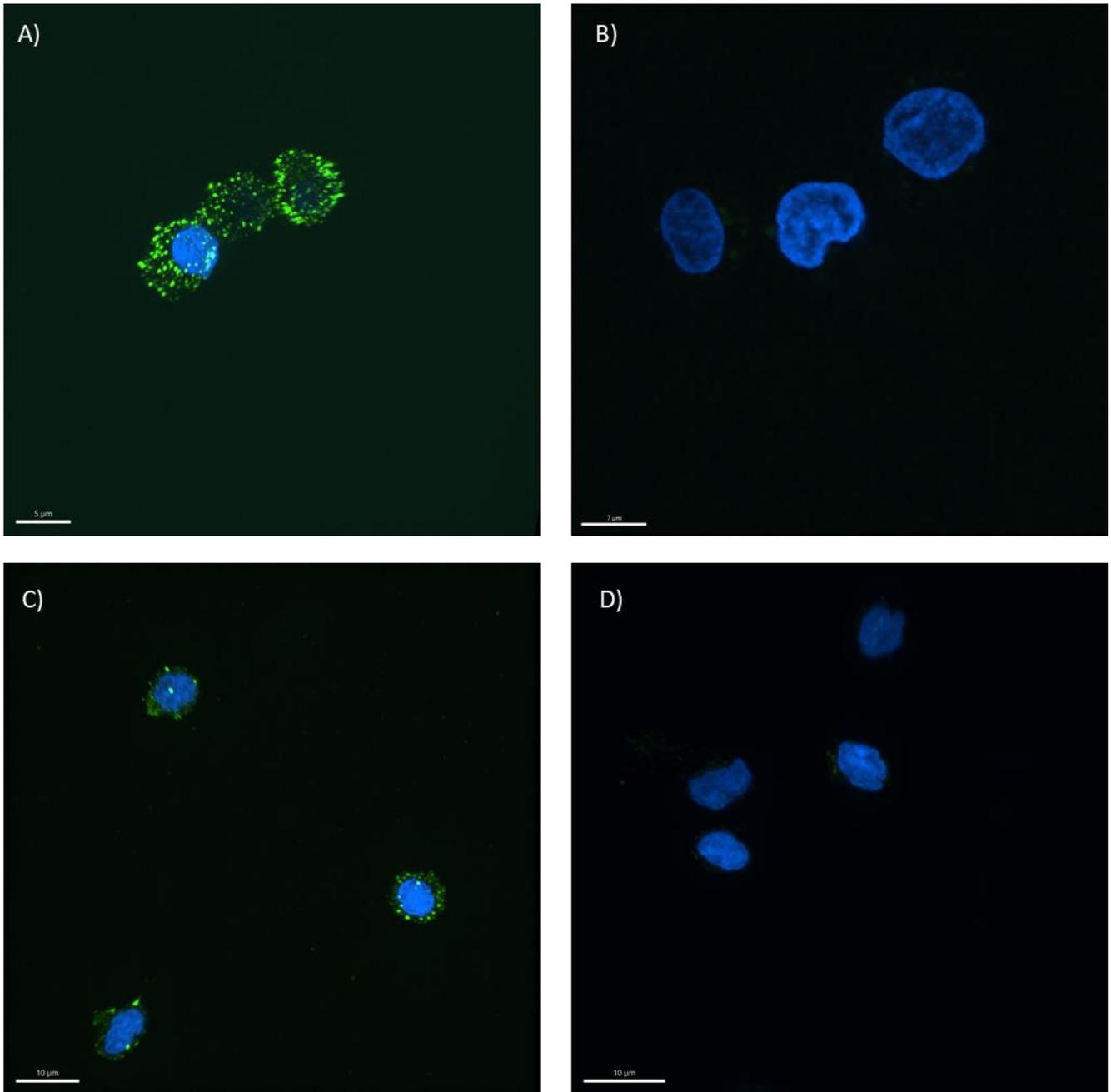


Figure 77. A) Reconstruction 3D pour des U-937 traitées par le complexe **15-GN_{biot-f}**/Streptavidine AlexaFluor488. B) Reconstruction 3D pour des U-937 traitées par la Streptavidine AlexaFluor488. C) Reconstruction 3D pour des monocytes humains purifiés traités par le complexe **15-GN_{biot-f}**/Streptavidine AlexaFluor488. D) Reconstruction 3D pour des monocytes humains purifiés traités par la Streptavidine AlexaFluor488.

Pour chacune des populations cellulaires considérées, le traitement par le complexe **15-GN_{biot-f}**/Streptavidine AlexaFluor488 permet un marquage ponctuel et en périphérie de la cellule. Aucune coloration n'est observée après incubation des cellules avec la streptavidine fluorescente seule. La spécificité du marquage par la **15-GN_{biot-f}** est donc ici confirmée. Pour attester de la localisation du marquage dans la membrane, des THP-1 sont également traitées

par la Concanavaline A AlexaFluor594 après le marquage par **15-GN_{biot-f}**/Streptavidine (Figure 78 et Figure 79)

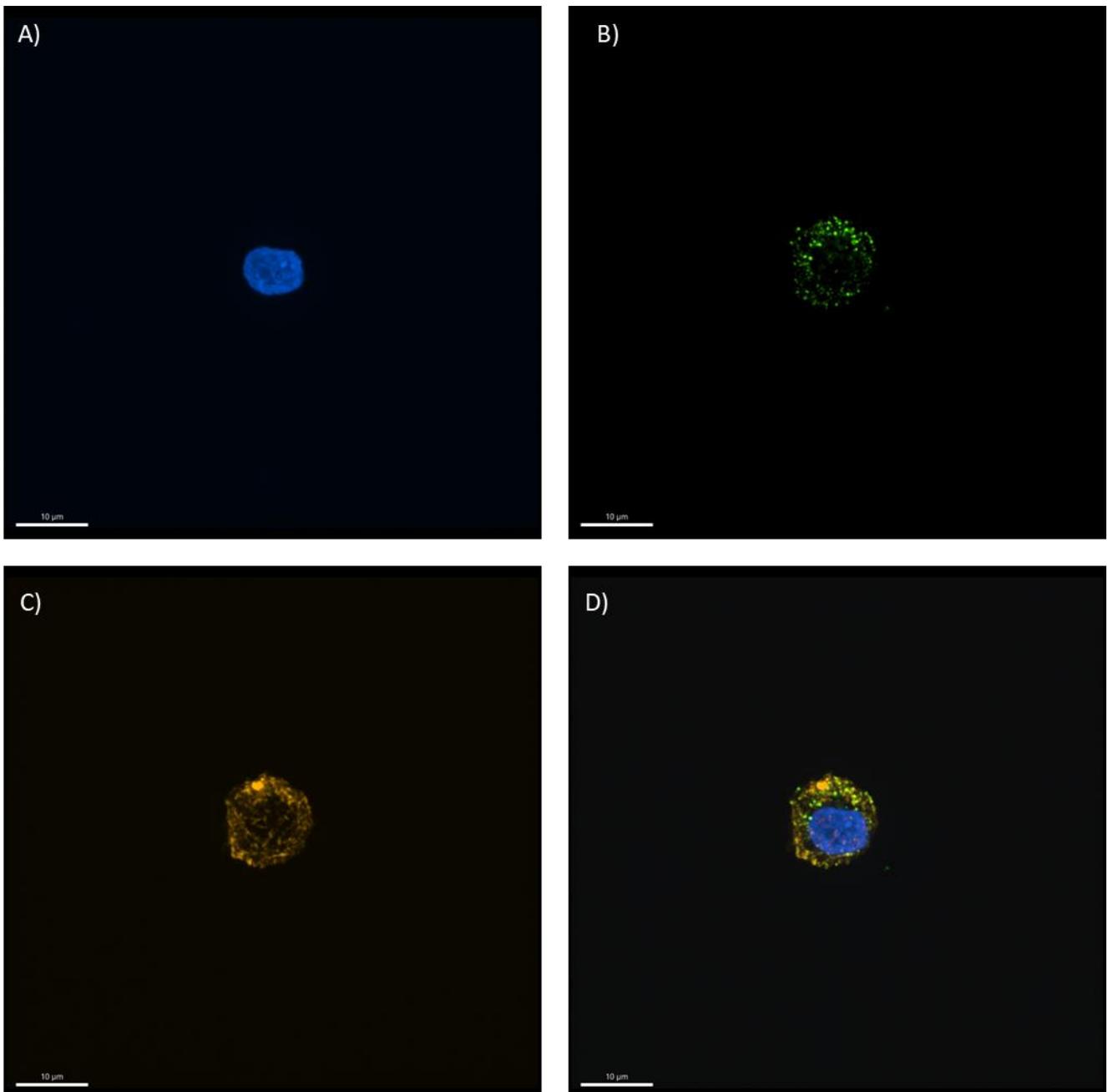


Figure 78. Images en microscopie confocale de THP-1 pour la localisation du marquage par **15-GN_{biot-f}** dans la membrane plasmique. A) Reconstruction 3D du canal 405 nm (DAPI) B) Reconstruction 3D du canal 488 nm (**15-GN_{biot-f}**/Streptavidine AlexaFluor488) C) Reconstruction 3D du canal 561 nm (Concanavaline A AlexaFluor594) D) Superposition des images A, B et C.

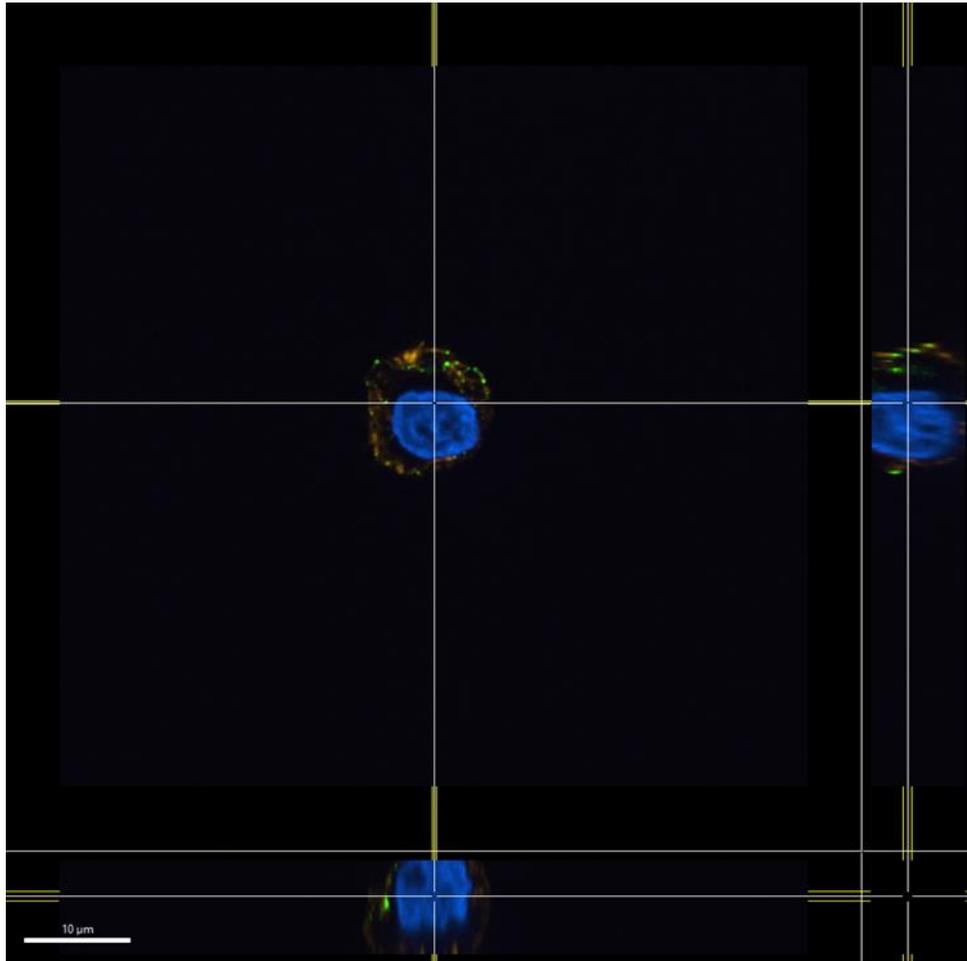


Figure 79. Coupes orthogonales de la superposition présentée en Figure 78

L'examen des coupes montre la localisation du marquage vert dans la membrane marquée en rouge. La 15-GN interagit donc bien avec une ou plusieurs cibles exprimées en surface des cellules immunitaires. Pour commencer à collecter quelques données en vue d'identifier ces partenaires d'interaction, les THP-1 et U-937 sont différenciées en macrophages par traitement au PMA. Après incubation avec le complexe **15-GN_{biot-f}**/streptavidine AlexaFluor488, de nouvelles images sont capturées (Figure 80).

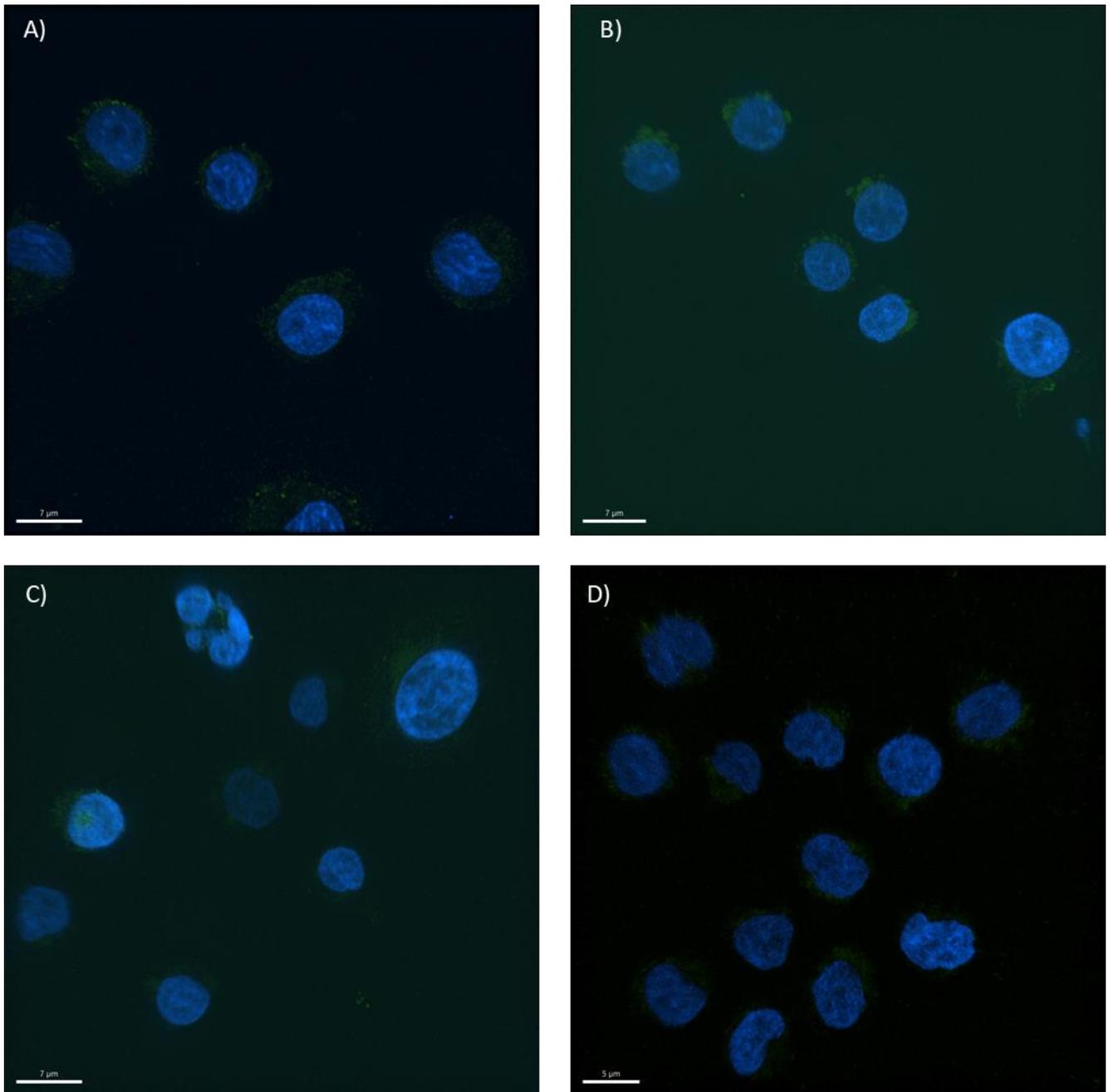


Figure 80. A) Reconstruction 3D pour des THP-1 différenciées par traitement au PMA puis incubées avec le complexe **15-GN_{biot-f}/Streptavidine AlexaFluor488**. B) Reconstruction 3D pour des THP-1 différenciées par traitement au PMA puis incubées avec la Streptavidine AlexaFluor488. C) Reconstruction 3D pour des U-937 différenciées par traitement au PMA puis incubées avec le complexe **15-GN_{biot-f}/Streptavidine AlexaFluor488**. D) Reconstruction 3D pour des U-937 différenciées par traitement au PMA puis incubées avec la Streptavidine AlexaFluor488.

Notons ici la complète disparition du marquage par la 15-GN après différenciation. Ceci pourrait indiquer que le ou les partenaires d'interaction mis en lumière dans les premières expériences ne sont plus exprimés par les lignées monocytiques différenciées. L'ensemble des images collectées jusqu'ici montrent également que nous disposons d'une méthode fiable de préparation d'échantillons pour l'imagerie confocale. Cette technique peut par conséquent être utilisée pour l'identification du/des partenaires de liaison de la 15-GN au moyen d'expériences de colocalisation. Dans ce sens, la colocalisation entre la 15-GN et le récepteur TLR4 a été testé (Figure 81). Pour cela, TLR4 est immunolocalisé grâce à un anticorps monoclonal de souris dirigé contre lui. Cet anticorps primaire est ensuite révélé par un second anticorps dirigé contre le domaine Fc de l'anticorps primaire et conjugué au fluorophore AlexaFluor594. L'immunomarquage nécessite toutefois une légère adaptation du protocole de préparation d'échantillons. Pour réduire au maximum le marquage aspécifique par les deux anticorps une étape de blocage intervenant après la fixation est nécessaire. Plusieurs protéines sacrificielles ont été testées à cet effet. L'incubation des cellules dans du PBS 1% BSA, une protéine traditionnellement utilisée pour le blocage, conduit malheureusement à une suppression totale du marquage par la 15-GN. Aucune différence d'intensité n'est cependant constatée entre des cellules non bloquées et bloquées par 1% de caséine dans du PBS. La caséine est donc choisie comme protéine de blocage mais rien à ce jour ne permet d'expliquer l'absence de marquage après traitement par la BSA.

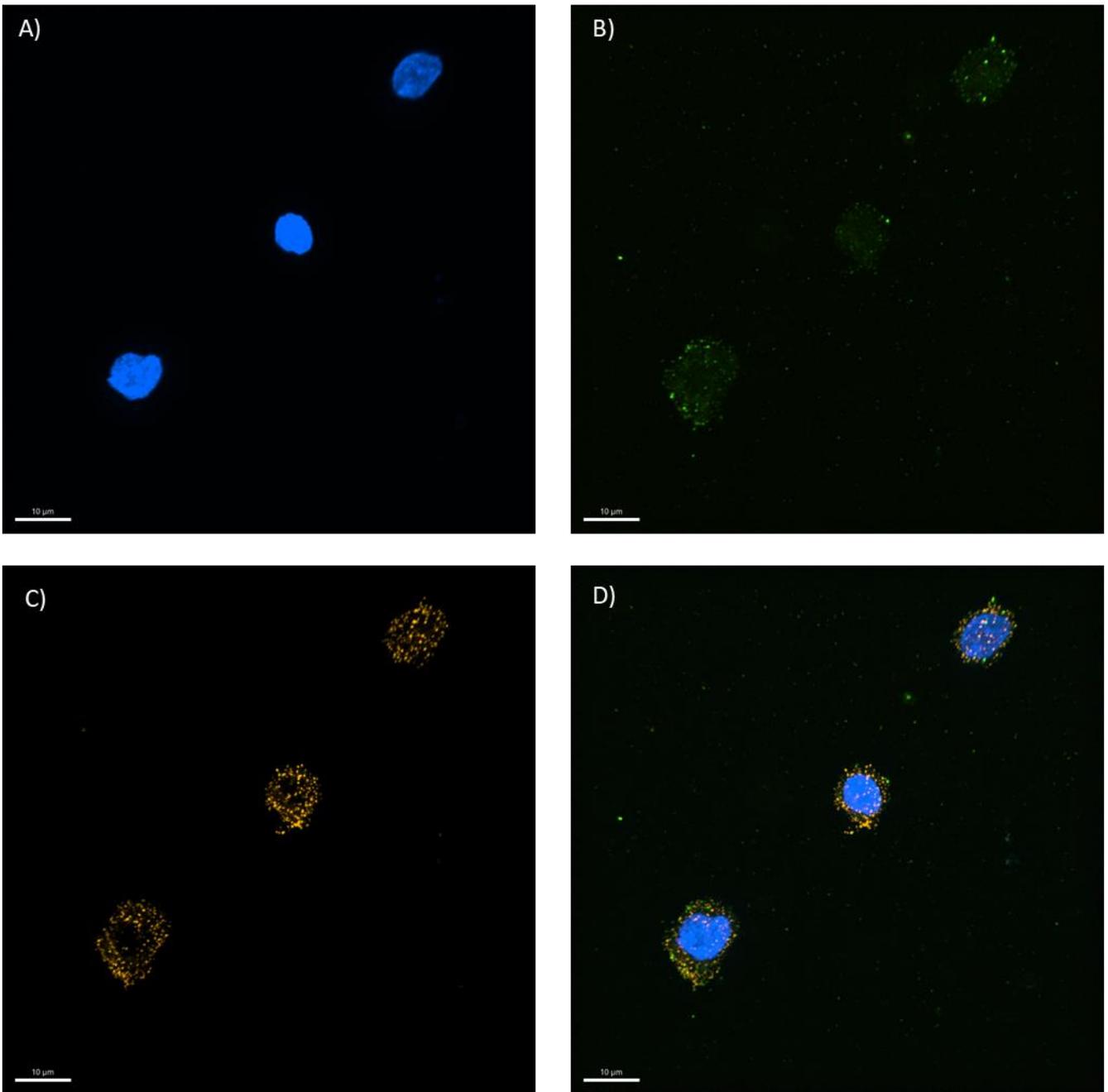


Figure 81. Images en microscopie confocale de THP-1 pour colocalisation entre **15-GN_{biot-f}** et TLR4. A) Marquage au DAPI. B) Marquage par le complexe **15-GN_{biot-f}**/streptavidine AlexaFluor488. C) Marquage par un anti-TLR4 révélé par un anti-Souris AlexaFluor 594. D) Superposition des images A, B et C.

Les images montrent que le récepteur TLR4 est bien exprimé par ces deux lignées. La superposition des canaux verts et rouges ne semble toutefois pas révéler de colocalisation totale entre ce récepteur et **15-GN_{biot-f}**. Un calcul du pourcentage de colocalisation sur 5 et 6 cellules respectivement fournit les valeurs de $(21 \pm 3)\%$ pour les THP-1 et $(39 \pm 5)\%$ pour les U-937. Le traitement d'image et le détail du calcul de colocalisation est présenté au paragraphe

9 de l'annexe 1. Il existe donc une colocalisation non négligeable entre **15-GN_{biot-f}** et TLR4, elle n'est cependant pas totale. Il n'est donc pas à exclure que TLR4 fasse partie des molécules interagissant avec la 15-GN comme l'avait montré Tewari *et al.*. D'autres interactions spécifiques sont cependant révélées par ces images nous conduisant à rechercher d'autres partenaires d'interaction de la 15-GN.

3. Recherche de nouveaux partenaires d'interaction

L'analogue biotinylé **15-GN_{biot-f}** a une nouvelle fois été mis à contribution pour des expériences de pull down. Le pull-down est une méthode *in vitro* permettant d'attester de l'interaction physique entre au moins deux protéines. Ces expériences sont particulièrement utiles pour confirmer l'existence d'interactions protéine-protéine mais également comme méthode de criblage initiale pour l'identification d'interactions protéine-protéine inconnues. Le pull-down est une forme de purification par affinité semblable à l'immunoprécipitation à l'exception près qu'une protéine « hameçon » est utilisée à la place d'un anticorps. Cette protéine « hameçon » taguée est immobilisée par affinité spécifique entre un support fonctionnalisé et le tag. Ce support est ensuite incubé avec des échantillons liquides contenant la supposée protéine « proie » comme des lysats cellulaires. Après plusieurs rinçages pour éliminer au maximum les protéines retenues de façon non spécifique, le support est élué selon différentes méthodes qui vont de l'utilisation d'analytes compétitifs à des gradients de pH ou de sel en passant par l'utilisation d'agents réducteurs également.

Pour notre étude, l'interaction entre la streptavidine et le tag biotine de **15-GN_{biot-f}** est exploitée pour immobiliser la 15-GN sur des billes magnétiques. Les premières tentatives conduites sur des fractions de lysat issues de centrifugation sur gradient de sucrose n'ont pas permis d'isoler de protéines interagissant avec la 15-GN préalablement immobilisée sur les billes. Les paramètres physicochimiques de tels échantillons sont en effet très éloignés de ceux des milieux physiologiques. Il n'est donc pas surprenant que l'interaction de la 15-GN avec sa cible en soit impactée. Les billes seules ont également été incubées avec des fractions d'un lysat de THP-1 préalablement traitées par le complexe **15-GN_{biot-f}/Streptavidine**. Là encore,

aucune protéine n'a pu être extraite probablement à cause des 3 heures de centrifugation nécessaires au fractionnement et auxquelles l'interaction de la 15-GN avec sa/ses cibles ne résiste pas.

C'est donc sur des lysats totaux que de nouvelles expériences de pull-down ont été conduites. Pour cela, **15-GN_{biot-f}** est d'abord immobilisée sur les billes qui sont ensuite incubées avec un lysat mécanique total de THP-1 ou U-937. Avant l'incubation le lysat est tout de même centrifugé pour le débarrasser des gros débris cellulaires et de la majorité des noyaux. Après une demi-heure d'incubation à 4°C, les billes sont lavées intensément au PBS puis éluées par un gradient de pH. Une élution au PBS permet d'éliminer le reste d'éluant acide avant une dernière élution réductrice par un tampon contenant 20 mM de TCEP. Chaque élution est analysée par SDS-PAGE révélée au nitrate d'argent. (Figure 82)

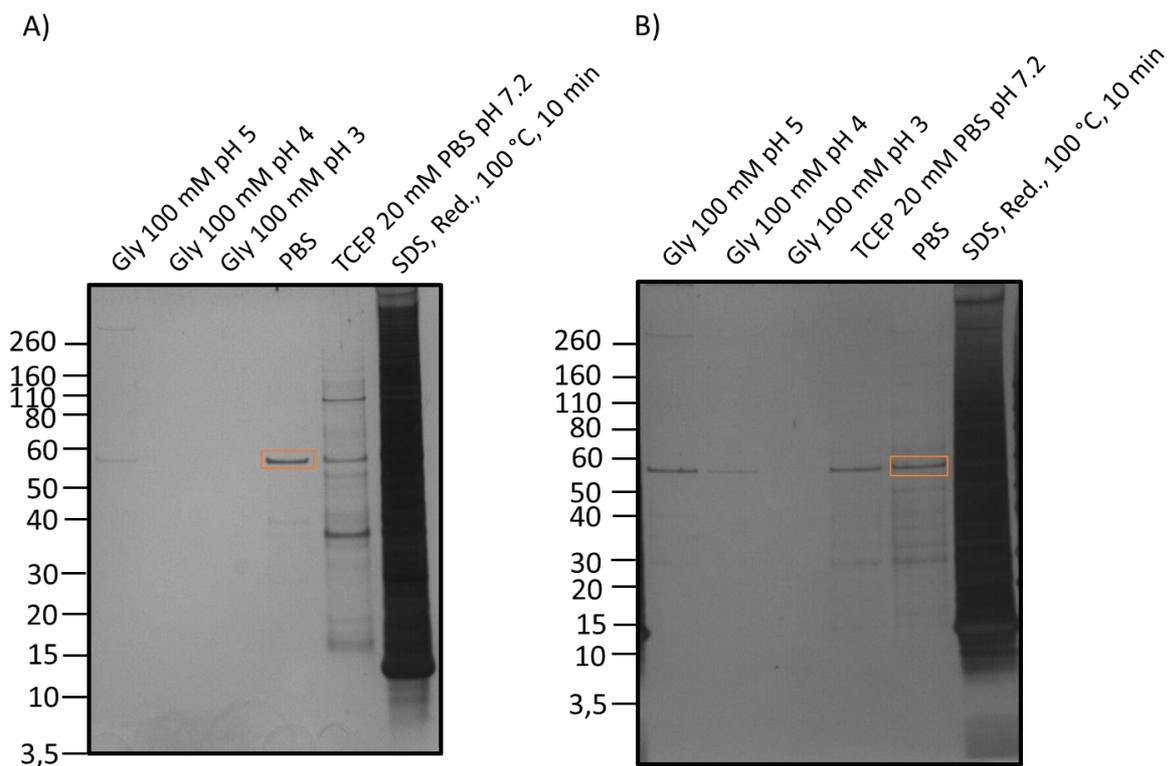


Figure 82. A) Analyse SDS-PAGE des éluats d'un pull-down sur lysat total de THP-1. B) Analyse SDS-PAGE des éluats d'un pull-down sur lysat totale de U-937. Pour les deux analyses, l'analyse protéomique de la bande encadrée en orange a conduit à l'identification de la PDI-A1.

Pour les deux lignées, l'élution au PBS a fourni une bande intense en dessous de 60 kDa. L'expérience est renouvelée et le gel d'électrophorèse est cette fois-ci coloré au bleu de

Coomassie permettant d'isoler cette bande et de procéder à sa digestion enzymatique. Aucune des autres bandes présentes sur ces deux gels n'est malheureusement assez intense pour être révélée par le bleu de Coomassie. L'analyse des peptides issues de la digestion trypsique de cette bande après réduction et alkylation des cystéines a permis d'identifier la protéine disulfure isomérase PDI-A1.

Les protéines disulfure isomérases (PDIs) constituent une famille d'oxydoréductases solubles qui catalysent l'oxydation, la réduction et l'isomérisation de ponts disulfure dans le réticulum endoplasmique.²⁷⁶ Elles disposent de 4 domaines (a, a', b et b') séparés par le linker x et auxquels s'ajoutent une région C-terminale acide contenant le signal de rétention dans le réticulum KDEL.²⁷⁷ Ces domaines s'arrangent de la manière suivante, a-b-b'-x-a'-c. Les fonctions thiol des résidus de cystéine du motif CGHC présents dans les domaines a et a' portent l'activité oxydoréductase, à savoir la catalyse de la formation de ponts disulfure ainsi que leur isomérisation pour une sélection de substrats.^{277,278,279,280} Les PDIs disposent également d'une activité de chaperon indépendamment de leur activité d'isomérase en se liant aux protéines mal repliées, empêchant ainsi leur agrégation.^{281,282} Certaines PDI ont également été identifiées à la surface des lymphocytes, des plaquettes, de cellules endothéliales, d'hépatocytes et de cellules cancéreuses. Elles catalysent alors la réduction de ponts disulfure de protéines de surface. Par exemple, la réduction des disulfures de la beta-intégrine par une PDI régule l'adhésion et la migration des plaquettes et des cellules tumorales. La conformation de protéines de fusion virale et de leur récepteur semble également altérée par les PDIs membranaires.^{283,284,285} Par exemple, la PDI-A1 forme un complexe avec HIV-gp120, CD4 et CXCR4 à la surface des lymphocyte T facilitant l'entrée du virus HIV-1 dans sa cellule cible. Cependant le mécanisme par lequel ces protéines qui portent

²⁷⁶ Freedman, R. B.; Hirst, T. R.; Tuite, M. F. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 331–336.

²⁷⁷ Hatahet, F.; Ruddock, L. W. *FEBS J.* **2007**, *274*, 5223–5234.

²⁷⁸ Hudson, D. A.; Gannon, S. A.; Thorpe, C. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *80*, 171–182.

²⁷⁹ Freedman, R. B. *Curr. Op. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 85–91.

²⁸⁰ Wang, L.; Wang, X.; Wang, C. C. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *83*, 305–313.

²⁸¹ Puig, A.; Gilbert, H. F. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7764–7771.

²⁸² Wilson, R.; Lees, J. F.; Bulleid, N. J. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9637–9643.

²⁸³ Fenouillet, E.; Barbouche, R.; Courageot, J.; Miquelis, R. *J Infect Dis* **2001**, *183*, 744–752.

²⁸⁴ Jain, S.; McGinnes, L. W.; Morrison, T. G. *J Virol* **2007**, *81*, 2328–2339.

²⁸⁵ Fenouillet, E.; Barbouche, R.; Jones, I. M. *Antioxid Redox Signal* **2007**, *9*:1009–1034.

pourtant le motif de rétention dans le réticulum se retrouvent exprimées en surface reste inconnu.

Compte tenu du comportement redox de la 15-GN dont nous avons discuté dans les chapitres précédents, l'identification de cette protéine comme un partenaire d'interaction potentiel est fort intéressante. Cette protéine dispose de domaines servant à la reconnaissance moléculaire de ses substrats, elle pourrait donc tout à fait jouer le rôle de récepteur. Ceci pourrait également être combiné à une interaction covalente par formation d'un pont disulfure avec la 15-GN. La PDI pourrait également être un partenaire d'interaction intermédiaire avant sa liaison à son récepteur. Son activité d'isomérase pourrait alors être nécessaire à la maturation des ponts disulfure pour permettre l'interaction avec ce récepteur. Une interaction avec la PDI peut également permettre de rationaliser la pluralité des activités de la 15-GN. Un arrangement donné des ponts disulfure permet peut-être la liaison à un premier récepteur et conduit à une première activité. Le réarrangement des ponts disulfure par la PDI conduirait alors à la liaison à un autre récepteur dont découle une autre activité de la 15-GN. Enfin, la PDI A1 est également connue pour catalyser la dimérisation de plusieurs protéines.^{286,287} Il est alors possible d'imaginer qu'elle puisse catalyser la dimérisation de la 15-GN. Cette réaction est thermodynamiquement favorable puisque nous avons à plusieurs reprises observé la formation de dimères lors des expériences de repliement de la 15-GN native et de certains analogues. Toutes ces considérations nous ont amené à explorer un peu plus en profondeur l'interaction entre la 15-GN et la PDI-A1.

Nous nous sommes donc procuré un anticorps monoclonal dirigé contre la PDI-A1. Sa sélectivité a été démontrée par l'analyse en Western blot des éluats d'un pull down sur lysat total de THP-1 (Figure 83). Il a ensuite été utilisé pour un essai de colocalisation avec **15-GN_{biot-f}** en microscopie confocale. Les images sont présentées en Figure 84.

²⁸⁶ Lippok, S.; Kolšek, K.; Löf, A.; Eggert, D.; Vanderlinden, W.; Müller, J. P.; König, G.; Obser, T.; Röhrs, K.; Schneppenheim, S.; Budde, U.; Baldauf, C.; Aponte-Santamaría, C.; Gräter, F.; Schneppenheim, R.; Rädler, J. O.; Brehm, M. A. *Blood* **2016**, *127*, 1183–1191.

²⁸⁷ Shi, Y.; Wang, C.; Wu, D.; Zhu, Y.; Wang, Z.; Peng, X. *Life Sciences* **2020**, *255*, 117841.

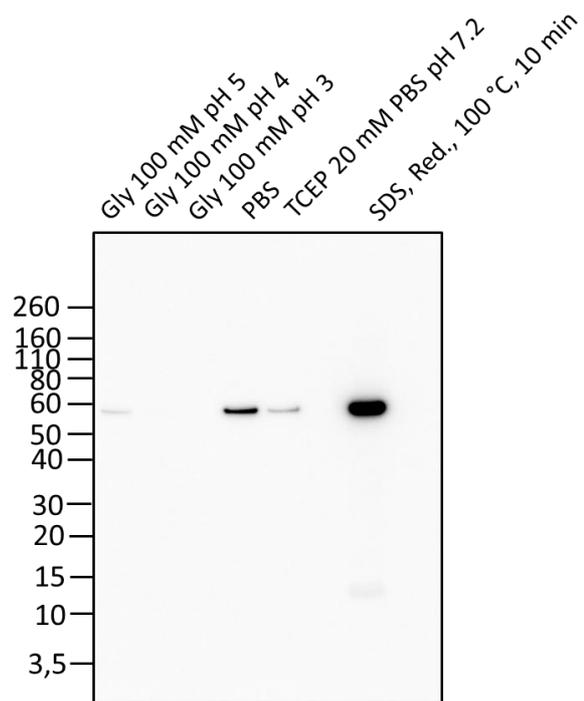


Figure 83. Analyse Western blot des éluats d'un pull-down sur lysat total de THP-1 révélée par un anti-PDI-A1.

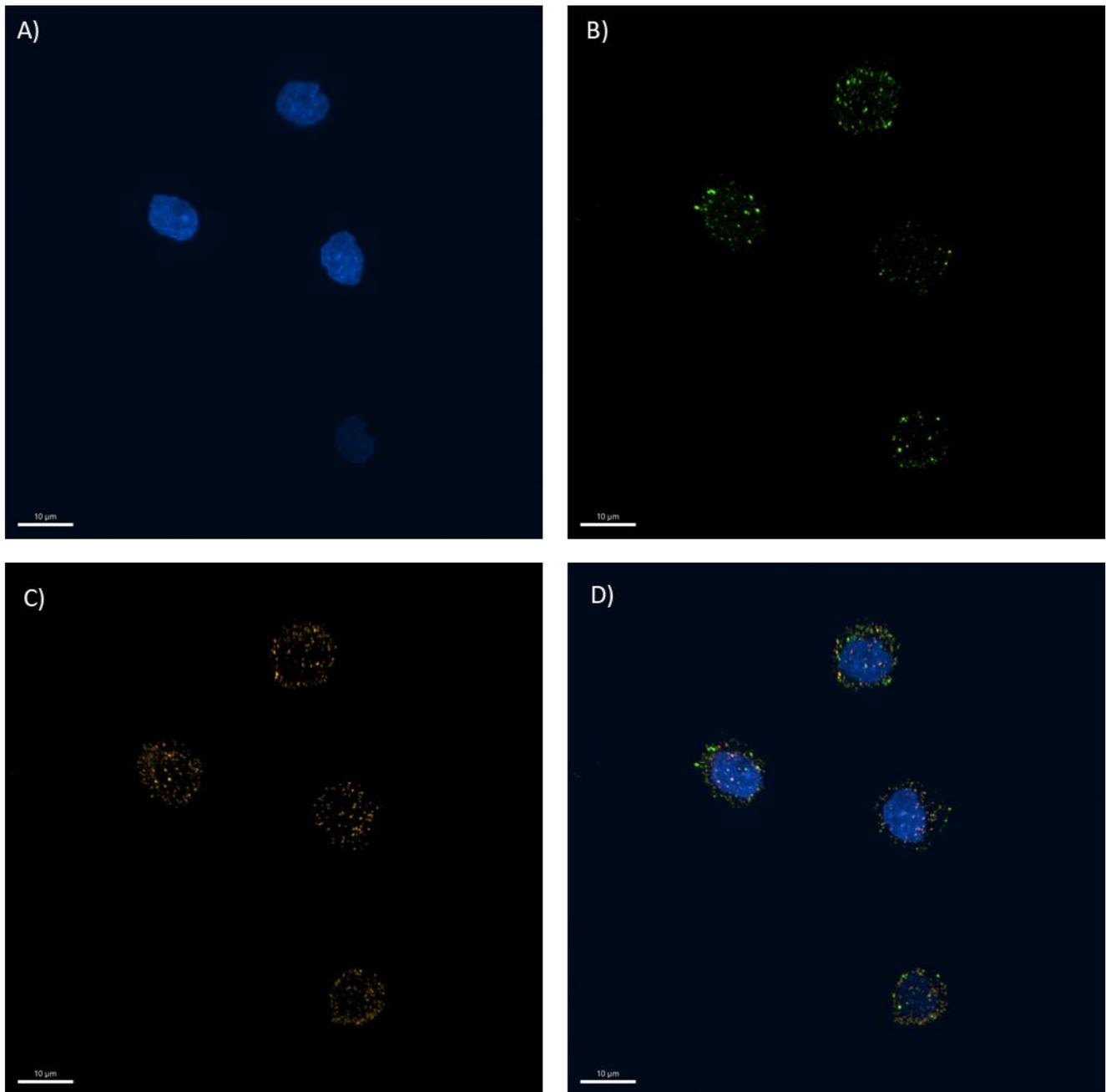


Figure 84. Images en microscopie confocale de THP-1 pour colocalisation entre **15-GN_{biot-f}** et PDI-A1. A) Marquage au DAPI. B) Marquage par le complexe 15-GN_{biot-f}/streptavidine AlexaFluor488. C) Marquage par un anti-PDI-A1 révélé par un anti-Lapin AlexaFluor 594. D) Superposition des images A, B et C.

Premièrement, ces images montrent que la PDI-A1 est exprimée en surface des THP-1 et U-937. Malheureusement, l'analyse visuelle des images suffit à elle seule pour montrer que la PDI et la 15-GN ne colocalisent pas totalement. Le calcul de colocalisation sur 8 et 9 cellules respectivement fourni d'ailleurs des valeurs de $(26\pm 5)\%$ pour les THP-1 et $(23\pm 16)\%$ pour les U-937. Le marquage observé jusqu'ici ne provient donc pas exclusivement de la liaison entre

la 15-GN et la PDI. Ces résultats tendent à montrer qu'une interaction existe entre ces deux molécules mais également que la 15-GN pourrait disposer de plusieurs partenaires d'interactions. La colocalisation observée ici doit également être relativisée par rapport aux conditions de l'expérience. Il est possible que la fixation des cellules préalable aux différentes incubations altère la fonctionnalité de la PDI. Ces images ne pourraient donc refléter que partiellement l'interaction qui existe entre ces deux molécules en conditions physiologiques. À ce stade, le même traitement par le complexe **15-GN_{biot-f}**/streptavidine AlexaFluor488 sur des cellules non fixées ne permet cependant pas d'observer un marquage par la 15-GN. Un travail d'optimisation serait ici nécessaire pour retrouver un marquage efficace dans ces conditions. L'utilisation de lignée adhérentes répondant à la granulysine pourrait également s'avérer utile. La capture d'images sur cellules vivantes serait alors possible et permettrait de s'affranchir de l'étape de fixation.

Le développement d'un procédé robuste et modulaire de synthèse chimique de la 15-GN a permis l'accès à un analogue biotinylé de la protéine sans altérer ni sa structure ni ses fonctionnalités. Il s'est révélé être un formidable outil pour la recherche de partenaires d'interaction de la 15-GN à la surface des cellules immunitaires. Grâce à lui, nous avons pu confirmer l'existence d'un ou plusieurs partenaires de liaison à la 15-GN par des expériences de cytométrie en flux, de fractionnement cellulaire et de microscopie confocale. Il est également utilisable dans des expériences d'extraction de protéines par affinité. Celles-ci ont d'ailleurs permis d'identifier la PDI-A1 comme partenaire d'interaction potentiel. Même si d'autres résultats présentés dans ce chapitre ne permettent que de confirmer partiellement l'hypothèse de leur interaction, la PDI-A1 reste une cible potentielle de la 15-GN qu'il convient de considérer sérieusement. Tout ceci ouvre la voie à de nouvelles expériences. L'analogie biotinylé pourrait par exemple être utilisé pour quantifier l'affinité de ces deux protéines par la technologie AlphaScreen[®]. La caractérisation de l'activité catalytique de la PDI sur la 15-GN native pourrait être entreprise via un suivi cinétique de la réaction en LC-MS. Des expériences de pull down sur des extraits membranaires obtenus par fractionnement chimique pourraient également être tentées. Elles permettraient d'identifier d'autres partenaires de liaison à la 15-GN. Enfin, dans les expériences de pull down rapportées ici, seule une protéine a pu être

identifiée alors que les différentes éluions en contenaient davantage. Ces protéines pourraient être identifiées au moyen d'analyses protéomiques à plus haute résolution.

Chapitre 6. Développement d'un nouveau catalyseur alkylsélénol pour la réaction d'échange thiol/thioester

1. Introduction

La chimie des thioesters revêt un caractère central dans le domaine de la synthèse totale de protéines tant l'utilisation de la ligation chimique native pour la formation chimiosélective de liens peptidiques est devenue incontournable. Seulement, la production de segments peptidiques portant une fonction thioester à leur extrémité C-terminale reste, encore aujourd'hui, une des limitations majeures de la synthèse de protéines par NCL. Par conséquent, la dernière décennie a vu se concrétiser d'intenses efforts pour faciliter l'accès aux peptides thioesters par Fmoc-SPPS. Les progrès réalisés dans ce domaine permettent d'ailleurs d'expliquer en partie l'accroissement rapide du nombre de protéines d'intérêt biologique assemblées depuis 2010.^{288,289} Un ensemble de méthodes ayant contribué au progrès de la synthèse chimique de protéines exploite la capacité du groupement *N*-(2-mercaptoethyl)amide à se réarranger spontanément en thioester en milieu aqueux. Une des utilisations fréquentes de ces systèmes de transfert d'acyle *N* vers *S* est la production d'alkylthioesters par échange du motif *N*-(2-mercaptoethyl)amine avec un thiol exogène utilisé en excès (RSH, Figure 85). Une telle réaction se décompose en deux étapes. Premièrement, le transfert d'acyle *N* vers *S* vient générer un premier thioester transitoire. Cette première réaction est un équilibre et celui-ci peut être largement déplacé vers la forme thioester à pH acide en inactivant la *N*-(2-mercaptoethyl)amine partante par protonation empêchant ainsi la réaction retour.²⁹⁰ Ensuite, la thiolysse de ce premier thioester constitue la deuxième étape. Une étude mécanistique détaillée du système *bis*(2-sulfanylethyl)amido

²⁸⁸ Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Melnyk, O. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 15140–15152.

²⁸⁹ Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Cargoët, M.; Melnyk, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4938–4945.

²⁹⁰ Pira, S.L.; El Mahdi, O.; Raibaut, L.; Drobecq, H.; Dheur, J.; Boll, E.; Melnyk, O. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7211–7216.

(SEA) a montré que dans les conditions de pH optimales pour le transfert d'acyle, l'échange thiol/thioester est limitant. En effet, cette réaction met préférentiellement en jeu une espèce thiolate²⁹¹ alors que le pH du milieu réactionnel, fixé traditionnellement à 4, impose au thiol attaquant sa forme neutre.²⁹² Ces considérations mécanistiques nous ont conduit à chercher de nouveaux additifs permettant la conversion de peptides SEA en peptides thioesters en catalysant l'étape d'échange thiol/ thioester.

Une catalyse efficace de l'échange thiol/thioester peut être atteinte grâce au disélénoïl **3** (R' = groupe alkyle, Figure 85). Ce type de catalyseurs s'est révélé être plus efficace que les additifs thiol ou sélénoïl classiquement utilisés dans le domaine pour accélérer la conversion de peptides SEA en thioesters à pH 4. La conception du catalyseur **3** découle de l'observation de l'activité catalytique du disélénoïl plus simple **4** (R' = H, Figure 85). Celle-ci s'accompagne cependant de la formation de sous-produits dus à la présence dans la structure de **4** d'une amine secondaire nucléophile. L'existence de cette réaction secondaire a conduit à bloquer cette position par l'introduction d'un groupement alkyle sur l'atome d'azote.

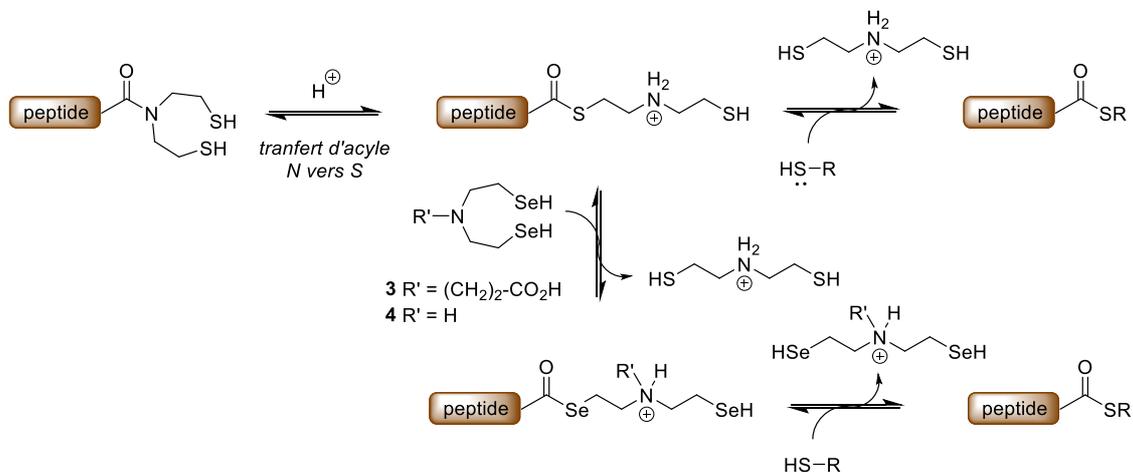


Figure 85. Mécanisme de l'échange SEA/thiol catalysé par les sélénoïls

Les différentes données cinétiques collectées suggèrent que les dérivés sélénoïls comme **3** catalysent l'échange SEA/thiol telle que décrit en Figure 85.^{290,292} Selon ce mécanisme, le peptide SEA se réarrange spontanément pour produire le thioester SEA transitoire

²⁹¹ Hupe, D. J.; Jencks, W.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 451–464.

²⁹² Cargoët, M.; Diemer, V.; Snella, B.; Desmet, R.; Blanpain, A.; Drobecq, H.; Agouridas, V.; Melnyk, O. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12584–12594.

correspondant. Ce dernier réagit avec le catalyseur sélénié probablement par l'action d'une espèce sélénoate pour conduire au sélénoester. Il subit ensuite une réaction d'échange par l'additif thiol utilisé en large excès. Le pouvoir catalytique des sélénoles s'explique par leur pKa plus faible que celui des thiols assurant ainsi la présence dans le milieu d'une quantité significative de sélénoates nucléophiles au pH de travail. De plus, les sélénoesters sont connus pour être de puissants agents acylant.^{293,294}

La simplicité de la synthèse des catalyseurs, leur activité catalytique et leur solubilité dans l'eau sont des points cruciaux à considérer pour le développement de catalyseurs agissant au contact de segments peptidiques non protégés. Les catalyseurs diséléniés tels que **3** sont efficaces, solubles dans l'eau mais leur synthèse est complexe et ils ne sont accessibles qu'au prix d'un faible rendement. Ce sont ces considérations qui nous ont amené à chercher de nouveaux catalyseurs séléniés dont la production serait plus facile. Faire évoluer la structure du catalyseur **3** en une structure plus simple ne garantit cependant pas la conservation du potentiel catalytique, d'autant que l'importance des fonctions bis-sélénole et amine tertiaire pour l'activité de **3** n'a jamais été évaluée. De plus, la conséquence d'un changement de structure sur le pKa et la nucléophilie de la fonction sélénole est difficile à prévoir.

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'évaluer la capacité des composés séléniés **1** et **5** à catalyser la réaction d'échange SEA/thiol (Figure 86). Ces molécules, qui partagent le motif 2-(selanylethyl)amino du catalyseur original **3**, ont été étudiées par le passé en tant qu'analogues de la choline.^{295,296,297} Elles ont l'avantage d'être produites facilement et en quantité importante à partir de réactifs peu coûteux. Une étude cinétique, détaillée ci-après, a montré la capacité du sélénole **1** à substituer le disélénole **3** pour la synthèse de peptides thioesters.

²⁹³ Mitchell, N.J.; Malins, L.R.; Liu, X.; Thompson, R.E.; Chan, B.; Radom, L.; Payne, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14011–14014.

²⁹⁴ Durek, T.; Alewood, P.F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12042–12045.

²⁹⁵ Shefter, E.; Kennard, O. *Science* **1966**, *153*, 1389.

²⁹⁶ Chu, S.-H.; Mautner, H.G. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 308–312.

²⁹⁷ Günther, W.H.H.; Mautner, H.G. *J. Med. Chem.* **1964**, *7*, 229–232.

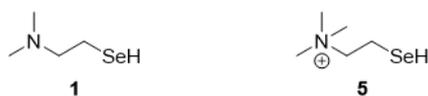


Figure 86. Catalyseurs sélénols étudiés dans ce chapitre

2. Synthèse des catalyseurs

Les catalyseurs **1** et **5** ont été produits sous la forme des disélénures correspondants, **6** et **7** respectivement, en partant du chlorhydrate de 2-chloro-*N,N*-diméthylethylamine et selon des procédures déjà décrites.^{297,298} La 2-chloro-*N,N*-diméthylethylamine **9** est premièrement neutralisée par le carbonate de potassium puis mise en réaction avec le séléno-cyanate de potassium pour donner la *N,N*-diméthyl-2-sélocyanatoéthylamine **8**. L'hydrolyse de **8** par l'hydroxyde de sodium aqueux conduit directement au disélénuire **6** (Schéma 8). Celui-ci peut ensuite être facilement alkylé par l'iodure de méthyle pour conduire au disélénuire **7**, précurseur du sélénuire **5**.

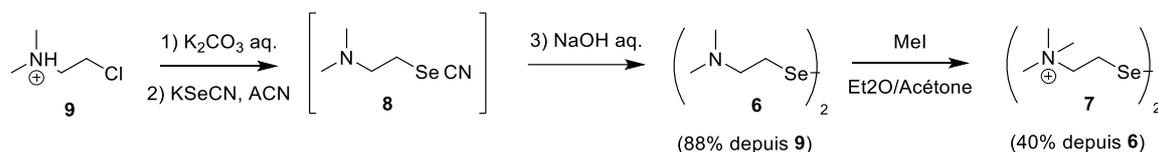


Schéma 8. Synthèse des précurseurs diséléniés **6** et **7**.

3. Etude cinétique

La réaction d'échange SEA/thiol support à l'étude de l'activité des différents catalyseurs est résumée par le Schéma 9. La tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) permet la réduction *in situ* des disulfures cycliques SEA^{off} **10** et **11** ainsi que des précurseurs **6** et **7**. L'additif thiol utilisé ici est l'acide 3-mercaptopropionique (MPA), un thiol employé classiquement pour la préparation de peptides thioesters.

²⁹⁸ Krief, A.; Dumont, W.; Delmotte, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1669–1672.

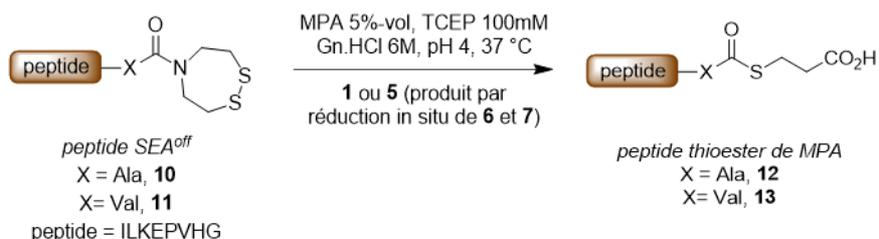


Schéma 9. Réaction d'échange SEA/Thiol support à l'étude cinétique

La réaction d'échange est suivie par HPLC (X = Ala, Figure 87). Les données cinétiques ont permis d'extraire les constantes de vitesse apparente du second ordre (Tableau 5). Dans cette figure et dans les paragraphes suivants, les données sont exprimées en fonction de la concentration totale en séléniol. Comme le suggèrent les données reportées dans le Tableau 5, les constantes de vitesse obtenues pour **1** et **3**, formés respectivement par réduction in situ de **6** et **2**, se stabilisent aux mêmes valeurs au-dessus d'une concentration en catalyseur égale à 50 mM. Cependant, les temps de demi-réaction varient différemment en fonction de la nature et de la concentration du catalyseur. Par conséquent, les potentiels catalytiques de **1** et **3** ne sont pas les mêmes en dessous de 50 mM. Dans ce cas, la réaction d'échange SEA/thiol est plus rapide avec le catalyseur **3**. La différence est particulièrement frappante à l'examen des données obtenues à faibles concentrations en catalyseur (12.5 mM, 6.25 mM, Tableau 5). Le catalyseur **3** peut cependant tout à fait être substitué par le séléniol **1** à condition de l'utiliser à une concentration minimale de 50 mM, condition pour laquelle la vitesse de l'échange SEA/thiol maximale.

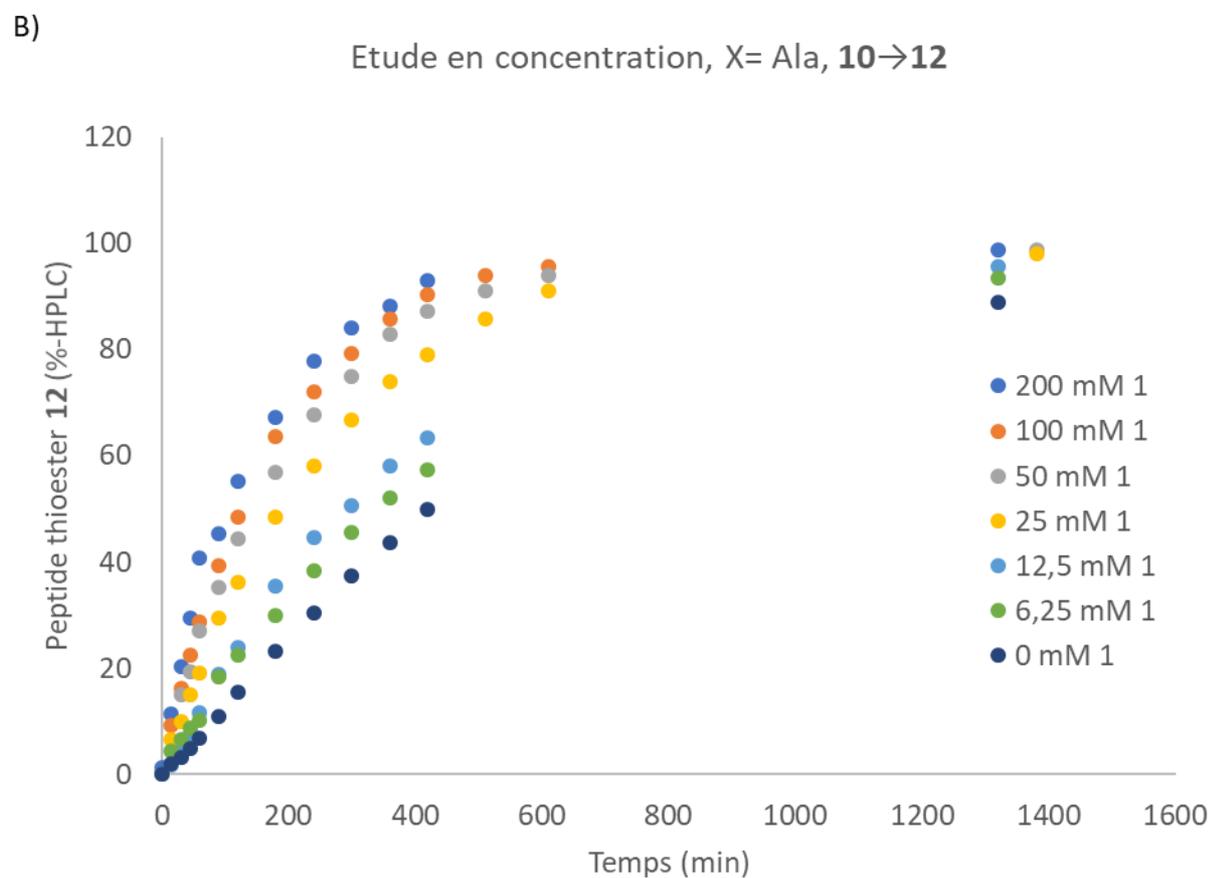
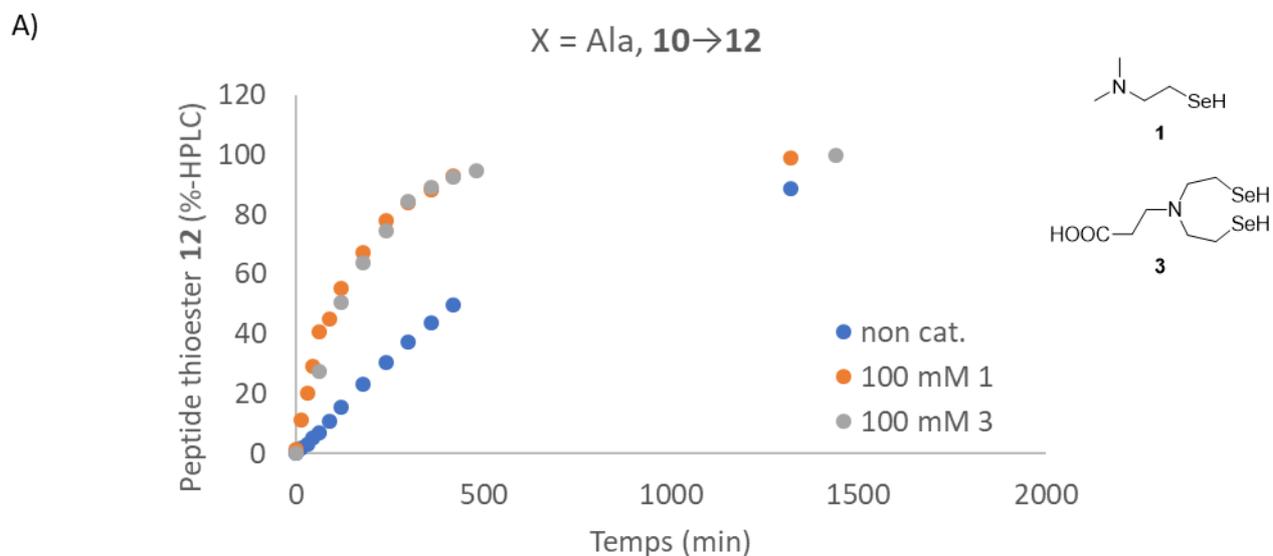


Figure 87. Etude de l'échange SEA/MPA catalysé par **1** et **3** pour X = Ala ($10 \rightarrow 12$). A) Données expérimentales permettant la comparaison de **1** et **3** à 100 mM. B) Données expérimentales permettant d'évaluer l'impact de la concentration en **1** sur la vitesse d'échange.

Concentration totale en séléniol (mM)	$t_{1/2}$ (h) Catalyseur 1	$t_{1/2}$ (h) Catalyseur 3
200	1.68	1.97
100	2.08	2.03
50	2.22	1.95
25	3.10	2.35
12.5	4.60	3.00
6.25	5.87	3.35

Tableau 5. Résultats de l'étude cinétique de l'échange SEA/MPA par les séléniols **1** ou **3**.

La réaction d'échange pour X = Val (**11**→**13**) a également été examinée et les données expérimentales sont reportées en Figure 88. En plus d'un temps de réaction très long, les réactions d'échange SEA/thiol aux acides aminés encombrés comme la valine présentent également une certaine latence avant le début de la réaction. EN effet, l'encombrement stérique en position C-terminale ralentit également le transfert d'acyle *N* vers *S*. Ceci complique fortement le traitement des données cinétiques. L'examen visuel des courbes permet néanmoins d'apprécier la capacité des catalyseurs **1** et **3** à accélérer significativement la réaction d'échange à la valine. Ils ne présentent pas de différence d'activité à la concentration considérée. Par conséquent, le catalyseur **1** peut également substituer le catalyseur **3** pour la transthioesterification des résidus C-terminaux encombrés.

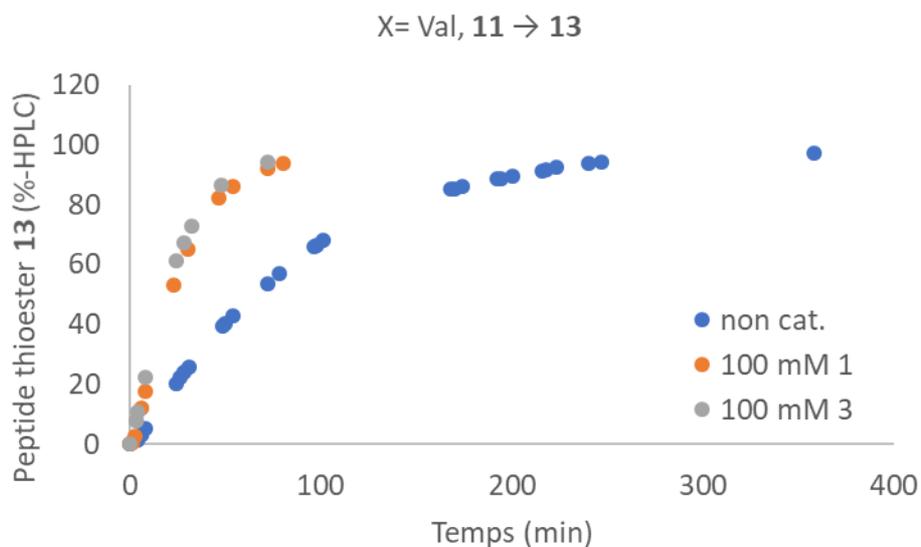


Figure 88. Etude de l'échange SEA/MPA catalysé par **1** et **3** pour X = Val (**11**→**13**). Données expérimentales permettant la comparaison de **1** et **3** à 100 mM.

La capacité du séléinol **5** obtenu par réduction *in situ* du composé **7** à accélérer la réaction d'échange thiol/thioester a également été évaluée selon les mêmes conditions. À des concentrations de 200 mM, 100 mM ou 50 mM, le séléinol **5** s'est révélé bien moins efficace que les catalyseurs **1** et **3** (Tableau 6). De plus, un solide rouge se forme dans le milieu réactionnel après quelques heures pour la condition où la concentration en catalyseur est la plus élevée (200mM) (Figure 89). Il s'agit probablement de sélénium élémentaire. Cette observation suggère donc que le catalyseur **5** se décompose au cours de la réaction. Le pH du milieu réactionnel croît également à mesure que la réaction progresse. Ce phénomène n'a jamais été observé avec les autres séléinols. Puisque de précédentes études ont montré que le ratio SEA/thioester augmente avec le pH,^{290,292} la dérive de pH observée pour cette expérience pourrait expliquer la faible conversion atteinte avec le catalyseur **5**. Pris ensemble, la faible conversion et la faible vitesse de réaction observées avec le catalyseur **5** proscrivent son utilisation comme alternative au composé **3** pour la conversion de peptides SEA en peptides thioesters. Une autre observation frappante lors du suivi LC-MS du processus d'échange catalysé par le séléinol **5** est l'accumulation du peptide sélénoester dérivant de la sélénocholine en quantité substantielle (Figure 90). A l'opposé, la quantité de sélénoester formé durant l'échange SEA/thioester catalysé par **1** ou **3** reste sous la limite de détection. La persistance du sélénoester dérivant de **5** dans le milieu réactionnel suggère que la quaternarisation de l'atome d'azote altère la réactivité du carbonyle voisin. Cette observation

rappelle les travaux de Mautner et collaborateurs concernant l'hydrolyse du 2-diméthylaminoethyl selenobenzoate, qui est significativement plus rapide à pH 7 que l'hydrolyse de la benzoylselenocholine. Les auteurs proposent que la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'amine secondaire protonée et l'atome d'oxygène de la fonction sélénioester pourrait promouvoir l'hydrolyse du thioester.²⁹⁶ Une telle activation intramoléculaire de la fonction sélénioester par l'amine protonée, telle qu'illustrée en Figure 91, pourrait contribuer à l'activité catalytique des séléniols **1** et **3**.

<i>Concentration totale en séléniol (mM)</i>	<i>t_{1/2} (h) Catalyseur 1</i>	<i>t_{1/2} (h) Catalyseur 5</i>
200	1.68	2.51
100	2.08	2.87
50	2.22	3.60

Tableau 6. Résultats de l'étude cinétique de l'échange SEA/MPA par les séléniols **1** ou **5**.



Figure 89. Précipité rouge formé durant la catalyse de l'échange SEA/MPA par **5** à 100 mM.

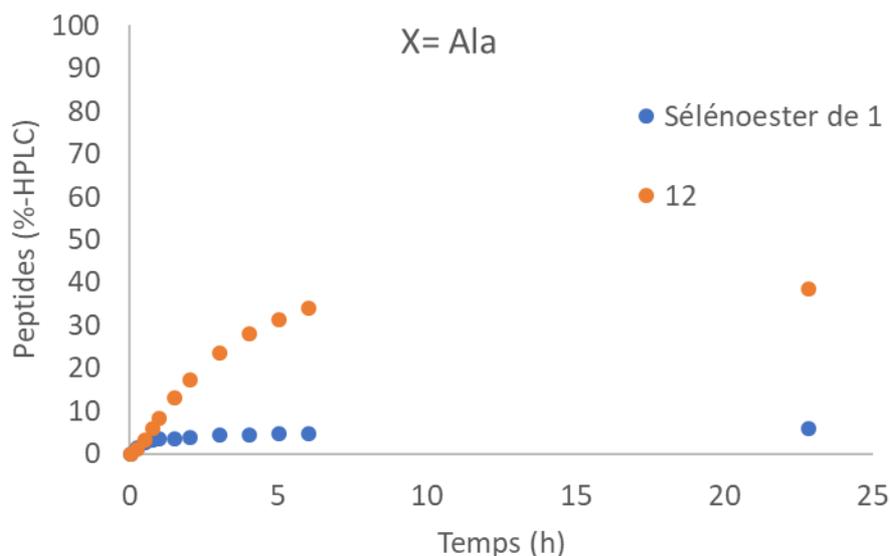


Figure 90. Etude de l'échange SEA/MPA catalysé par **5** pour X = Ala (**10**→**12**). Tracés des %-HPLC du produit **12** et du sous-produit sélénioester de **1**.

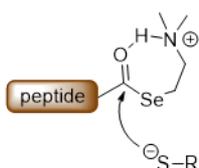


Figure 91. La présence d'une amine protonée à proximité du carbonyle pourrait promouvoir l'attaque de thiols nucléophiles.

4. Essais d'application à la synthèse de protéines en phase solide

L'avènement de la NCL constitue une avancée majeure dans le développement de nouvelles stratégies pour la production de longs peptides et de protéines en milieu aqueux en permettant la manipulation de segments peptidiques complètement déprotégés. Cependant, la production de grandes protéines requiert souvent l'assemblage séquentiel de plusieurs segments peptidiques et conduit inévitablement à l'accumulation d'étapes de réaction et d'isolement dont l'effet sur le rendement peut s'avérer délétère. Pour outrepasser ces limites, une stratégie est d'adapter les protocoles de NCL en solution sur des supports solides compatibles avec les milieux aqueux. En effet, plusieurs avantages de la SPPS peuvent aussi s'appliquer à la concaténation de segments peptidiques non protégés sur support solide et

faciliteraient ainsi la production de grandes protéines. L'utilisation d'un support solide peut également faciliter la manipulation d'intermédiaires peptidiques peu solubles dans l'eau. Il s'agit là d'un avantage considérable pour la synthèse de protéines hydrophobes telles que les protéines membranaires par exemple.²⁹⁹ La ligation séquentielle de segments peptidiques en phase solide tire également ses bénéfices du remplacement des étapes intermédiaires de purification par de simples lavages. En s'affranchissant de l'isolement des intermédiaires par HPLC, de meilleurs rendements sont obtenus en comparaison avec la chimie en solution.^{300, 301} En revanche, forcer les étapes de couplage en appliquant un large excès du réactif entrant tel que pratiqué communément en SPPS est ici limité par le coût de production des segments peptidiques. Enfin, le travail sur support solide permet d'imaginer des méthodes analytiques simples, tirant partie de l'immobilisation de la chaîne en croissance, afin de suivre l'avancement des étapes de ligation. De telles méthodes restent cependant à développer.

Depuis quelques années, une méthodologie de synthèse de protéines en phase solide est en développement au laboratoire. En exploitant la réactivité du groupement SEA, elle vise à l'assemblage dans la direction N vers C de peptides bifonctionnels présentant une cystéine à leur extrémité N-terminale et la fonction thioester latente SEA à leur extrémité C-terminale. Un cycle d'élongation se décompose en une première étape d'activation du groupement SEA en thioester d'alkyle par échange avec le MesNa en présence d'un réducteur fort à pH 4 (Figure 92). S'en suit l'incorporation du segment suivant par NCL.

²⁹⁹ Li, J. B.; Tang, S.; Zheng, J. S.; Tian, C. L.; Liu, L. *Accounts of Chemical Research* **2017**, *50*, 1143-1153.

³⁰⁰ Raibaut, L.; Adihou, H.; Desmet, R.; Delmas, A. F.; Aucagne, V.; Melnyk, O. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4061-4066.

³⁰¹ Loibl, S. F.; Harpaz, Z.; Zitterbart, R.; Seitz, O. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6753-6759.

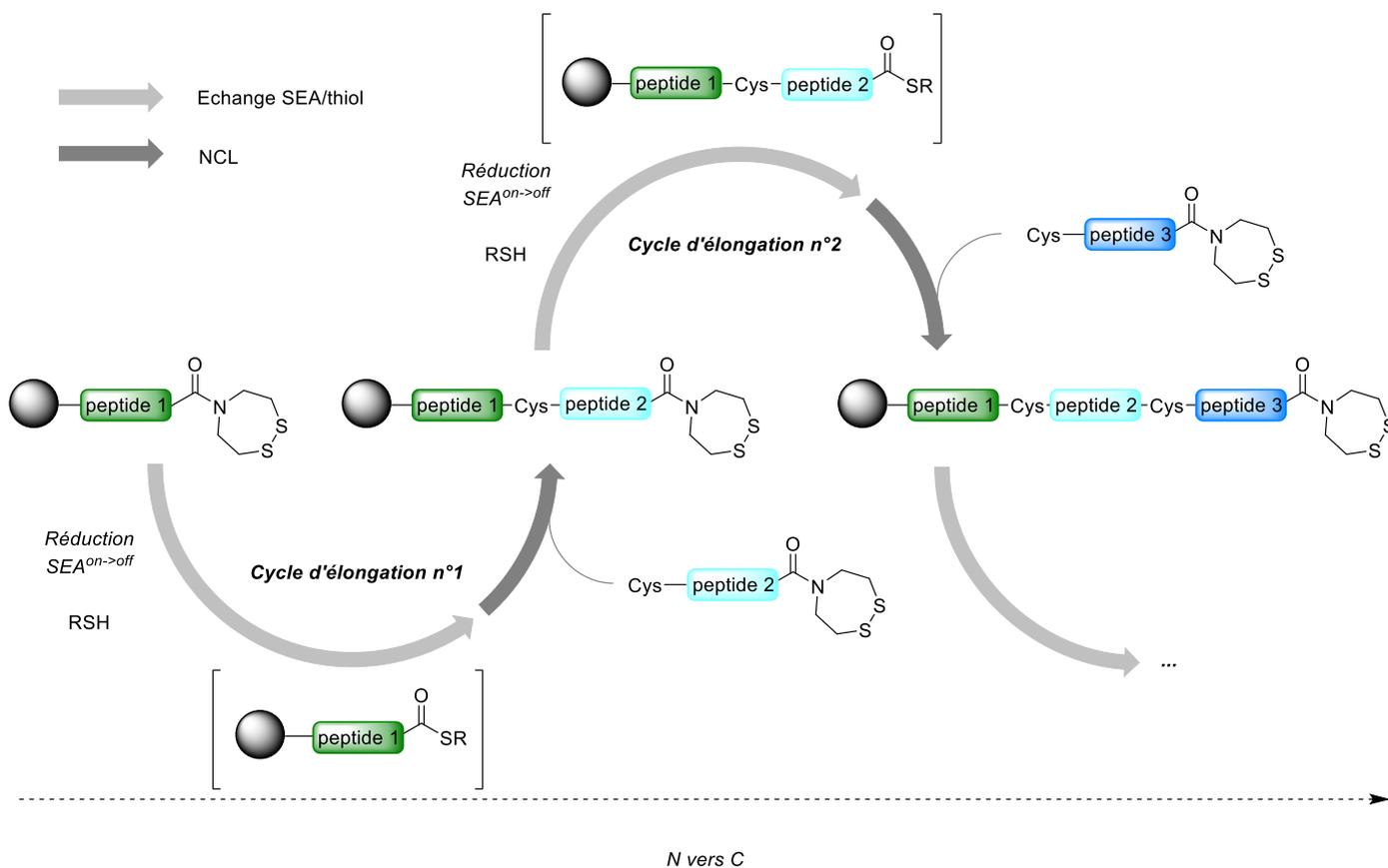


Figure 92. Principe de l'élongation d'un polypeptide sur support solide grâce à des cycles composés d'une étape d'activation de l'extrémité C-terminale suivie d'une étape de NCL.

De longs travaux de développement ont permis la mise au point de conditions optimales pour la réaction d'activation. Le support solide immobilisant la chaîne en croissance est alors immergé dans un tampon contenant 50 mM de MPAA, 10 %-vol de NMP, 574 mM d'acide propionique, 10 %-masse de MesNa, 50 mM de TCEP et dont le pH est ajusté à 4. Bien qu'il soit plus largement utilisé comme thiol exogène pour la transformation du groupement SEA en thioester d'alkyle, le MPA est ici substitué par le MesNa. Cependant, les différentes données cinétiques collectées ces dernières années montrent que la participation du MPA à la réaction d'échange thiol/thioester ne se limite pas à son activité de thiol exogène. Il serait également impliqué dans une catalyse acide de l'échange. Le déplacement du motif *N*-(2-mercaptoethyl)amine par le MesNa impose donc des vitesses de réaction plus lentes. L'effet de cette catalyse acide peut toutefois être restauré par l'ajout dans le milieu d'une quantité d'acide propionique correspondant à 5%-vol de MPA, soit 574 mM. Le MPAA joue ici le rôle de catalyseur mais sa faible solubilité au pH de travail impose qu'il soit premièrement dissout

dans la NMP avant d'être ajouté au milieu réactionnel. Enfin, la réactivité du groupement SEA est ici démasquée par l'action réductrice de la TCEP.

Dans ces conditions, la conversion complète d'un peptide SEA en peptide thioester requiert généralement 24 heures de réaction avec une forte dépendance à l'encombrement de l'acide aminé C-terminal. C'est donc avec l'objectif d'accélérer cette étape d'activation que des essais préliminaires de catalyse de ces réactions en solution ont été conduits avec l'alkyldisélnure **6**. La réaction support à cette étude est présentée en Schéma 10 et les différents résultats collectés sont rassemblés en Figure 93.

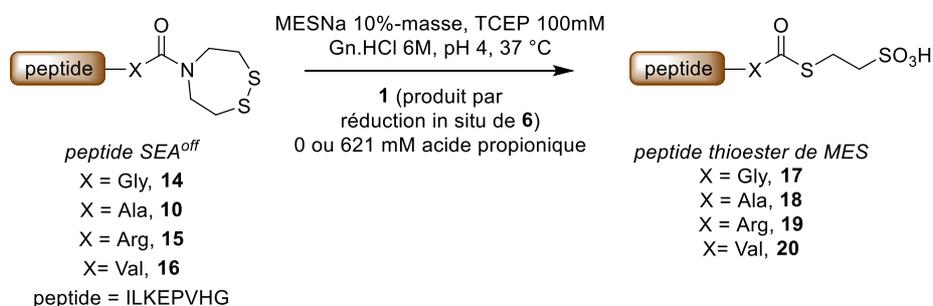


Schéma 10. Réaction d'échange SEA/MesNa support à l'étude cinétique.

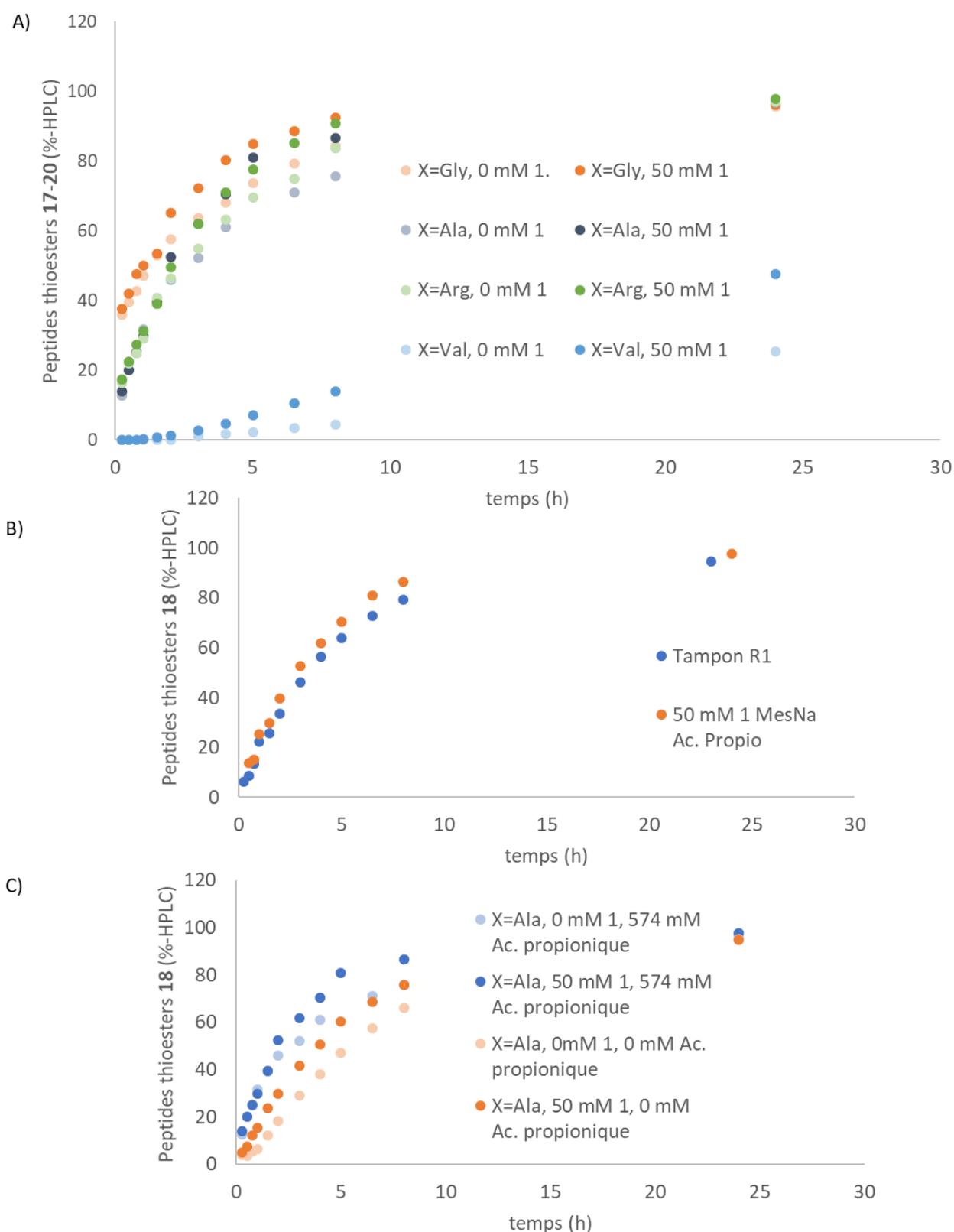


Figure 93. Etude de l'échange SEA/MES catalysé par **1**. A) Données expérimentales permettant la mesure de l'activité de **1** pour l'échange SEA/MES pour X = Gly (**14**→**17**) X = Ala (**10**→**18**) X = Ala (**15**→**19**) X = Ala (**16**→**20**) B) Données expérimentales permettant de comparer l'activité de **1** avec celle du MPA dans le tampon R1. C) Données expérimentales permettant d'évaluer l'effet de l'acide propionique sur la catalyse par **1** de l'échange SEA/MES.

Pour les peptides **10**, **14** et **15**, porteurs d'acides aminés peu encombrés à leur extrémité C-terminale, l'examen des données cinétiques ne montre pas d'effet significatif de la catalyse par le séléniol **1** sur l'échange SEA/MesNa. 24 heures de réaction sont toujours nécessaires pour accéder à la conversion quasi-complète du groupement SEA en thioester d'alkyle. Lorsque le résidu C-terminal est une valine, un doublement de la conversion est observé après 24 heures de réaction. Le catalyseur **1** prouve encore ici son utilité pour l'activation des acides aminés C-terminaux encombrés.

L'impact d'une catalyse acide intermoléculaire a également été vérifié dans le cas de l'utilisation du catalyseur disélénié **1** pour l'échange thiol/thioester. Lorsque l'acide propionique est absent du milieu réactionnel, 100 mM de diséléniure **6** permettent de gagner presque 1 heure de temps de demi réaction. Qu'elle soit catalysée ou non par l'alkylséléniol **1**, la réaction l'échange SEA/MesNa est plus rapide lorsque 574 mM d'acide propionique sont présents dans le milieu. Le passage par un donneur d'acyle plus puissant tel que le sélénoester dérivant de **1** n'est à lui seul pas suffisant pour compenser l'action de l'acide propionique mais un effet combiné des catalyses par l'acide propionique et par le séléniol **1** permet une accélération significative de la réaction.

Enfin, la substitution des 50 mM de MPAA par 100 mM de diséléniure **6** dans le tampon optimisé pour la réaction d'échange thiol/thioester en phase solide ne permet pas d'accroître la vitesse de conversion de **10** en **18**. Leur effet catalytique étant semblable, la substitution du MPAA par **1** pour l'activation de peptides SEA en phase solide ne présente donc pas d'intérêt particulier à ce stade.

5. Application à la synthèse de la granulysine 15 kDa

Telle que décrite au chapitre 3, la synthèse de la granulysine 15 kDa et de ses analogues *via* la réaction de NCL impose le découpage de sa séquence en 4 segments : segment **A₁** (23-42), segment **A₂** (43-68), segment **B** (69-106) et segment **C** (107-123). Pour permettre leur assemblage *via* la ligation chimique native, le procédé impose l'activation des trois peptides

SEA **A₁-SEA**, **B-SEA** et **A-SEA** en thioester d'alkyle. Le groupement SEA du segment central **B** est porté par un résidu de valine ce qui complique fortement sa transformation en thioester de MPA. Les données cinétiques présentées dans les paragraphes précédents ont mis en avant la capacité du catalyseur **1** à accélérer la formation de thioester d'alkyle aux acides aminés encombrés. Son action catalytique sur la formation du peptide **AcA-B-MPA** a donc été évaluée (Schéma 11, Figure 94).

En l'absence de catalyse et au bout de 72 heures de réaction, seuls 36% du peptide **AcA-B-SEA** sont convertis en thioester de MPA. Allonger la durée de réaction pourrait permettre d'accéder à une meilleure conversion mais risque également de favoriser la formation de produits secondaires en quantité substantielle. La réaction d'hydrolyse du thioester d'alkyle nouvellement formé accompagne classiquement leur formation. Bien que la vitesse d'hydrolyse des thioesters d'alkyle soit significativement inférieure à celle de l'échange thiol/thioester au pH de travail, elle constitue un risque important au-delà de plusieurs jours de réaction.³⁰² En revanche, l'ajout de 25 mM de **6** au milieu de transthioesterification permet d'atteindre la conversion complète du peptide **AcA-B-SEA** en son thioester de MPA correspondant. La réaction s'accompagne de la formation d'un produit secondaire dont la masse est égale à 4520 Da et dont la structure n'a pas pu être élucidée mais qui peut être facilement éliminé à l'étape de purification. L'introduction du catalyseur disélénié **6** dans le procédé de synthèse du segment **AcA-B-MPA** à partir du précurseur **B-SEA** permet d'atteindre 34 % de rendement global après purification pour les deux étapes conduites dans le même pot.

³⁰² Bracher, P. J.; Snyder, P. W.; Bohall, B. R.; Whitesides, G. M. *Orig Life Evol Biosph* 2011, 41, 399–412.

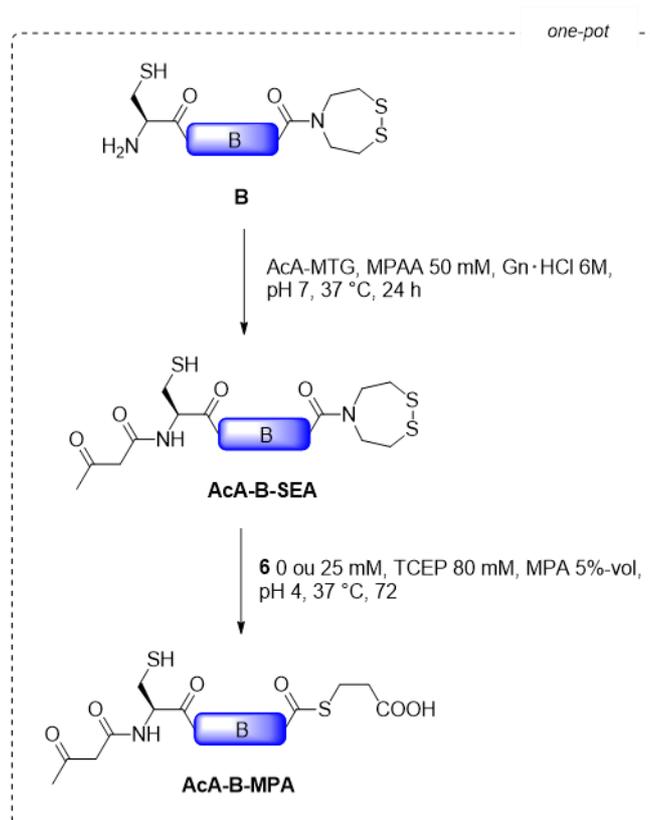


Schéma 11. Première étape du procédé de synthèse chimique de la 15-GN. Fonctionnalisation du segment central B par NCL pour l'installation du groupement protecteur AcA an position N-terminale puis échange SEA/MPA catalysé par **1**.

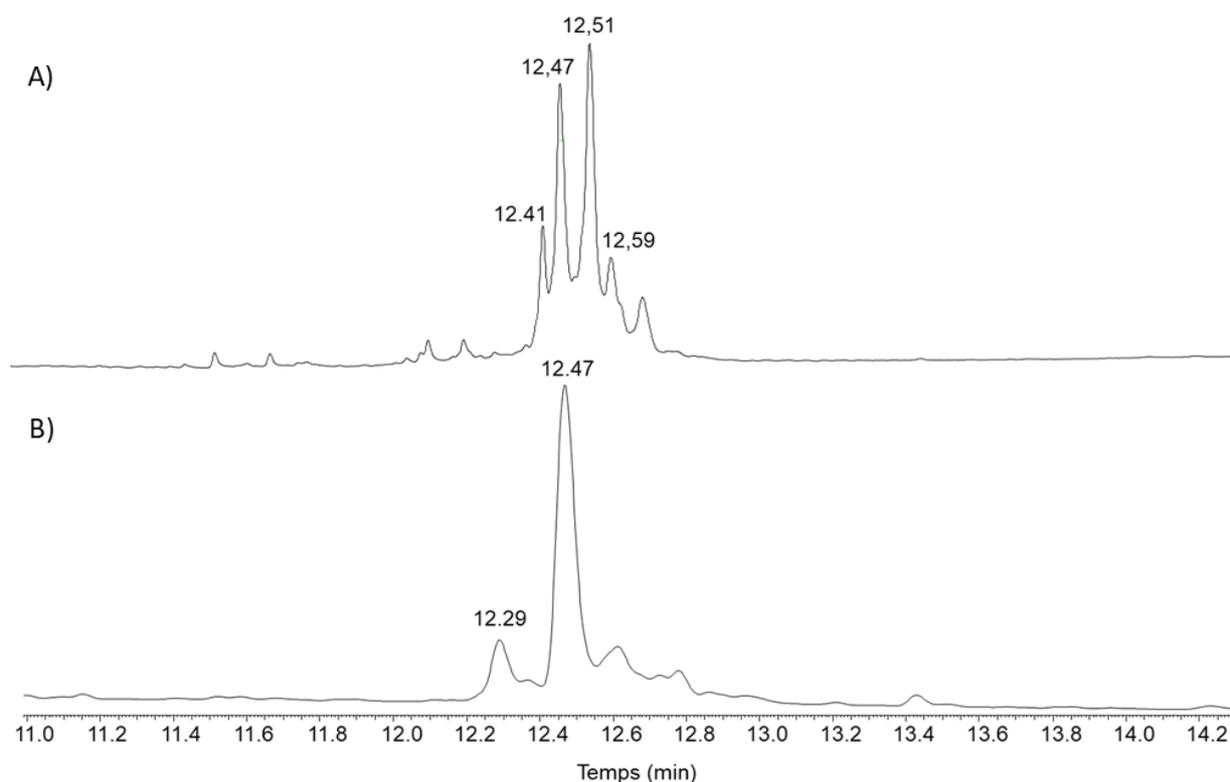


Figure 94. Analyse UPLC-MS du milieu réactionnel après 72h de réaction d'échange SEA/MPA. Trace LC : éluant A 0,10% TFA dans H₂O, éluant B 0,10% TFA dans CH₃CN. Colonne C18, gradient 0-70% B en 20 min, 50 °C, 0.4 mL.min⁻¹, détection UV à 215 nm. Les données de spectrométrie de masse sont présentées en figure S 106 et S 107, A) Réaction d'échange non catalysée. $t_R = 12,41$ **AcA-B-SEA^{on}** thioester, calculé pour [M] (moyenne) 4592.8, trouvé 4593.2. $t_R = 12,47$ **AcA-B-MPA**, calculé pour [M] (moyenne) 4561.5, trouvé 4561.8. $t_R = 12,51$ **AcA-B-SEA^{on}** amide, calculé pour [M] (moyenne) 4592.8, trouvé 4593.2. B) Réaction d'échange catalysée par 25 mM de **6**. $t_R = 12,47$ **AcA-B-MPA**, calculé pour [M] (moyenne) 4561.5, trouvé 4562.4.

Ce travail de développement méthodologique a révélé la capacité du séléniol **1** à accélérer la réaction d'échange SEA/thiol. Ce composé est facile d'accès et tout à fait capable de remplacer d'autres additifs séléniols développés par le passé pour les mêmes applications mais dont la structure était plus complexe. L'étude approfondie de son activité catalytique a mis en avant son intérêt pour la production de thioesters d'alkyle portés par des acides aminés C-terminaux encombrés. Cette faculté lui a valu d'être utilisé dans le procédé de synthèse totale de la granulysine 15 kDa et de ses analogues après avoir démontré son efficacité dans l'activation du segment central **B**. Le développement de ce catalyseur a constitué une étape cruciale de la mise au point du procédé de synthèse totale de la 15-GN qui a permis sa production et celle de ses analogues en quantité suffisante pour les études présentées dans les chapitres précédents. Enfin, l'utilité du séléniol **1** pourrait être étendue à la catalyse de la ligation SEA. En effet, il permet de former *in situ* et en milieu acide un sélénoester à partir du groupement

SEA. A pH 4, le transfert d'acyle *N* vers *S* n'est pas limitant et l'équilibre est davantage en faveur de la forme thioester. Dans ces conditions, les sélénioesters conservent leur caractère d'agent acylant puissants et pourraient permettre de compenser la moindre réactivité du résidu de cystéine dans le second échange thiol/thioester du mécanisme de la ligation SEA. Des travaux de collection de données cinétiques sont cependant nécessaires pour le vérifier mais permettraient une autre valorisation de cette molécule. L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'un article paru dans la revue *Molecules* (voir annexe 2).

Conclusions et perspectives

Les protéines jouent un rôle crucial dans les processus biochimiques du vivant. Avec le développement du séquençage génomique d'un grand nombre d'organismes, un nombre considérable de peptides et de protéines ont été découverts en très peu de temps. Leur structure, leurs fonctions et leur mécanisme d'action doivent maintenant être élucidés. Inévitablement, l'étude d'une protéine démarre par sa production et dans l'écrasante majorité des cas, elle est produite par expression dans une cellule génétiquement modifiée. Les technologies de synthèse recombinante de protéines permettent la production d'une grande quantité de protéines natives et autorisent des changements dans la séquence par mutation dirigée pour l'étude des relations structure-fonction. Bien qu'il s'agisse de la méthode la plus employée pour la production de protéines, elle montre certaines limitations comme la difficulté de surexprimer des protéines toxiques pour une cellule (protéases, peptides antimicrobiens, etc.). Également, l'utilisation de tels systèmes complexifie grandement l'introduction d'acides aminés non canoniques et la gestion des modifications post-traductionnelles.

Dans ce contexte, la synthèse chimique des protéines s'inscrit comme une stratégie incontournable car capable d'outrepasser certaines de ces limites. Elle assure un accès égal à chacun des sites de la séquence avec un niveau unique de spécificité et autorise ainsi des modifications sans limite et d'une extrême précision. Ce domaine de recherche s'est construit autour des deux avancées majeures que sont l'introduction de la SPPS en 1963 par Merrifield et celle de la NCL par Kent en 1994. Depuis, la synthèse totale de protéines par ligation chimique de segments peptidiques non protégés et obtenus par SPPS permet l'accès à des protéines natives allant jusqu'à une trentaine voire quarantaine de kilo-Daltons. Cette gamme de taille coïncide avec les domaines structuraux et fonctionnels qui sont les composants essentiels d'enzymes, de récepteurs, de protéines de transduction du signal ou bien constituent les sous-unités d'assemblages protéiques plus complexes.

C'est en mettant à profit ces méthodologies que nous sommes parvenus à développer un procédé de synthèse robuste et modulaire de la granulysine 15 kDa. Cette protéine joue un rôle clé dans les réponses immunitaires innée et adaptative au travers de nombreuses activités d'alarmine. L'étude de cette protéine était cependant entachée d'un important manque de connaissances quant à son repliement, sa structure tridimensionnelle et ses multiples fonctions biologiques. Chacun des travaux rapportés se trouvait alors limité par l'extrême difficulté à produire cette protéine par les méthodes recombinantes. La synthèse par voie chimique de la 15-GN fonctionnelle a pour la première fois permis de caractériser son repliement, l'appariement de ses cystéines et sa structure secondaire. Nous avons également conduit une étude approfondie de ses fonctions allant jusqu'à réfuter l'activité antibactérienne qui lui était encore prêtée dans certains travaux.

La facilité d'introduction de modifications de toute nature grâce à la synthèse chimique a également rendu possible la synthèse de plusieurs analogues de la 15-GN. Leur étude a fourni un aperçu précieux des mécanismes moléculaires qui régissent son repliement. Parmi eux, nous avons relevé le rôle essentiel du motif Cys43-Pro44-Cys45 pour son implication dans le repliement et dans les fonctions biologiques de la protéine.

La synthèse d'un analogue biotinylé a également ouvert la voie à une meilleure compréhension du mécanisme d'action de la 15-GN. Dans plusieurs expériences le mettant à profit, nous avons confirmé l'existence de partenaires d'interaction localisés dans la membrane des cellules immunitaires. Jusqu'ici supposée, l'implication du récepteur TLR4 dans les activités de la 15-GN n'a pas pu être confirmée. De premiers indices sur l'activité d'une disulfure isomérase membranaire dans la modulation de ses activités biologiques ont par ailleurs été dégagés.

Au-delà des résultats déjà collectés, l'ensemble de ce travail d'exploration des relations structure-fonction de la 15-GN constitue un socle solide pour de futurs approfondissements. Tous les outils dont le développement a été rapporté dans ce manuscrit sont facilement implémentables à la synthèse d'autres analogues pour comprendre l'implication d'autres résidus, groupes de résidus ou même de structures secondaires dans les activités de la 15-GN. Nous disposons de quantités substantielles de protéine native et biotinylée pour poursuivre

sa caractérisation biochimique. En parallèle de la purification par affinité et de la microscopie confocale, d'autres stratégies d'identification et de confirmation d'interactions peuvent être envisagées. L'utilisation des technologies siRNA ou d'extinction de gènes serait tout à fait indiquée pour la recherche des cibles biologiques de la 15-GN et pour une meilleure compréhension de son mécanisme d'action. De telles expériences nécessiteraient toutefois le développement d'un test d'activité fiable, rapide et non perturbé par une dépendance aux donneurs de cellules immunitaires.

Enfin, l'exploration des différentes propriétés biologiques de la 15-GN mérite également d'être poursuivie. Dans cette étude nous avons rapporté une nouvelle activité d'immunomodulation *in vitro* et il n'est pas à exclure que d'autres activités de la granulysine soient encore à découvrir. Complétés par des études *in vivo*, tous ces résultats pourraient faire émerger de nouvelles pistes thérapeutiques exploitant les propriétés d'alarmine de la 15-GN pour l'activation de l'immunité au site d'une infection par exemple. Cette protéine ou des analogues de structure plus simple et conservant ses propriétés pourraient alors être un atout précieux dans la lutte contre les maladies infectieuses.

Rappel des références bibliographiques

- (1) Fischer, E.; Fournau, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1901**, *34*, 2868-2877.
- (2) Merrifield, B. R. *J Am Chem Soc* **1963**, *85*, 2149-2154.
- (3) Gutte, B.; Merrifield, B. R. *J Biol Chem* **1971**, *246*, 1722-1741.
- (4) Schneider, J.; Kent, S. B. *Cell* **1988**, *54*, 363-368.
- (5) Nutt, R. F.; Brady, S. F.; Darke, P. L.; Ciccarone, T. M.; Colton, C. D.; Nutt, E. M.; Rodkey, J. A.; Bennett, C. D.; Waxman, L. H.; Sigal, I. S.; Anderson, P. A.; Veber, D. F. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **1988**, *85*, 7129-7133.
- (6) Wlodawer, A.; Miller, M.; Jaskolski, M.; Sathyanarayana, B. K.; Baldwin, E.; Weber, I. T.; Selk, L. M.; Clawson, L.; Schneider, J.; Kent, S. B. *Science* **1989**, *245*, 616-621.
- (7) Milton, R. C.; Milton, S. C.; Kent, S. B. *Science* **1992**, *256*, 1445-1448.
- (8) Ferrer, M.; Barany, G.; Woodward, C. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13974-13981.
- (9) Pan, H.; Barbar, E.; Baranay, G.; Woodward, C. *Nat Struct Biol* **1995**, *2*, 211-217.
- (10) Ferre, M.; Woodward, C.; Barany, G. *Int J Pept Protein Res* **1992**, *40*, 194-207.
- (11) Sieber, P.; Eisler, K.; Kamber, B.; Riniker, B.; Rittel, W.; Marki, F.; de Gasparo, M. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1978**, *359*, 113-123.
- (12) Yajima, H.; Fujii, N. *Biopolymers* **1981**, *20*, 1859-1867.
- (13) Kenner, G. W. *Proc R Soc Lond Biol Sci* **1977**, *197*, 237-253.
- (14) Schnolzer, M.; Kent, S. B. *Science* **1992**, *256*, 221-225.
- (15) Walsh, G.; Jefferis, R. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 1241-1252.
- (16) Walsh, G. *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 992-100.
- (17) Baca, M.; Muir, T. W.; Schnolzer, M.; Kent, S. B. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 10797-10798.
- (18) Canne, L. E.; Ferredamare, A. R.; Burley, S. K.; Kent, S. B. H. *J Am Chem Soc* **1995**, *117*, 2998-3007.
- (19) Dawson, P. E.; Kent, S. B. H. *J Am Chem Soc* **1993**, *115*, 7263-7266.
- (20) Williams, M. J.; Muir, T. W.; Ginsberg, M. H.; Kent, S. B. H. *J Am Chem Soc* **1994**, *116*, 10797-10798.
- (21) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- (22) Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Diemer, V.; Cargoët, M.; Monbaliu, J. M.; Melnyk, O. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 7328-7443.
- (23) Saxon, E.; Armstrong, J. I.; Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.
- (24) Nilsson, B. L.; Kiessling, L. L.; Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1939-1941.
- (25) Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248-1252.
- (26) Zhang, Y.; Xu, C.; Lam, H. Y.; Lee, C. L.; Li, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 6657-6662.
- (27) Liu, C. F.; Tam, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 6584-6588.
- (28) Tam, J. P.; Miao, Z. *J Am Chem Soc* **1999**, *121*, 9013-9022.

- (29) Tam, J. P.; Rao, C.; Liu, C. F.; Shao, J. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 209-216.
- (30) Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Cargoët, M.; Melnyk, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4938-4945.
- (31) Kresge, N.; Simoni, R. D.; Hill, R. L. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, e6-e7.
- (32) Lynen, F.; Reichert, E. *Angew. Chem.* **1951**, *63*, 47-48.
- (33) Wieland, T.; Schäfer, W. *Angew. Chem.* **1951**, *63*, 146-147.
- (34) Wieland, T.; Schäfer, W.; Bokelmann, E. *Liebigs Ann.* **1951**, *573*, 99-104.
- (35) Wieland, T.; Schäfer, W. *Liebigs Ann.* **1952**, *576*, 104-109.
- (36) Wieland, T.; Bokelmann, E.; Bauer, L.; Lang, H. U.; Lau, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-148.
- (37) Brenner, M.; Zimmermann, J. P.; Wehrmüller, J.; Quitt, P.; Photaki, I. *Experientia* **1955**, *11*, 397-399.
- (38) Brenner, M.; Zimmermann, J. P. *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 467-470.
- (39) Kemp, D. S.; Vellaccio, F., Jr. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3003-3004.
- (40) Kemp, D. S.; Grattan, J. A.; Reczek, J. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3465-3466.
- (41) Fotouhi, N.; Bowen, B. R.; Kemp, D. S. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 141-147.
- (42) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. *Science* **1994**, *266*, 776-779.
- (43) Schnolzer, M.; Kent, S. B. H. *Science* **1992**, *256*, 221-225.
- (44) Liu, C. F.; Tam, J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 6584-6588.
- (45) Tam, J. P.; Lu, Y. A.; Liu, C. F.; Shao, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 12485-12489.
- (46) Topics in Current Chemistry. Protein Ligation and Total Synthesis; Liu, L., Ed.; Springer International Publishing: New York, 2015; Vol. I & II.
- (47) Pech, A.; Achenbach, J.; Jahnz, M.; Schulzchen, S.; Jarosch, F.; Bordusa, F.; Klussmann, S. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 3997-4005.
- (48) Xu, W.; Jiang, W.; Wang, J.; Yu, L.; Chen, J.; Liu, X.; Liu, L.; Zhu, T. F. *Cell Discov.* **2017**, *3*, No 17008.
- (49) Li, Y.; Gould, A.; Aboye, T.; Bi, T.; Breindel, L.; Shekhtman, A.; Camarero, J. A. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1916-1927.
- (50) Yan, B.; Ye, L.; Xu, W.; Liu, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4953-4965.
- (51) Zhao, L.; Lu, W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 56-61.
- (52) Dirksen, A.; Dawson, P. E. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 760-766.
- (53) Rohde, H.; Seitz, O. *Biopolymers* **2010**, *94*, 551-559.
- (54) Dawson, P. E. *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 862-867.
- (55) Yan, L. Z.; Dawson, P. E. *J Am Chem Soc* **2001**, *123*, 526-533.
- (56) Wan, Q.; Danishefsky, S. *Angew Chem Int Ed* **2007**, *46*, 9248-9252.
- (57) Haase, C.; Rohde, H.; Seitz, O. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, 6807-6810.
- (58) Chen, J.; Wan, Q.; Yuan, Y.; Zhu, J. L.; Danishefsky, S. J. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47*, 8521-8524.
- (59) Ajish Kumar, K. S.; Haj-Yahya, M.; Olschewski, D.; Lashuel, H. A.; Brik, A. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48*, 8090-8094.
- (60) Yang, R. L.; Pasunooti, K. K.; Li, F. P.; Liu, X. W.; Liu, C. F. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 13592-13593.
- (61) El Oualid, F.; Merckx, R.; Ekkebus, R.; Hameed, D. S.; Smit, J. J.; de Jong, A.; Hilkmann, H.; Sixma, T. K.; Ovaa, H. *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*, 10149-10153.

- (62) Chen, J.; Wang, P.; Zhu, J. L.; Wan, Q.; Danishefsky, S. J. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2277-2283.
- (63) Harpaz, Z.; Siman, P.; Kumar, K. S. A.; Brik, A. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1232-1235.
- (64) Tan, Z. P.; Shang, S. Y.; Danishefsky, S. J. *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49*, 9500-9503.
- (65) Shang, S. Y.; Tan, Z. P.; Dong, S. W.; Danishefsky, S. J. *J Am Chem Soc* **2011**, *133*, 10784-10786.
- (66) Ding, H.; Shigenaga, A.; Sato, K.; Morishita, K.; Otaka, A. *Org Lett* **2011**, *13*, 5588-5591.
- (67) Siman, P.; Karthikeyan, S. V.; Brik, A. *Org Lett* **2012**, *14*, 1520-1523.
- (68) Malins, L. R.; Cergol, K. M.; Payne, R. J. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 559-563.
- (69) Thompson, R. E.; Chan, B.; Radom, L.; Jolliffe, K. A.; Payne, R. J. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52*, 9723-9727.
- (70) Guan, X.; Drake, M. R.; Tan, Z. *Org Lett* **2013**, *15*, 6128-6131.
- (71) Cergol, K. M.; Thompson, R. E.; Malins, L. R.; Turner, P.; Payne, R. J. *Org Lett* **2014**, *16*, 290-293.
- (72) Malins, L. R.; Cergol, K. M.; Payne, R. J. *Chem Sci* **2014**, *5*, 260-266.
- (73) Shang, S.; Tan, Z.; Danishefsky, S. J. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **2011**, *108*, 5986-5989.
- (74) Hejjaoui, M.; Haj-Yahya, M.; Kumar, K. S.; Brik, A.; Lashuel, H. A. *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50*, 405-409.
- (75) Fang, G. M.; Li, Y. M.; Shen, F.; Huang, Y. C.; Li, J. B.; Lin, Y.; Cui, H. K.; Liu, L. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2011**, *50*, 7645-7649.
- (76) Bang, D.; Pentelute, B. L.; Kent, S. B. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3985-3988.
- (77) Ollivier, N.; Vicogne, J.; Vallin, A.; Drobecq, H.; Desmet, R.; El Mahdi, O.; Leclercq, B.; Goormachtigh, G.; Fafeur, V.; Melnyk, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 209-213.
- (78) Zheng, J. S.; Tang, S.; Qi, Y. K.; Wang, Z. P.; Liu, L. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2483-2495.
- (79) Jbara, M.; Maity, S. K.; Brik, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10644-10655.
- (80) Huang, Y. C.; Chen, C. C.; Gao, S.; Wang, Y. H.; Xiao, H.; Wang, F.; Tian, C. L.; Li, Y. M. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7623.
- (81) Bang, D.; Kent, S. B. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534-2538.
- (82) Veber, D. F.; Milkowski, J. D.; Denkwalter, R. G.; Hirschmann, R. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *26*, 3057-3058.
- (83) Di Bello, C.; Filira, F.; Giormani, V.; D'Angeli, F. *J Chem Soc C* **1969**, 350-352.
- (84) Kumar, K. S.; Bavikar, S. N.; Spasser, L.; Moyal, T.; Ohayon, S.; Brik, A. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2011**, *50*, 6137-6141.
- (85) Sakamoto, I.; Tezuka, K.; Fukae, K.; Ishii, K.; Taduru, K.; Maeda, M.; Ouchi, M.; Yoshida, K.; Nambu, Y.; Igarashi, J.; Hayashi, N.; Tsuji, T.; Kajihara, Y. *J Am Chem Soc* **2012** *134*, 5428-5431.
- (86) Naeem, A.; Fazili, N. *Cell Biochem. Biophys.* **2011**, *61*, 237-250.
- (87) Vendruscolo, M.; Knowles, T. P. J.; Dobson, C. M. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a010454.
- (88) Hingorani, K. S.; Gierasch, L. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *24*, 81-90.
- (89) Gidalevitz, T.; Stevens, F.; Argon, Y. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1833*, 2410-2424.
- (90) Anfinsen, C. B.; Haber, E.; Sela, M.; White, F. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1961**, *47*, 1309-1314.
- (91) Anfinsen, C. B. *Science* **1973**, *181*, 223-230.
- (92) Levinthal, C. *Univ. Illinois Bull.* **1969**, *67*, 22-24.
- (93) Levinthal, C.; *Chim. J. Phys.* **1968**, *65*, 44-45.
- (94) Tsong, T. Y.; Baldwin, R. L.; Elson, E. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 1809-1812.

- (95) Ptitsyn, O. B. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1973**, *210*, 1213–1215.
- (96) Kim, P. S.; Baldwin, R. L. *Ann. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 459–489.
- (97) Fersht, A. R. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 650–654.
- (98) Brandts, J. F.; Halvorson, H. R.; Brennan, M. *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953–4963.
- (99) Itzhaki, L.S.; Otzen, D. E.; Fersht, A. R. *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 260–288.
- (100) Jackson, S. E.; Fersht, A. R. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10428–10435.
- (101) Jackson, S. E.; Fersht, A. R. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10436–10443.
- (102) Gianni, S.; Guydosh, N. R.; Khan, F.; Caldas, T. D.; Mayor, U.; White, G. W. N.; DeMarco, M. L.; Daggett, V.; Fersht, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 13286–13291.
- (103) McMorran, L. M.; Brockwell, D. J.; Radford, S. E. *Arch Biochem Biophys* **2014**, *564*, 265–280.
- (104) Smith, L. J.; Fiebig, K. M.; Schwalbe, H.; Dobson, C. M. *Fold Des.* **1996**, *1*, R95–R106.
- (105) Onuchic, J. N.; Wolynes, P. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 70–75.
- (106) Narayan, M.; Welker, E.; Wedemeyer, W. J.; Scheraga, H. A. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 805–812.
- (107) Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1981**, *151*, 261–287.
- (108) Flory, P. Ithaca : Cornell Univ. Press 1953.
- (109) Pace, C. N.; Grimsley, G. R.; Thompson, J. A.; Barnett, B. J. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11820–11825.
- (110) Abkevich, V. I.; Shakhnovich, E. I. *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 975–985.
- (111) Creighton, T. E. in *Methods in Enzymology*, 1986, ed. CHW Hirs, Timasheff, T. N., 131, 83–106. San Diego: Academic
- (112) Hogg, P. J. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 210–214.
- (113) Schmidt, B.; Ho, L.; Hogg, P. J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7429–7433.
- (114) Creighton, T. E.; Zapun, A.; Darby, N. J. *Trends Biotechnol.* **1995**, *13*, 18–23
- (115) Scheraga, H. A.; Wedemeyer, W. J. dans *Methods in Enzymology* 2001, ed AW Nicholson, 341, 189–221, San Diego Academic.
- (116) Arolas, J. L.; Aviles, F. X.; Chang, J. Y.; Ventura, S. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 292–301.
- (117) Wedmeyer, W. J.; Welker, E.; Narayan, M.; Scheraga, H. A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4207–4216.
- (118) Konishi, Y.; Ooi, T.; Scheraga, H. A. *Biochemistry* **1982**, *21*, 4734–4740.
- (119) Lyles, M. M.; Gilbert, H. F. *Biochemistry* **1991**, *30*, 613–619.
- (120) Gilbert, H. F. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1990**, *63*, 69–172.
- (121) Cabrele, C.; Fiori, S.; Pegoraro, S.; Moroder, L. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 731–740.
- (122) Gough, J. D.; Barrett, E. J.; Silva, Y.; Lees, W. J. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 39–47.
- (123) Beld, J.; Woycechowsky, K. J.; Hilvert, D. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5382–5390.
- (124) Woycechowsky, K. J.; Wittrup, K. D.; Raines, R. T. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 871–879.
- (125) Kibria, F. M.; Lees, W. J. *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 796–797.
- (126) Jongstra, B.; Schall, T. J.; Dyer, B. J.; Clayberger, C.; Jorgensen, J.; Davis, M. M. *J. Exp. Med.* **1987**, *165*, 601–614.
- (127) Peña, S. V.; Krensky A. M. *Semin. Immunol.* **1997**, *9*, 117–125

- (128) Bengsch, B.; Ohtani, T.; Herati, R. S.; Bovenschen, N.; Chang, K. M.; Wherry, E. J. *J. Immunol. Methods* **2018**, *453*, 3-10.
- (129) Stenger, S.; Dewan, P.; Niazi, K. R.; Froelich, C. J. *Science* **1998**, *282*, 121-125.
- (130) Spada, F. M.; Grant, E. P.; Peters, P. J.; Sugita, M.; Melián, A.; Leslie, D. S.; Lee, H. K.; van Donselaar, E.; Hanson, D. A.; Krensky, A. M.; Majdic, O.; Porcelli, S. A.; Morita, C. T.; Brenner, M. B. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 937-948.
- (131) Costa, G.; Guenot, M.; Mocan, I.; Halary, F.; Saint-basile, D.; Pitard, V.; Déchanet-Merville, J.; Moreau, J.; Troye-Blomberg, M.; Mercereau-Puijalon, O.; Behr, C. *Blood* **2011**, *118*, 6952–6962.
- (132) Guipouy, D.; Gertner Dardenne, J.; Pfajfer, L.; German, Y.; Belmonte, N.; Dupré, L. *Int. Immunol.* **2019**, *31*, 239-250.
- (133) Hanson, D.; Kaspar, A.; Poulain, F. R.; Krensky, A. M. *Mol. Immunol.* **1999**, *36*, 413-422.
- (134) Andersson, M.; Gunne, J.; Agerberth, B.; Boman, A.; Bergman, T.; Sillard, R.; Jörnvall, H.; Mutt, V.; Olsson, B.; Wigzell, H.; Dagrlind, A.; Boman, H. G.; Gudmundsson, G. H. *EMBO J.* **1995**, *14*, 1615-1625.
- (135) Linde, C. M. A.; Grundström, S.; Nordling, E.; Refai, E.; Brennan, P. J.; Andersson, M. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 6332-6339.
- (136) Krensky, A. M. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 317-320.
- (137) Andreu, D.; Carreno, C.; Linde, C.; Boman, H. G.; Andersson, M. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 845-849.
- (138) Krensky, A. M.; Clayberger, C. *Tissue Antigens* 2009, *73*, 193-198.
- (139) O'Brien, J. S. *FASEB J.* **1991**, *5*, 301-308.
- (140) Jacobs, K. A.; Phelps, D. S.; Steinbrink, R.; Fisch, J.; Kriz, R.; Mitscock, L.; Dougherty, J. P.; Taeusch, H. W.; Floros, J. J. *Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9808-9811.
- (141) Hagen, F. S.; Grant, F. J.; Kuijper, J. L.; Slaughter, C. A.; Moomaw, C. R.; Orth, K.; O'Hara, P. J.; Munford, R. S. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 8415-8423.
- (142) Schuchman, E. H.; Suchi, M.; Takahishi, T.; Sandhoff, K.; Desnick, R. J. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 8531-8539.
- (143) Leippe, M.; Andra, J.; Nickel, R.; Tannich, E.; Muller-Eberhard, H. J. *Mol. Microbiol.* **1994**, *14*, 895-904.
- (144) Leippe, M. *Toxicology* **1994**, *87*, 5-18.
- (145) Pena, S. V.; Krensky, A. M. *Semin. Immunol.* **1997**, *9*, 117-125.
- (146) Anderson, D.H.; Sawaya, M.R.; Cascio, D.; Ernst, W.; Modlin, R.; Krensky, A. M.; Eisenberg, D. J. *Mol. Biol.* **2003**, *325*, 355.
- (147) Andersson, M.; Jörnvall, H.; Johansson, J.; *FEBS Lett.* **1995**, *362*, 328-332.
- (148) Wang, Z.; Choice, E.; Kesper, A.; Hanson, D.; Okada, S.; Lyu, S. C.; Krensky, A. M.; Clayberger, C. J. *Immunol.* **2000**, *165*, 1486-1490.
- (149) Clayberger, C.; Finn, M. W.; Wang, T.; Saini, R.; Wilson, C.; Barr, V.; Sabatino, M.; Castiello, L.; Stroncek, D.; Krensky, A. M. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 6119-6126.
- (150) Lettau, M.; Armbrust, F.; Dohmen, K.; Drews, L.; Poch, T.; Dietz, M.; Kabelitz, D.; Janssen, O. *Int. Immunol.* **2018**, *30*, 215-228.
- (151) Lettau, M.; Dietz, M.; Dohmen, K.; Leippe, M.; Kabelitz, D.; Janssen, O. *Mol. Immunol.* **2019**, *107*, 44-53.

- (152) Stenger, S.; Hanson, D. A.; Teitelbaum, R.; Dewan, P.; Niazi, K. R.; Froelich, C. J.; Ganz, T.; Thoma-Uszynski, S.; Melian, A.; Bogdan, C.; Porcelli, S. A.; Bloom, B. R.; Krensky, A. M.; Modlin, R. L. *Science* **1998**, *282*, 121-125.
- (153) Chinnaiyan, A. M.; O'Rourke, K.; Tewari, M.; Dixit, V. M. *Cell* **1995**, *81*, 505-512.
- (154) Dotiwala, F.; Sen Santara, S.; Binker-Cosen, A. A.; Li, B.; Chandrasekaran, S.; Lieberman, J. *Physiol. Behav.* **2017**, *176*, 139–148.
- (155) Boman, H. G. *Ann. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 61-92.
- (156) Stenger, S.; Mazzaccaro, R. J.; Uyemura, K.; Cho, S.; Barnes, P. F.; Rosat, J. P.; Sette, A.; Brenner, M. B.; Porcelli, S. A.; Bloom, B. R.; Modlin, R. L. *Science* **1997**, *276*, 1684-1687.
- (157) Wang, Z.; Choice, E.; Kaspar, A.; Hanson, D.; Okada, S.; Lyu, S. C.; Krensky, A. M.; Clayberger, C. J. *Immunol.* **2017**, *165*, 1486-1490.
- (158) Maeda, Y.; Tamura, T.; Fukutomi, Y.; Mukai, T.; Kai, M.; Makino, M. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*, 1-10.
- (159) Kaspar, A.; Okada, S.; Kumar, J.; Poulain, F. R.; Drouvalakis, K.; Kelekar, A.; Hanson, D. A.; Kluck, R. M.; Hitoshi, Y.; Johnson, D. E.; Froelich, C. J.; Thompson, C. B.; Newmeyer, D. D.; Anel, A.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 350–356.
- (160) Gamen, S.; Hanson, D.; Kaspar, A.; Naval, J.; Krensky, A. M.; Anel, A. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 1758–1764.
- (161) Okada, S.; Li, Q.; Whitin, J. C.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 2556–2562.
- (162) Pardo, J.; Perez-Galan, P.; Gamen, S.; Marzo, I.; Monleon, I.; Kaspar, A. A.; Susin, S. A.; Kroemer, G.; Krensky, A. M.; Naval, J.; Anel, A. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 1222–1229.
- (163) Saini, R. V.; Wilson, C.; Finn, M. W.; Wang, T.; Krensky, A. M.; Clayberger, C. J. *Immunol.* **2011**, *186*, 3497–3504.
- (164) Sekiya, M.; Ohwada, A.; Katae, M.; Dambara, T.; Nagaoka, I. *Respirology* **2002**, *7*, 29–35.
- (165) Al-Wasaby, S.; de Miguel, D.; Aporta, A.; Naval, J.; Conde, B.; Martínez-Lostao, L.; Anel, A. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, 1–13.
- (166) Yi, Z.; Fu, Y.; Jin, G.; Li, M.; Zhang, X.; Song, W. *Cell. Immunol.* **2009**, *255*, 76–81.
- (167) Zitvogel, L.; Kroemer, G. *Blood* **2010**, *116*, 3379–3380.
- (168) Chung, W. H.; Hung, S. I.; Yang, J. Y.; Su, S. C.; Huang, S. P.; Wei, C. Y.; Chin, S. W.; Chiou, C. C.; Chu, S. C.; Ho, H. C.; Yang, C. H.; Lu, C. F.; Wu, J. Y.; Liao, Y. D.; Chen, Y.T. *Nat Med.* **2008**, *14*, 1343–50.
- (169) Finn, M. W.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *Protein Expr Purif.* **2011**, *75*, 70–74.
- (170) Wei, H. M.; Lin, L. C.; Wang, C. F.; Lee, Y. J.; Chen, Y. T.; Liao, Y. D. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0156321.
- (171) Tewary, P.; Yang, D.; de la Rosa, G.; Li, Y.; Finn, M. W.; Krensky, A. M.; Clayberger, C.; Oppenheim, J. J. *Blood* **2010**, *116*, 3465–3474.
- (172) Castiello, L.; Stroncek, D. F.; Finn, M. W.; Wang, E.; Marincola, F. M.; Clayberger, C.; Krensky, A. M.; Sabatino, M. *J. Transl. Med.* **2011**, *9*, 41.
- (173) Deng, A.; Chen, S.; Li, Q.; Lyu, S. C.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *J Immunol.* **2005**, *174*, 5243–5248.
- (174) Mander, T.; Hill, S.; Hughes, A.; Rawlins, P.; Clark, C.; Gammon, G.; Foxwell, B.; Moore, M. *Int. J. Immunopharmacol.* **1997**, *19*, 451.

- (175) Scimone, M. L.; Lutzky, V. P.; Zittermann, S. I.; Maffia, P.; Jancic, C.; Buzzola, F.; Issekutz, A. C.; Chuluyan, H. E. *Immunology*. **2005**, *114*, 375–385.
- (176) Sallusto, F.; Schaerli, P.; Loetscher, P.; Schaniel, C.; Lenig, D.; Mackay, C. R.; Qin, S.; Lanzavecchia, A. *Eur J Immunol*. **1998**, *28*, 2760–2769.
- (177) Schutysse, E.; Struyf, S.; Van, D. J. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2003**, *14*, 409–426.
- (178) Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. E. *J Interferon Cytokine Res*. **2009**, *29*, 313–326.
- (179) Rey-Gallardo, A.; Escribano, C.; Delgado-Martin, C.; Rodriguez-Fernandez, J. L.; Gerardy-Schahn, R.; Rutishauser, U.; Corbi, A. L.; Vega, M. A. *Glycobiology* **2010**, *20*, 1139–1146.
- (180) Vanbervliet, B.; Bendriss-Vermare, N.; Massacrier, C.; Homey, B.; de Bouteiller, O.; Briere, F.; Trinchieri, G.; Caux, C. *J Exp Med*. **2003**, *198*, 823–830.
- (181) Gouwy, M.; Struyf, S.; Proost, P.; Van Damme, J. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2005**, *16*, 561–580.
- (182) Rosenkilde, M. M. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, 1–13.
- (183) Alcami, A.; Saraiva, M. *Adv Exp Med Biol*. **2009**, *666*, 167–179.
- (184) Farrugia, M.; and Baron, B. *Int. J. Inflamm*. **2017**, 83912300
- (185) Pitabut, N.; Sakurada, S.; Tanaka, T.; Ridruechai, C.; Tanuma, J.; Aoki, T.; Kantipong, P.; Piyaworawong, S.; Kobayashi, N.; Dhepakson, P.; Yanai, H.; Yamada, N.; Oka, S.; Okada, M.; Khushmith, S.; Keicho, N. *Int. J. Med. Sci*. **2013**, *10*, 1003-1014.
- (186) Sahiratmadja, E.; Alisjahbana, B.; Buccheri, S; Di Liberto, D.; de Boer, T.; Adnan, I.; van Crevel, R.; Klein, M. R.; van Meijgaarden, K. E.; Nelwan, R. H. H.; van de Vosse, E.; Dieli, F.; Ottenhoff, T. H. M. *Tuberculosis* **2007**, *87*, 312-321.
- (187) Ernst, W. A.; Thoma-Uszynski, S.; Teitelbaum, R.; Ko, C.; Hanson, D. A.; Clayberger, C.; Krensky, A. M.; Leippe, M.; Bloom, B. R.; Ganz, T.; Modlin, R. L. *J. Immunol*. **2000**, *165*, 7102-7108.
- (188) Dieli, F.; Troye-Blomberg, M.; Ivanyi, J.; Fournié, J. J.; Krensky, A. M.; Bonneville, M.; Peyrat, M. A.; Caccamo, N.; Sireci, G.; Salerno, A. *J. Infect. Dis*. **2001**, *184*, 1082-1085.
- (189) Lu, C. C.; Wu, T. S.; Hsu, Y. J.; Chang, C. J.; Lin, C. S.; Chia, J. H.; Wu, T. L.; Huang, T. T.; Martel, J.; Ojcius, D. M.; Young, J. D.; Lai, H. C. *J. Leukoc. Biol*. **2014**, *96*, 1119-1129.
- (190) Ochoa, M. T.; Stenger, S.; Sieling, P.; Thoma-Uszynski, S.; Sabet, S.; Cho, S.; Krensky, A. M.; Rollinghoff, M.; Nunes Sarno, E.; Burdick, A. E.; Rea, T. H.; Modlin, R. L. *Nat. Med*. **2001**, *7*, 174–179.
- (191) Chun, F. Z.; Ling, L. M.; Jones, G. J.; Gill, M. J.; Krensky, A. M.; Kubes, P.; Mody, C. H. *Blood* **2007**, *109*, 2049–2057.
- (192) Farouk, S. E.; Mincheva-Nilsson, L.; Krensky, A. M.; Dieli, F.; Troye-Blomberg, M. *Eur. J. Immunol*. **2004**, *34*, 2248–2256.
- (193) Kishi, A.; Takamori, Y.; Ogawa, K.; Takano, S.; Tomita, S.; Tanigawa, M.; Niman, M.; Kishida, T.; Fujita, S. *Cancer Immunol Immunother*. **2002**, *50*, 604–614.
- (194) Pages, F.; Berger, A.; Camus, M.; Sanchez-Cabo, F.; Costes, A.; Molidor, R.; Mlecnik, B.; Kirilovsky, A.; Nilsson, M.; Damotte, D.; Meatchi, T.; Bruneval, P.; Cugnenc, P. H.; Trajanoski, Z.; Fridman, W. H.; Galon, J. *N Engl J Med*. **2005**, *353*, 2654–2666.

- (195) Saigusa, S.; Ichikura, T.; Tsujimoto, H.; Sugawara, H.; Majima, T.; Kawarabayashi, N.; Chochi, K.; Ono, S.; Kinoshita, M.; Seki, S.; Ogawa, K.; Mochizuki, H. *J Gastroenterol Hepatol.* **2007**, *22*, 1322–1327.
- (196) Nagasawa, M.; Kawamoto, H.; Tsuji, Y.; Mizutani, S. *Int J Hematol.* **2005**, *82*, 456–457.
- (197) Sekiya, M.; Ohwada, A.; Katae, M.; Dambara, T.; Nagaoka, I.; Fukuchi, Y. *Respirology.* **2002**, *7*, 29–35.
- (198) Krensky AM, Clayberger C. *Am J Transplant.* 2005, *5*, 1789–1792.
- (199) Sarwal, M. M.; Jani, A.; Chang, S.; Huie, P.; Wang, Z.; Salvatierra, O. Jr.; Clayberger, C.; Sibley, R.; Krensky, A. M.; Pavlakis, M. *Hum Immunol.* **2001**, *62*, 21–31.
- (200) Kotsch, K.; Mashreghi, M. F.; Bold, G.; Tretow, P.; Beyer, J.; Matz, M.; Hoerstrup, J.; Pratschke, J.; Ding, R.; Suthanthiran, M.; Volk, H. D.; Reinke, P. *Transplantation* **2004**, *77*, 1866–1875.
- (201) Hidalgo, L. G.; Einecke, G.; Allanach, K.; Mengel, M.; Sis, B.; Mueller, T. F.; Halloran, P. F. *Am J Transplant.* **2008**, *8*, 637–646.
- (202) Nagasawa, M.; Isoda, T.; Itoh, S.; Kajiwara, M.; Morio, T.; Shimizu, N.; Ogawa, K.; Nagata, K.; Nakamura, M.; Mizutani, S. *Am J Hematol.* **2006**, *81*, 340–348.
- (203) Oono, T.; Morizane, S.; Yamasaki, O.; Shirafuji, Y.; Huh, W. K.; Akiyama, H.; Iwatsuki, K. *Br J Dermatol.* **2004**, *150*, 904–909.
- (204) Raychaudhuri, S. P.; Jiang, W. Y.; Raychaudhuri, S. K.; Krensky, A. M. *J Am Acad Dermatol.* **2004**, *51*, 1006–1008.
- (205) Ammar, M.; Mokni, M.; Boubaker, S.; El Gaied, A.; Ben Osman, A.; Louzir, H. *J Cutan Pathol.* **2008**, *35*, 630–634.
- (206) Morizane, S.; Suzuki, D.; Tsuji, K.; Oono, T.; Iwatsuki, K. *Br J Dermatol.* **2005**, *153*, 981–986.
- (207) King, A. E.; Critchley, H. O.; Kelly, R. W. *Reprod Biol Endocrinol.* **2003**, *1*, 116–123.
- (208) Mincheva-Nilsson, L.; Nagaeva, O.; Sundqvist, K. G.; Hammarstrom, M. L.; Hammarstrom, S.; Baranov, V. *Int Immunol.* **2000**, *12*, 585–596.
- (209) Balogh, G. A.; Russo, I. H.; Spittle, C.; Heulings, R.; Russo, J. *Int J Oncol.* **2007**, *31*, 303–312.
- (210) Qiu, C.; Saito, S.; Sakai, M.; Ogawa, K.; Nagata, K.; Williams, M. A. *Clin Biochem.* **2006**, *39*, 1016–1021.
- (211) Sakai, M.; Ogawa, K.; Shiozaki, A.; Yoneda, S.; Sasaki, Y.; Nagata, K.; Saito, S. *Clin Exp Immunol.* **2004**, *136*, 114–119.
- (212) Saito, S.; Shiozaki, A.; Nakashima, A.; Sakai, M.; Sasaki, Y. *Mol Aspects Med.* **2007**, *28*, 192–209.
- (213) Ellerby, H. M.; Lee, S.; Ellerby, L. M.; Chen, S.; Kiyota, T.; del Rio, G.; Sugihara, G.; Sun, Y.; Bredesen, D. E.; Arap, W.; Pasqualini, R. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35311–35316.
- (214) Li, Q.; Dong, C.; Deng, A.; Katsumata, M.; Nakadai, A.; Kawada, T.; Okada, S.; Clayberger, C.; Krensky, A. M. *Agents Chemother.* **2005**, *49*, 388–397.
- (215) Pena, S. V.; Hanson, D. A.; Carr, B. A.; Goralski, T. J.; Krensky, A. M. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 2680–2688.
- (216) Gamen, S.; Hanson, D. A.; Kaspar, A.; Naval, J.; Krensky, A. M.; Anel, A. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 1758–1764.
- (217) Pardo, J.; Perez-Galan, P.; Gamen, S.; Marzo, I.; Monleón, I.; Kaspar, A. A.; Susín, S. A.; Kroemer, G.; Krensky, A. M.; Naval, J. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 1222–1229.

- (218) Aporta, A.; Catalan, E.; Galan-Malo, P.; Ramírez-Labrada, A.; Pérez M.; Azaceta G.; Palomera L.; Naval, J.; Marzo, I.; Pardo, J.; Anel, *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *87*, 410–423.
- (219) Anel Bernal, L. A.; Aporta Clemente, A.; Pardo Jimeno, J.; Conde Guerri, B.; Martinez-Lostao, L. WO2014122351 (2014).
- (220) Al-Wasaby, S.; de Miguel, D.; Aporta, A.; Naval, J.; Conde, B.; Martínez-Lostao, L.; Anel, A. *Oncolimmunology* **2015**, *4*, e1036213,
- (221) Andreu, D.; Carreño, C.; Linde, C.; Boman, H. G.; Andersson, M. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 845-849.
- (222) Ernst W. A.; Thoma-Uszynski, S.; Teitelbaum, R.; Ko, C.; Hanson, D. A.; Clayberger, C.; Krensky, A. M.; Leippe M.; Bloom, B. R.; Ganz, T.; Modlin, R. L. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 7102-7108.
- (223) Hamamoto, K.; Kida, Y.; Zhang, Y.; Shimizu, T.; Kuwano, K. *Microbiol Immunol* **2002**, *46*, 741-749.
- (224) Da Silva, A. P.; Unks, D.; Lyu, S. C.; Ma, J.; Zbozien-Pacamaj, R.; Chen, X.; Krensky, A. M.; Clayberger, C. J. *Antimicrob Chemother.* **2008**, *61*, 1103–1109.
- (225) Chen, X.; Howe, J.; Andrä, J.; Rössle, M.; Richter, W.; da Silva, A. P.; Krensky, A. M.; Clayberger, C.; Brandenburg, K. *Biochim Biophys Acta.* **2007**, *1768*, 2421–2431.
- (226) McInturff, J. E.; Wang, S. J.; Machleidt, T.; Lin, T. R.; Oren, A.; Hertz, C. J.; Krutzik, S. R.; Hart, S.; Zeh, K.; Anderson, D. H.; Gallo, R. L.; Modlin, R. L.; Kim, J. *J Invest Dermatol* **2005**, *125*, 256-263.
- (227) Siano, A.; Tonarelli, G.; Imaz, M. S.; Perín, J. C.; Ruggeri, N.; López, M.; Santi, M. N.; Zerbini, E. *Protein Pept. Lett.* **2010**, *17*, 517-521.
- (228) Melero, I.; Hervas-Stubbs, S.; Glennie, M.; Pardoll, D. M.; Chen, L. *Nature Reviews Cancer* **2007**, *7*, 95–106.
- (229) Baggiolini, M. *Nature* **1998**, *392*, 565–568.
- (230) Dianqing, W. U. *Cell Research* **2015**, *15*, 52–56.
- (231) Arellano, M.; Lonial, S. *Biologics.* **2008**, *2*, 13–27.
- (232) Yacoub, H. A.; Al-Maghrabi, O. A.; Ahmed, E. S.; Uversky, V. N. J. *Biomol. Struct. Dyn.* **2017**, *35*, 836.
- (233) Hanson, D. A.; Ziegler, S. F. *J Negat Results Biomed.* **2004**, *3*, 2.
- (234) Houchins, J. P.; Kricek, F.; Chujor, C. S.; Heise, C. P.; Yabe, T.; McSherry, C.; Bach F. H. *Immunogenetics* **1993**, *37*, 102-107.
- (235) Hackeng, T. M.; Griffin, J. H.; Dawson, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10068.
- (236) Cargoët, M. (2017) Nouvelles méthodologies pour la synthèse de protéines, Thèse de doctorat, Université de Lille.
- (237) Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. *Chem. Commun.* **2004**, 124–125.
- (238) Mutter, M.; Nefzi, A.; Sato, T.; Sun, X.; Wahl, F.; Wöhr, T. *Pept Res.* **1995**, *8*, 145-153.
- (239) García-Martín, F.; Quintanar-Audelo, M.; García-Ramos, Y.; Cruz, L. J.; Gravel, C.; Furic, R.; Côté, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2006**, *8*, 213-220.
- (240) Boll, E.; Drobecq, H.; Ollivier, N.; Raibaut, L.; Desmet, R.; Vicogne, J.; Melnyk, O. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2017-2022.
- (241) Ollivier, N.; Desmet, R.; Drobecq, H.; Blanpain, A.; Boll, E.; Leclercq, B.; Mougél, A.; Vicogne, J.; Melnyk, O. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5362–5370.

- (242) Bouchenna, J.; Sénéchal, M.; Drobecq, H.; Vicogne, J.; Melnyk, O. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 2967–2973.
- (243) Snella, B.; Diemer, V.; Drobecq, H.; Agouridas, V.; Melnyk, O. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 7616–7619.
- (244) Zhang, R.; Snyder, G. H. *Biochem.* **1988**, *27*, 3785.
- (245) Wu, C.; Leroux, J. C.; Gauthier, M. A. *Nat Chem* **2012**, *4*, 1044.
- (246) Banci, L.; Bertini, I.; Cefaro, C.; Ciofi-Baffoni, S.; Gallo, A.; Martinelli, M.; Sideris, D. P.; Katrakili, N.; Tokatlidis, K. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 198.
- (247) Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 7.
- (248) Kelly, S. M.; Price, N. C. *Biochim Biophys Acta* **1997**, *1338*, 161–185.
- (249) Hammes, G. G. (2005) *Spectroscopy for the Biological Sciences*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- (250) Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. (2000) *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2nd edn. New York, USA: Wiley-VCH.
- (251) Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C. *Biochim Biophys Acta* **2005**, *1751*, 119–139.
- (252) Greenfield, N.; Fasman, G. D. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108–4116.
- (253) Lobley, A.; Whitmore, L.; Wallace, B. A. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 211–212.
- (254) Sreerama, N.; Woody, R. W. *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 252–260.
- (255) Lees, J. G.; Miles, A. J.; Wien, F.; Wallace, B. A. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1955–1962.
- (256) Leber, T. *Fortschr Med.* **1888**, *6*, 460–464.
- (257) Bonner, J. T. *J Exp Zool.* **1947**, *106*, 1–26.
- (258) Jin, T.; Hereld, D. *Eur J Cell Biol.* **2006**, *85*, 905–913.
- (259) Jin, T.; Xu, X.; Hereld, D. *Cytokine* **2008**, *44*, 1–8.
- (260) Falasca, M.; Raimondi, C.; Maffucci, T. (2011) Boyden Chamber. Wells C., Parsons M. (eds) *Cell Migration. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 769. Humana Press.
- (261) Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. E. *J Interferon Cytokine Res.* **2009**, *29*, 313–326.
- (262) Michon, A. L.; Jumas-Bilak, E.; Chiron, R.; Lamy, B.; Marchandin, H. *PLoS One.* **2014**, *9*, e90164.
- (263) Bickel, M. *J Periodontol.* **1993**, *64*, 456–460.
- (264) Vazirinejad, R.; Ahmadi, Z.; Kazemi Arababadi, M.; Hassanshahi, G.; Kennedy, D. *Neuroimmunomodulation* **2014**, *21*, 322–330.
- (265) Yücel, G.; Zhao, Z.; El-Battrawy, I.; Lan, H.; Lang, S.; Li, X.; Buljubasic, F.; Zimmermann, W. H.; Cyganek, L.; Utikal, J.; Ravens, U.; Wieland, T.; Borggreffe, M.; Zhou, X. B.; Akin, I. *Sci Rep* **2017**, *7*, 2935.
- (266) Venereau, E.; Casalgrandi, M.; Schiraldi, M.; Antoine, D. J.; Cattaneo, A.; De Marchis, F.; Liu, J.; Antonelli, A.; Preti, A.; Raeli, L.; Shams, S. S.; Yang, H.; Varani, L.; Andersson, U.; Tracey, K. J.; Bachi, A.; Ugucioni, M.; Bianchi, M. E. *J Exp Med* **2012**, *209*, 1519–1528.
- (267) Kew, R. R.; Penzo, M.; Habieli, D. M.; Marcu, K. B. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 2380–2386.
- (268) Schiraldi, M.; Ruccia, A.; Martínez Muñoz, L.; Livoti, E.; Celona, B.; Venereau, E.; Apuzzo, T.; De Marchis, F.; Pedotti, M.; Bachi, A.; Thelen, M.; Varani, L.; Mellado, M.; Proudfoot, A.; Bianchi, M. E.; Ugucioni, M. *J Exp Med* **2012**, *209*, 551–563.
- (269) Yang, D.; Chen, Q.; Yang, H.; Tracey, K. J.; Bustin, M.; Oppenheim, J. J. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81*, 59–66.

- (270) Yang, H.; Hreggvidsdottir, H. S.; Palmblad, K.; Wang, H.; Ochani, M.; Li, J.; Lu, B.; Chavan, S.; Rosas-Ballina, M.; Al-Abed, Y.; Akira, S.; Bierhaus, A.; Erlandsson-Harris, H.; Andersson, U.; Tracey, K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2010**, *107*, 11942–11947.
- (271) Zhao, S.; Wu, B.; Stevens, R. C. *Structure* **2019**, *27*, 405–408.
- (272) Andreasen C, Carbonetti NH. *Infect Immun.* **2008**, *76*, 5139–5148.
- (273) Delneste, Y.; Beauvillain, C.; Jeannin, P. *Med Sci* **2007**, *23*, 67–74.
- (274) Adan, A.; Alizada, G.; Kiraz, Y.; Baran, Y.; Nalbant, A. *Crit Rev Biotechnol*, **2017**; *37*, 163–176.
- (275) Völkl A. Encyclopedia of Life Sciences (ELS) John Wiley & Sons, Ltd; Chichester: 2010. Ultracentrifugation.
- (276) Freedman, R. B.; Hirst, T. R.; Tuite, M. F. *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 331–336.
- (277) Hatahet, F.; Ruddock, L. W. *FEBS J.* **2007**, *274*, 5223–5234.
- (278) Hudson, D. A.; Gannon, S. A.; Thorpe, C. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *80*, 171–182.
- (279) Freedman, R. B. *Curr. Op. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 85–91.
- (280) Wang, L.; Wang, X.; Wang, C. C. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *83*, 305–313.
- (281) Puig, A.; Gilbert, H. F. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 7764–7771.
- (282) Wilson, R.; Lees, J. F.; Bulleid, N. J. *J. Biol. Chem* **1998**, *273*, 9637–9643.
- (283) Fenouillet, E.; Barbouche, R.; Courageot, J.; Miquelis, R. *J Infect Dis* **2001**, *183*, 744–752.
- (284) Jain, S.; McGinnes, L. W.; Morrison, T. G. *J Virol* **2007**, *81*, 2328–2339.
- (285) Fenouillet, E.; Barbouche, R.; Jones, I. M. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 1009–1034.
- (286) Lippok, S.; Kolšek, K.; Löf, A.; Eggert, D.; Vanderlinden, W.; Müller, J. P.; König, G.; Obser, T.; Röhrs, K.; Schneppenheim, S.; Budde, U.; Baldauf, C.; Aponte-Santamaría, C.; Gräter, F.; Schneppenheim, R.; Rädler, J. O.; Brehm, M. A. *Blood* **2016**, *127*, 1183–1191.
- (287) Shi, Y.; Wang, C.; Wu, D.; Zhu, Y.; Wang, Z.; Peng, X. *Life Sciences* **2020**, *255*, 117841.
- (288) Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Melnyk, O. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 15140–15152.
- (289) Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Cargoët, M.; Melnyk, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4938–4945.
- (290) Pira, S.L.; El Mahdi, O.; Raibaut, L.; Drobecq, H.; Dheur, J.; Boll, E.; Melnyk, O. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7211–7216.
- (291) Hupe, D. J.; Jencks, W.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 451–464.
- (292) Cargoët, M.; Diemer, V.; Snella, B.; Desmet, R.; Blanpain, A.; Drobecq, H.; Agouridas, V.; Melnyk, O. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12584–12594.
- (293) Mitchell, N.J.; Malins, L.R.; Liu, X.; Thompson, R.E.; Chan, B.; Radom, L.; Payne, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14011–14014.
- (294) Durek, T.; Alewood, P.F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12042–12045.
- (295) Shefter, E.; Kennard, O. *Science* **1966**, *153*, 1389.
- (296) Chu, S.-H.; Mautner, H.G. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 308–312.
- (297) Günther, W.H.H.; Mautner, H.G. *J. Med. Chem.* **1964**, *7*, 229–232.
- (298) Krief, A.; Dumont, W.; Delmotte, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1669–1672.
- (299) Li, J. B.; Tang, S.; Zheng, J. S.; Tian, C. L.; Liu, L. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1143–1153.

- (300) Raibaut, L.; Adihou, H.; Desmet, R.; Delmas, A. F.; Aucagne, V.; Melnyk, O. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4061-4066.
- (301) Loibl, S. F.; Harpaz, Z.; Zitterbart, R.; Seitz, O. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6753-6759.
- (302) Bracher, P. J.; Snyder, P. W.; Bohall, B. R.; Whitesides, G. M. *Orig Life Evol Biosph* **2011**, *41*, 399-412.

Annexes

Annexe 1. Experimental part

Table of content

1.	General methods.....	S225
1.1.	Reagents and solvents.....	S225
1.2.	Analyses.....	S226
1.3.	Peptide and protein purification.....	S227
1.4.	Cell culture.....	S227
1.5.	Isolation of PBMC.....	S227
2.	Characterization of commercial 15-GN.....	S228
3.	Peptide synthesis.....	S231
3.1.	General procedures.....	S231
3.2.	Synthesis and characterization of peptide amides.....	S233
3.3.	Synthesis and characterization of SEA ^{off} peptide.....	S247
3.4.	Synthesis and characterization of MPA thioester peptide.....	S263
4.	Synthesis of linear granulysin polypeptides.....	S271
4.1.	Assembly of 15-GN-I	S271
4.2.	Assembly of 9-GN-I	S281
4.3.	Assembly of Nter_{15-GN-I}	S288
4.4.	Assembly of 15-GN_{Y66C-I}	S291
4.5.	Assembly of 15-GN_{C138A-I}	S297
4.6.	Assembly of 15-GN_{APA-I}	S303
4.7.	Assembly of 15-GN_{biot-I}	S307
5.	Folding and characterization of granulysin proteins.....	S313
5.1.	Folding and characterization of 15-GN-f	S313
5.2.	Folding and characterization of 9-GN-f	S321
5.3.	Folding and characterization of 15-GN_{Y66C-f}	S325
5.4.	Folding and characterization of 15-GN_{C138A-f}	S331
5.5.	Folding and characterization of 15-GN_{APA-f}	S338
5.6.	Folding and characterization of 15-GN_{biot-f}	S342
6.	Structural characterization using circular dichroism.....	S349
7.	Biological characterization.....	S351
7.1.	Chemotaxis assays.....	S351
7.2.	Antibacterial activity measurement.....	S351
7.3.	Macrophage immunomodulation assays.....	S351
8.	Flow cytometry.....	S352

9.	Confocal microscopy	S353
10.	Pull down assays.....	S356
11.	SEA/thioester exchange catalysis.....	S357
11.1.	Synthesis of diselenide 6	S357
11.2.	Synthesis of diselenide 7	S359
11.3.	Kinetic studies and modeling.....	S360
11.4.	Additional mass spectrometry data for AcA-B-SEA transthioesterification	S364

1. General methods

1.1. Reagents and solvents

1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU), 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU), O-(1*H*-6-chlorobenzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HCTU), 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) and *N*-Fmoc protected amino acids were obtained from Iris Biotech GmbH. Side-chain protecting groups used for the amino acids were Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Biot)-OH, Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH, Fmoc-Thr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Cys(*St*Bu)-OH or Fmoc-Cys(Trt)-OH. Fmoc-Ala-ThrΨ(Me,Me)Pro-OH was obtained from Bachem.

The synthesis of *bis*(2-sulfanylethyl)aminotrityl polystyrene (SEA PS) solid support was carried out as described elsewhere.^{1,2} Synthesis of *bis*(2-sulfanylethyl)aminotrityl ChemMatrix® (SEA ChemMatrix®) resin was carried out as described elsewhere.^{3,4} 4-Mercaptophenylacetic acid (97%, MPAA), 3-mercaptopropionic acid (MPA), *tris*(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (≥ 98%), TCEP), triisopropylsilane (TIS), dimethyl sulfide (DMS), guanidine hydrochloride (Gn·HCl, ≥ 99%), sodium phosphate dibasic dihydrate (≥ 99%), hydrochloric acid (reagent grade, 37% w/v) and sodium hydroxide (pellets, 97%) were purchased from Sigma-Aldrich. All other reagents were purchased from Acros Organics or Merck and were of the purest grade available.

Peptide synthesis grade *N,N*-dimethylformamide (DMF), dichloromethane (CH₂Cl₂), diethylether (Et₂O), acetonitrile (CH₃CN), heptane, LC–MS-grade acetonitrile (CH₃CN, 0.1% TFA), LC–MS-grade water (H₂O, 0.1% TFA), *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA), acetic anhydride (Ac₂O) were purchased from Biosolve and Fisher-Chemical. Trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Sigma Aldrich. Formic acid (FA) reagent grade was obtained from Sigma Aldrich. Water was purified with a Milli-Q Ultra Pure Water Purification System.

¹ Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Bis(2-Sulfanylethyl)Amino Native Peptide Ligation. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5238-5241.

² Ollivier, N.; Raibaut, L.; Blanpain, A.; Desmet, R.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Boll, E.; Drobecq, H.; Pira, S. L.; Melnyk, O. Tidbits for the Synthesis of *Bis*(2-Sulfanylethyl)Amido (SEA) Polystyrene Resin, SEA Peptides and Peptide Thioesters. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 92–97.

³ Boll, E.; Drobecq, H.; Ollivier, N.; Blanpain, A.; Raibaut, L.; Desmet, R. *et al.* One-pot chemical synthesis of small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein-peptide conjugates using *bis*(2-sulfanylethyl)amido peptide latent thioester surrogates *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 269-292.

⁴ Boll, E.; Drobecq, H.; Ollivier, N.; Raibaut, L.; Desmet, R.; Vicogne, J.; Melnyk, O. A novel PEG-based solid support enables the synthesis of >50 amino-acid peptide thioesters and the total synthesis of a functional SUMO-1 peptide conjugate *Chem Sci* **2014**, *5*, 2017-2022.

1.2. Analyses

Products were characterized by analytical UPLC-MS using a System Ultimate 3000 UPLC (ThermoFisher) equipped with a diode array detector, a charged aerosol detector (CAD) and a mass spectrometer (Ion trap LCQfleet). The column eluate was monitored by UV at 215 nm and CAD. The peptide masses were measured by on-line UPLC-MS (LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer, ThermoFisherScientific). Unless otherwise specified, heat temperature is set at 350 °C, spray voltage at 2.8 kV, capillary temperature at 350 °C, capillary voltage at 10 V, tube lens voltage at 75 V.

MALDI-TOF mass spectra were recorded with a Bruker Autoflex Speed using alpha cyano 4-hydroxycinnamic acid, sinapinic acid or 2,5-dihydroxybenzoic acid as matrix. The observed m/z corresponded to the monoisotopic ions, unless otherwise stated.

Protein gel electrophoresis assay were performed using NuPAGE™ as follow. Electrophoresis migration electrolyte solution was prepared by diluting NuPAGE™ 20X (Novex, Lifetechnologies, ref NP0002, MES SDS running buffer) 20 folds with MilliQ water (40 mL NuPAGE 20X + 760 mL water). Protein separation was performed using 4-12% Bis-Tris NuPAGE gels (Invitrogen, 1.5 mm, 10 wells). The gel wells were washed three times with the migration solution and placed in the migration chamber. NOVEX sharp protein standards (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, ref LC5800, 8 µL) were used to estimate the apparent molecular weight of the proteins. DTT and mercaptoethanol were added to the aqueous protein sample (245 mM final concentration for both of them). The resulting mixture was mixed to NuPAGE LDS Sample buffer 4X (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, ref NP0007), incubated 10 min at 70 °C and loaded into the gel. The resulting mixtures were incubated 10 min at 70 °C and loaded into the gel. The voltage applied to the gel was 150 V for 45 min. For Coomassie staining, the gel was out-casted and immersed in AcOH/MeOH : 2/5 v/v to fix the protein. The solution was removed and replaced by MeOH/AcOH : 5/1 v/v to which a Coomassie methanolic solution (Brilliant Blue R, Sigma, 0.4 g L⁻¹, 3 mL) was added. The gel was agitated until staining of the protein bands (usually overnight). The Coomassie solution was replaced by AcOH/MeOH: 2/5 v/v for unstaining. Cellulose paper was added to the petri dish to absorb the excess of Coomassie dye. The gel was agitated gently until crystal-clear background. For silver nitrate staining, the out-casted gel is firstly immersed overnight in MeOH/AcOH/H₂O 4/1/5 v/v/v at 4°C. Gel is successively immersed at rt for 20 min in 100 mL of CuCl₂ (Acros organics, ref 355281000) 2%-wt/vol in water, for 15 min in 100 mL of 10%-vol EtOH, AcOH 5%-vol in water, for 10 min in 100 mL of KMnO₄ (Alfa Aesar, ref: A12170) 0.01%-wt/vol in water, for 15 min in 100 mL of 10%-vol EtOH, AcOH 5%-vol in water, for 10 min in water, for 15 min 100 mL of AgNO₃ (Touzart et Matignon) 0.1%-wt/vol in water and for 45 sec in water. Bands were revealed by incubating the gel in 100 mL of K₂CO₃ (Sigma Aldrich, ref: 1002298755) 2%-wt/vol containing 40 µL of 37% aqueous formaldehyde (Rectapur, ref: 20880.290) until satisfaction and the reaction is quenched by immersing the gel in AcOH 5%-vol in water. The gel was finally imaged on a white light transilluminator using a CCD camera

For Western Blot assays, samples were separated using NuPAGE™ gel electrophoresis (Invitrogen, 1.5 mm, 10 wells) as previously described and electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore) in MeOH 1/9 v/v in water containing 25 mM of Tris/Glycine at pH 8.5 and 0.025%-vol of SDS. Membrane was next saturated in PBS buffer containing 1% casein, 0.1% Tween®20 for 30 min at rt. When necessary, membrane was cut near to 80, 50 and 30 kDa markers to

probe simultaneously Na/K ATPase, LaminB1, MCT4 and **15-GN_{biot}-f** Membranes were probed overnight at 4°C with primary antibodies diluted to 1/1000 in 5% BSA and 0.1% sodium azide in PBS using specific anti-PDI-A1 (Abcam, anti-P4HB [EPR9499], ref ab137110) anti-Na/K ATPase (Novus biologicals, ref: NB300-146), anti-LaminB1 (Abcam, ref: ab 16048), anti-MCT4 (Santa Cruz biotechnology inc., SC-50329). After extensive wash with PBS-0.05%Tween®20 followed incubation with anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, ref: 115-035-146) or anti-rabbit (Vector Laboratories inc., ref: GBA-4001) peroxidase-conjugated IgG secondary antibodies diluted to 1/30000 in PBS-casein 0.2%. For biotin detection, membrane was incubated with Streptavidin-HRP polymer (Sigma, ref: S2438) at 5 ng/mL in PBS/1% casein for 30 min. Protein-antibody complexes were visualized by chemiluminescence with the SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Thermo scientific) using a LAS-4000 imaging system (GE HeathCare Life Sciences).

1.3. Peptide and protein purification

Preparative reverse phase HPLC of crude peptides were performed with a preparative HPLC Waters system using the appropriate linear gradient of increasing concentration of eluent B in eluent A (flow rate of 6 mL min⁻¹, detection at 215 nm). Selected fractions were then combined and lyophilized.

1.4. Cell culture

Cell lines THP-1 and U-937 were obtained from ATCC (TIB-202 and CRL-1593.2 respectively) and cultivated in Gibco RPMI Media supplemented with GlutaMax® (ref: 61870-010, batch: 2293657), 10% Fetal Bovin Serum (Gibco, ref: 10270-106, batch: 42F0375K) and Zellsheild® as antibiotics and antimycoplasm. Cells were grown under standard tissue culture conditions (37°C, 5% CO₂, 100% humidity).

For differentiation, THP-1 and U-937 cells were seeded to 5.10⁴ cells/mL and grown for 72 hours with 100 ng/mL of PMA.

1.5. Isolation of PBMC

Blood monocytes were purified by positive selection over a MACS column using anti-CD14-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer protocol.

2. Characterization of commercial 15-GN

Recombinant 15-GN was purchased from R&D systems, ref: 3138-GN-025/CF, batch: OHB1514121.

The disulfide bridge pattern of commercial 15-GN as deduced from proteomic experiments is shown in Figure S 1.

Experimental determination of disulfide bridge patterns was achieved by collecting peak observed by HPLC, by performing the enzymatic digestion and by identifying the resulting fragments by mass spectrometry using non-reducing conditions. Fragments obtained by digestion with trypsin (Figure S 2) permitted the direct assignment of Cys96-Cys107 and revealed the partial occurrence of Cys43-Cys45. Digestion with pepsin (Figure S 3) proved the mutation of position 119 and ensure the presence of Cys69-Cys132 disulfide bond.

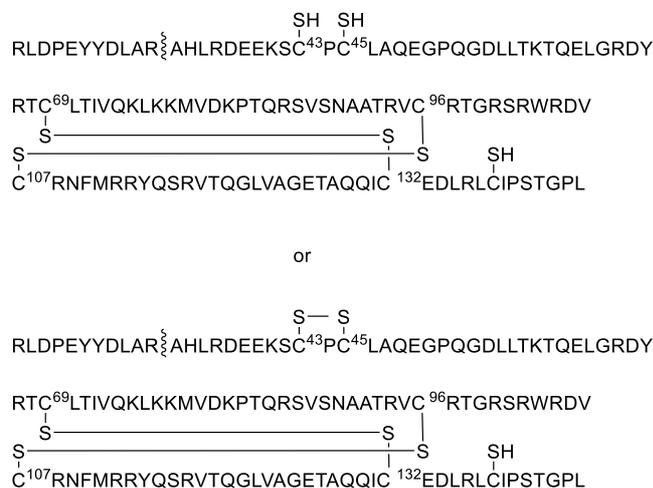


Figure S 1. Disulfide bridge patterns for commercial 15-GN.

Trypsin digestion

Prior to use, recombinant 15-GN was purified by HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, C18 XBridge BEH 300Å 3.5 µm 2.1×150 mm column, 50 °C, gradient 0-70% B in 30 min, 1 mL min⁻¹, detection at 250 nm).

The peak was collected, dried under vacuum and the residue was dissolved in a solution of trypsin (5 µL, 50 ng/µL in 20 mM NH₄HCO₃). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 2).

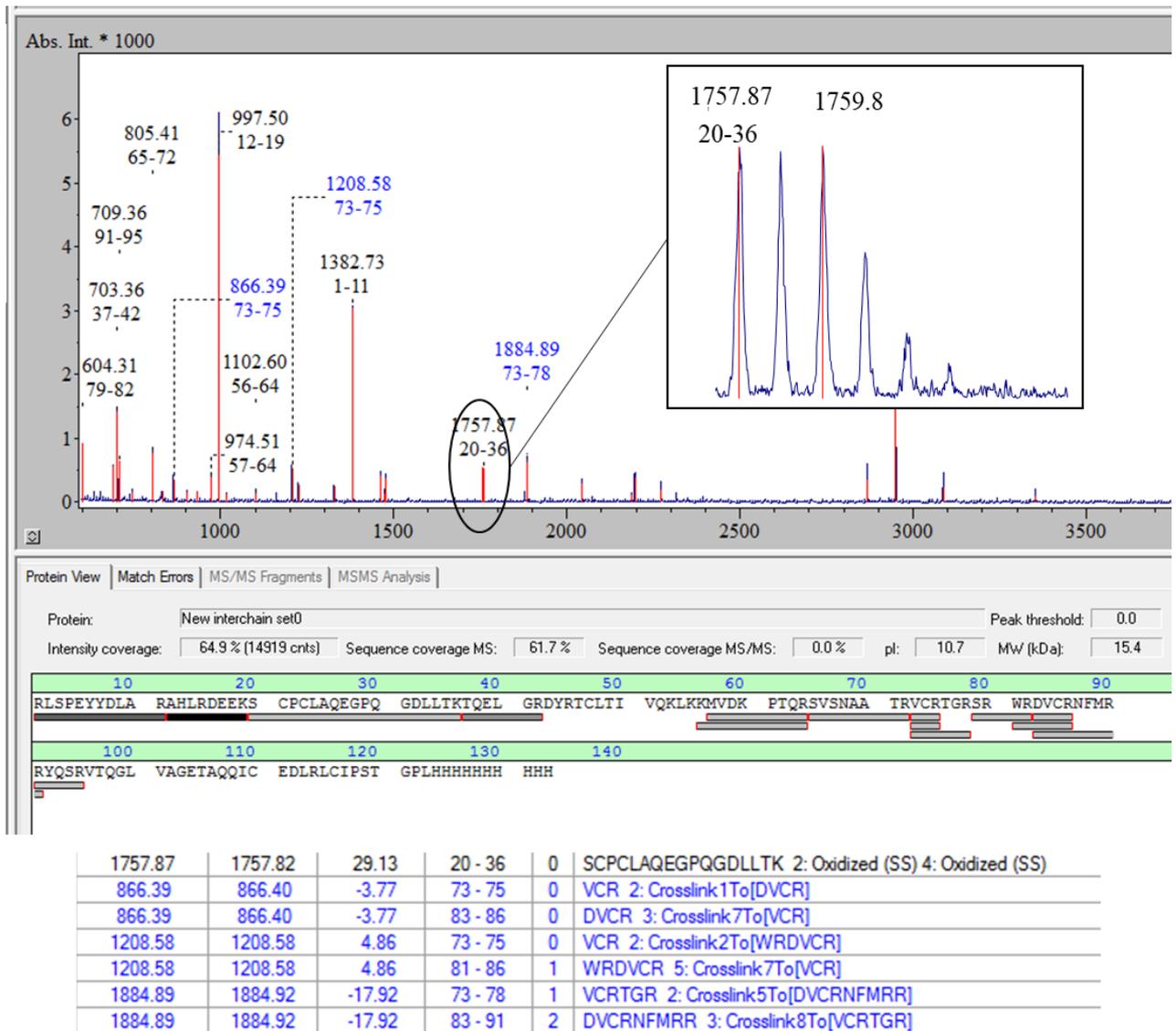


Figure S 2. MALDI-TOF analysis of the tryptic digest: results obtained with commercial 15-GN. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 866.40, found 866.39; VC⁹⁶R linked to WRDVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1208.58, found 1208.58; SC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDLLTK oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1757.82, found 1757.87; VC⁹⁶RTGR linked to DVC¹⁰⁷RNFMRR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1884.92, found 1884.89.

Pepsin digestion

The peak was collected, dried under vacuum and the residue was dissolved in a solution of pepsin (10 μL , 200 ng/ μL in trifluoroacetic acid 1/1000 in water). The digestion was carried out at 37 $^{\circ}\text{C}$ and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 3).

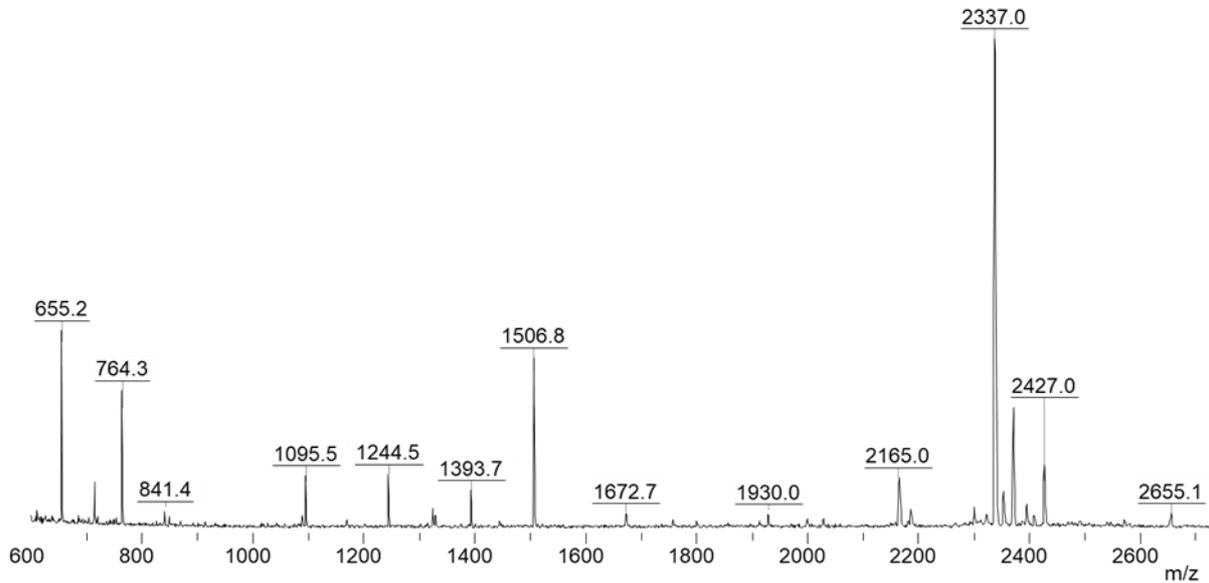


Figure S 3. MALDI-TOF analysis of the pepsin digest: results obtained with commercial 15-GN. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. YRTC69L reduced, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 655.32, found 655.2; RLSPEY, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 764.39, found 764.3, VC107RNFMRRY reduced, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 1244.61, found 1244.5; MRRYQSRVIQGL (mutation Ile 119) calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 655.32, found 1506.8; YRTC69L crosslinked to TAQQIC132EDL by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 1672.77, found 1672.7; YRTC69L crosslinked to VAGETAQQIC132EDL by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 2028.94, found 2028.9; TIVQKLKMKVDKPTQRSVSNA, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 2371.35, found 2371.3; ATRVC96RTGRSRWRDVC107RNF oxidized, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 2337.17, found 2337.0; RLC7IPSTGPLHHHHHHHHHH reduced, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 2427.18, found 2427.0; DLRLC132IPSTGPLHHHHHHHHHH reduced, calcd. (monoisotopic) $[M+H+]$ 2655.29, found 2655.1.

3. Peptide synthesis

3.1. General procedures

Peptide amides were synthesized on a NovaSyn TGR solid support (0.25 mmol/g) using standard Fmoc chemistry and an automated peptide synthesizer (Figure S 4).

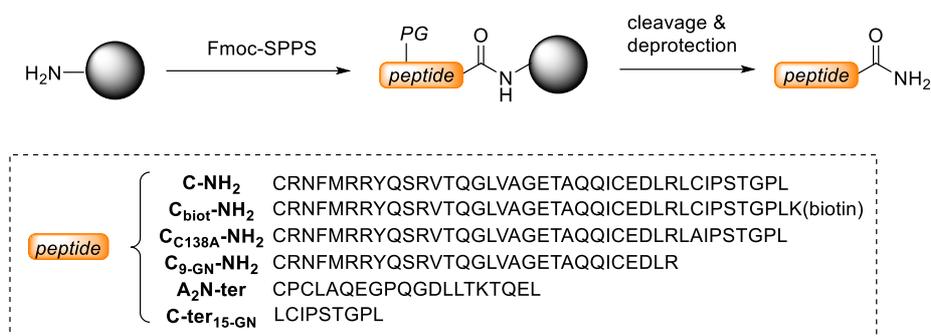
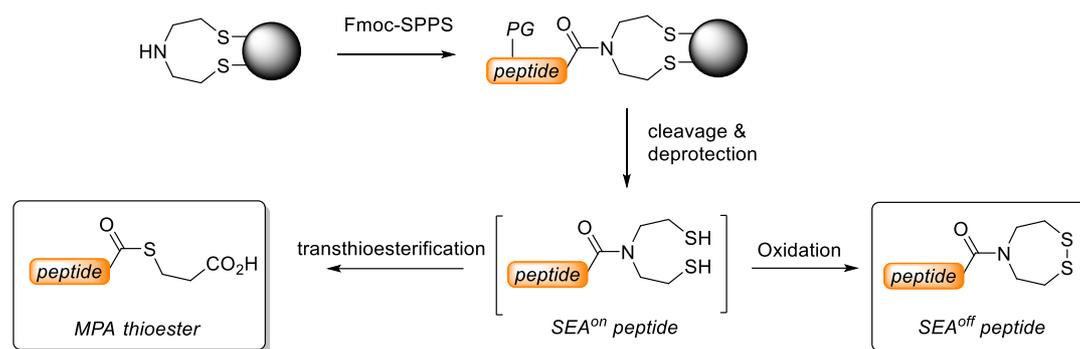


Figure S 4 General approach for the preparation of peptide amides.

SEA^{off} peptides were synthesized on bis(2-sulfanylethyl)aminotriyl polystyrene solid support (SEA PS) (0.16 mmol/g) or on SEA ChemMatrix[®] solid support using standard Fmoc chemistry and an automated peptide synthesizer (Figure S 5). The SEA^{on} peptide obtained after acidic cleavage was converted into the corresponding SEA^{off} peptide by oxidation with iodine. The same intermediate provided the MPA thioester *via* a SEA/MPA exchange reaction. Detailed procedures to prepare these peptides are available in previous publications.^{3,5,6} Note that the first amino acid directly linked to the solid support or the Fmoc-Ala-Thr(ψ (Me,Me)Pro-OH) dipeptide unit were introduced manually in the peptide sequence.

⁵ Ollivier, N.; Raibaut, L.; Blanpain, A.; Desmet, R.; Dheur, J.; Mhidia, R. *et al.* Tidbits for the synthesis of bis(2-sulfanylethyl)amido (SEA) polystyrene resin, SEA peptides and peptide thioesters. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 92–97.

⁶ Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5238-5241.



SEA^{off} peptide



MPA thioester

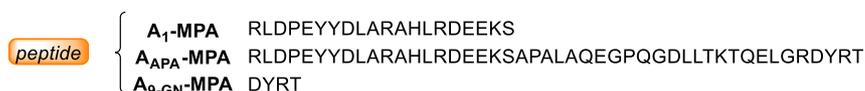


Figure S 5 Synthesis of SEA^{off} peptides and MPA thioesters.

Coupling of the first amino acid on SEA PS and SEA ChemMatrix[®] beads

The first amino acid (10 equiv.) was coupled to SEA PS solid support (1.0 equiv.) using HATU (10 equiv.)/DIEA (20 equiv.) activation in DMF. The amino acid was preactivated for 2 min and then added to the beads swelled in the minimal volume of DMF. The beads were agitated at RT for 1.5 h, then washed with DMF (3 × 2 min) and drained. The absence of unreacted secondary amino groups was checked using the chloranyl colorimetric assay. A capping step was then performed using Ac₂O/DIEA/DMF 10/5/85 v/v/v (2 × 5 min) and the beads were washed with DMF (3 × 2 min).

Automated peptide elongation

Peptide elongation was performed using standard Fmoc chemistry on an automated peptide synthesizer without microwaves. Couplings were performed using a 4-fold molar excess of each Fmoc L-amino acid, a 3.6-fold molar excess of HBTU and an 8-fold molar excess of DIEA. A capping step was performed with Ac₂O/DIEA/DMF 10/5/85 v/v/v before Fmoc removal using piperidine/DMF 80/20 v/v.

Coupling of the biotinylated lysine

To a solution of TBTU (31 mg, 0.095 mmol, 0.95 equiv.) in NMP (3.0 mL) were successively added Fmoc-Lys(Biot)-OH (89 mg, 0.15 mmol, 1.5 equiv.) and DIEA (50 μL, 0.10 mmol, 1.0 equiv.) and the mixture was stirred at RT for 2 min. The preactivated amino acid was then added to the beads (0.10 mmol, 1.0 equiv.) swelled in the minimal volume of NMP. The beads were agitated at RT for 2 h and were then washed with DMF (3 × 2 min). A capping step was then performed using Ac₂O/DIEA/DMF 10/5/85 v/v/v (2 × 5 min). Finally, the beads were washed with DMF (3 × 2 min).

Coupling of the Fmoc-Ala-Thr(Ψ (Me,Me)Pro-OH dipeptide unit

To a solution of Fmoc-Ala-Thr(Ψ (Me,Me)Pro-OH (91 mg, 0.20 mmol, 2.0 equiv.) in DMF (2.0 mL) were successively added HATU (74 mg, 0.19 mmol, 1.9 equiv.) and DIEA (70 μ L, 0.40 mmol, 4.0 equiv.) and the mixture was stirred at RT for 2 min. The preactivated amino acid was then added to the beads (0.10 mmol, 1.0 equiv.) swelled in the minimal volume of DMF. The beads were agitated at RT for 1 h and washed with DMF (3 \times 2 min). The coupling was repeated a second time and a capping step was then performed using Ac₂O/DIEA/DMF 10/5/85 v/v/v (2 \times 5 min). The beads were washed with DMF (3 \times 2 min) and then treated with DMF/piperidine 80/20 v/v (2 \times 10 min) to remove the Fmoc protecting group. Finally, the solid support was washed with DMF (3 \times 2 min).

Final peptide deprotection and cleavage

At the end of the synthesis, the beads were washed with DCM (3 \times 2 min) and diethyl ether (3 \times 2 min) and dried *in vacuo*. The crude peptide was cleaved from the solid support using TFA cleavage and deprotection cocktails, precipitated by addition of cold diethyl ether/*n*-heptane 1/1 v/v (20 mL per mL of TFA cocktail) and recovered by centrifugation.

Oxidation of the SEA group (SEA^{on} \rightarrow SEA^{off})

The SEA^{on} peptide recovered by centrifugation was solubilized in deionized water, lyophilized and dissolved in AcOH/water 1/4 v/v. A solution of I₂ in DMSO (\approx 100 mg mL⁻¹) was added dropwise until complete oxidation of the SEA group (persistence of the yellow color of iodine in the reaction mixture). After 30 s of stirring, a solution of DTT in AcOH/water 1/4 v/v (\approx 100 mg mL⁻¹) was added to consume the excess of I₂. Then the peptide was immediately purified by HPLC.

Transthioesterification (SEA^{off} \rightarrow MPA)

The SEA^{off} peptide recovered after purification was converted into the corresponding MPA thioester by reaction with MPA (5% in volume) at pH 4.0. A detailed procedure is given below for the synthesis of MPA thioesters.

3.2. Synthesis and characterization of peptide amides

CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTGPL-NH₂ peptide **C-NH₂** was synthesized on 0.10 mmol scale as described in the general procedure and was cleaved from the solid support using TFA/TIS/H₂O/EDT 94.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v (10 mL). The title peptide was recovered by precipitation from Et₂O/*n*-heptane 1/1 v/v, solubilized in water and lyophilized. The purification of the crude peptide by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 6 mL min⁻¹, 10-35% eluent B in 10 min and then 35-50% eluent B in 40 min, C18 XBridge 5 μ m (10 \times 250 mm) column, detection at 215 nm, 50 $^{\circ}$ C) provided peptide **5** as a white solid after lyophilization (100 mg, 20%).

*Characterization of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTGPL-NH₂ peptide **C-NH₂***

Peptide **5** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 6) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 7

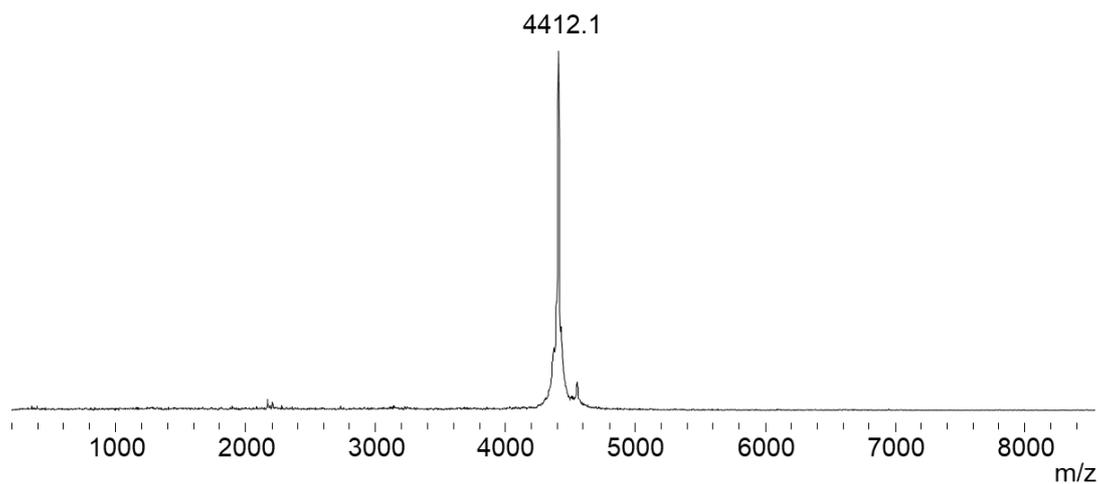
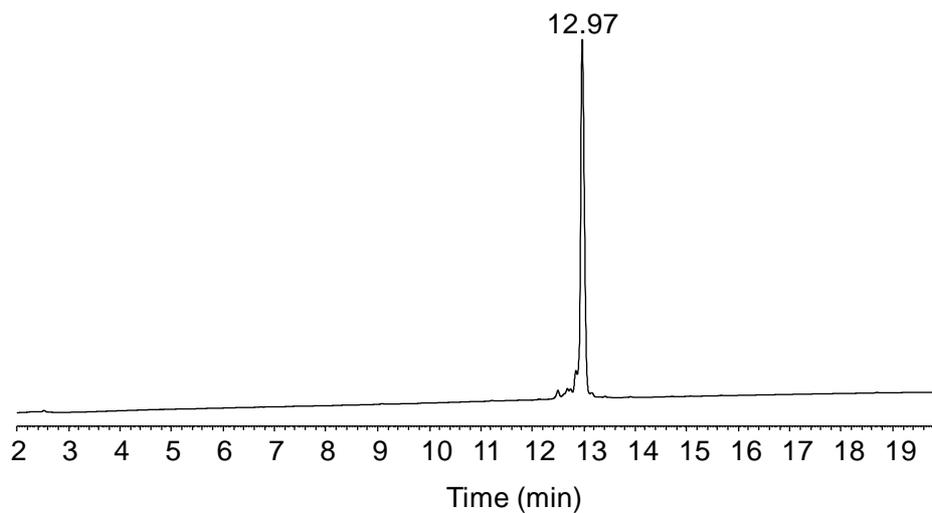


Figure S 7 MALDI-TOF analysis of peptide **C-NH2**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 4412.13, found: 4412.1).

ESI (positive detection mode, see Figure S 6): calcd. for $[M]$ (average mass): 4411.13, found: 4411.71.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 7): calcd. for $[M+H]^+$ (average): 4412.13, found: 4412.3.



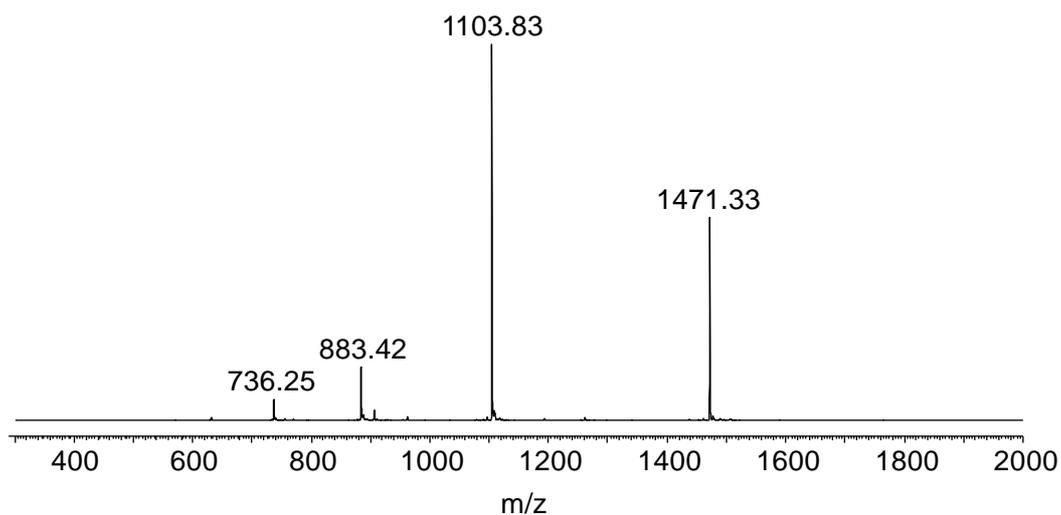


Figure S 6 UPLC-MS analysis of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTG-PL-NH₂ peptide **C-NH₂**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1471.33 ([M+3H]³⁺), 1103.83 ([M+4H]⁴⁺), 883.42 ([M+5H]⁵⁺), 736.25 ([M+6H]⁶⁺); calcd. for [M] (average mass): 4412.13, found: 4411.71.

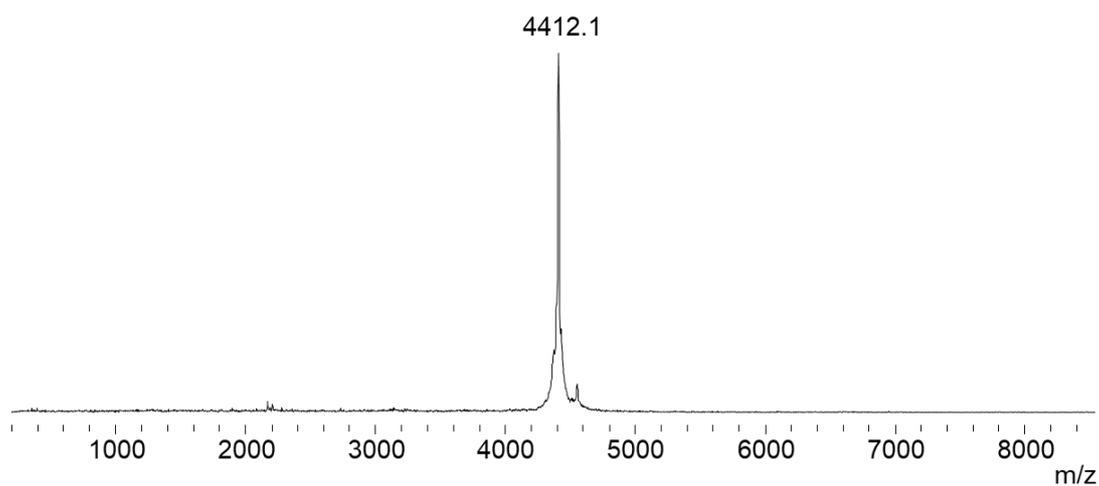


Figure S 7 MALDI-TOF analysis of peptide **C-NH₂**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 4412.13, found: 4412.1.

CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTGPLK(biotin)-NH₂ peptide **C_{biot}-NH₂** was synthesized on 0.10 mmol scale as described in the general procedure and was cleaved from the solid support using TFA/TIS/H₂O/EDT 94.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v (10 mL). The title peptide was recovered by precipitation from Et₂O/n-heptane 1/1 v/v, solubilized in water and lyophilized. Purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 6 mL min⁻¹, 10-35% eluent B in 10 min and then 35-50% eluent B in 40 min, C18 XBridge 5 μm (10 × 250 mm) column, detection at 215 nm, 50 °C) provided peptide **6** as a white solid after lyophilization (96.1 mg, 19%).

Characterization of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTGPLK(biotin)-NH₂ peptide C_{biot}-NH₂: Peptide **6** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 8) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 9). ESI (positive detection mode, see Figure S 8): calcd. for [M] (average mass): 4765.50, found: 4765.97. MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 9): calcd. for [M+H]⁺ (average): 4766.50, found: 4766.5.

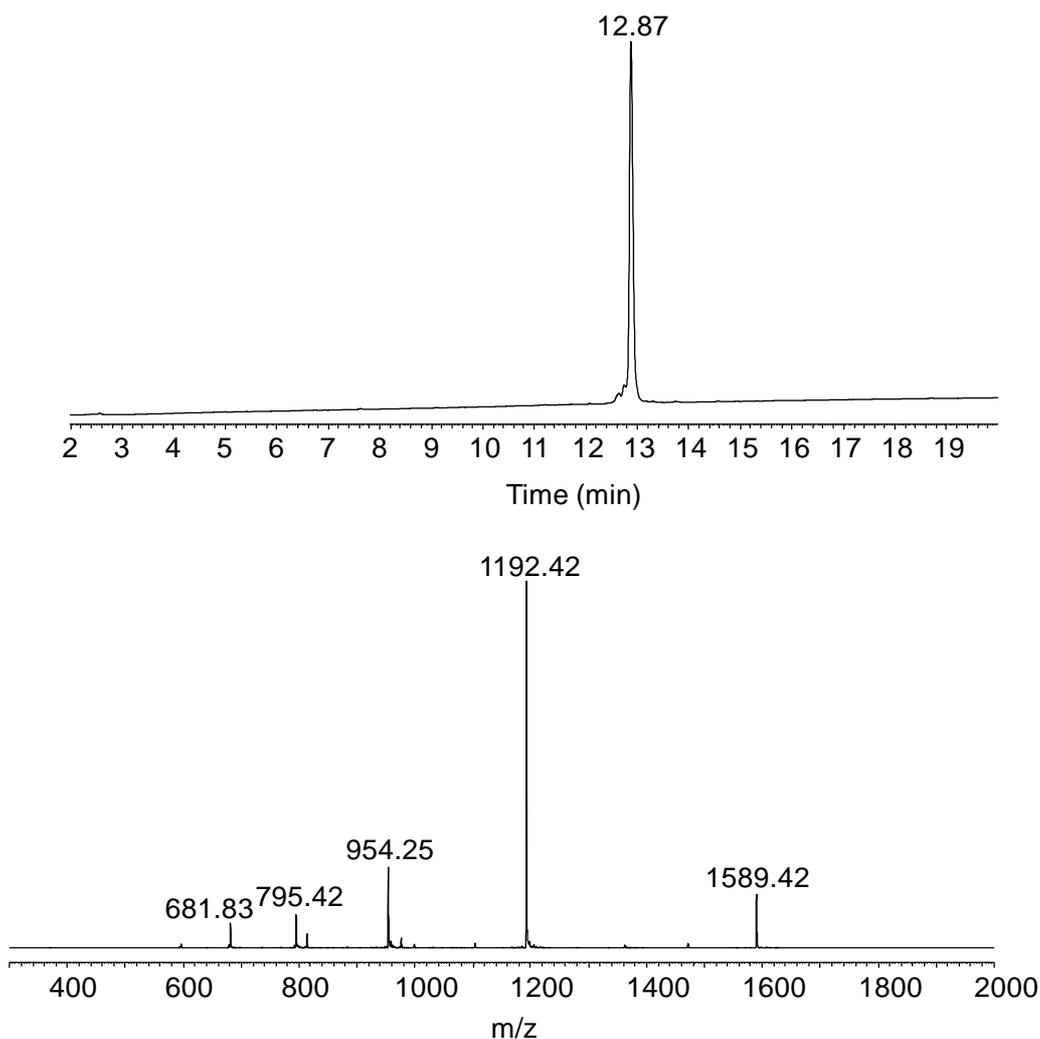


Figure S 8 UPLC-MS analysis of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLCIPSTG-PLK(biotin)-NH₂ peptide **C_{biot}-NH₂**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1589.42 ([M+3H]³⁺), 1192.42 ([M+4H]⁴⁺), 954.25 ([M+5H]⁵⁺), 795.42 ([M+6H]⁶⁺), 681.83 ([M+7H]⁷⁺); calcd. for [M] (average mass): 4765.50, found: 4765.97.

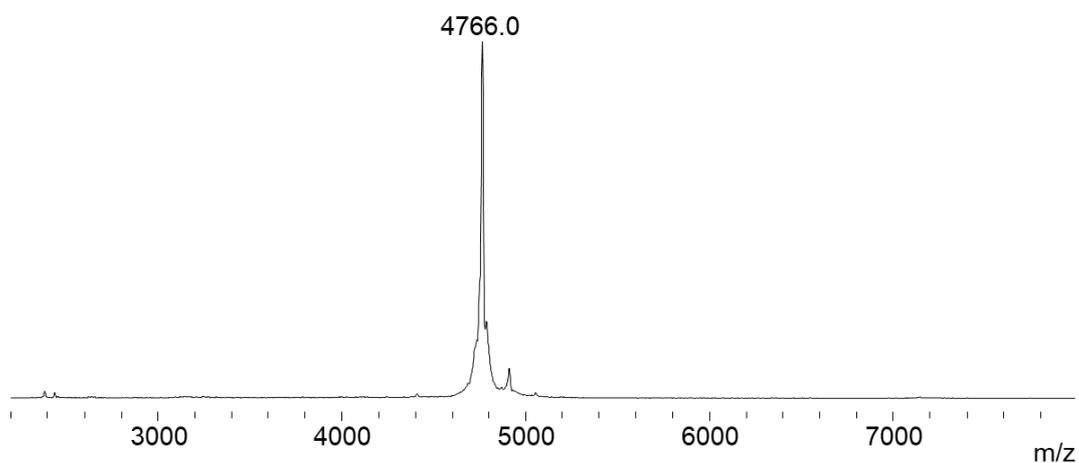


Figure S 9. MALDI-TOF analysis of peptide **C_{biot}-NH₂**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 4766.50, found: 4766.0.

CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLAIPSTGPL-NH₂ peptide **C_{C138A}-NH₂** was synthesized on 0.10 mmol scale as described in the general procedure and was cleaved from the solid support using TFA/TIS/H₂O/EDT 94.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v (10 mL). The title peptide was recovered by precipitation from Et₂O/n-heptane 1/1 v/v, solubilized in water and lyophilized. Purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 6 mL min⁻¹, 10-35% eluent B in 10 min and then 35-50% eluent B in 40 min, C18 XBridge 5 μm (10 × 250 mm) column, detection at 215 nm, 50 °C) provided peptide **9** as a white solid after lyophilization (56.3 mg, 11%).

Characterization of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLAIPSTGPL-NH₂ peptide C_{C138A}-NH₂:

Peptide **9** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 10) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 11).

ESI (positive detection mode, see Figure S 10): calcd. for [M] (average mass): 4379.07, found: 4379.47.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 11): calcd. for [M+H]⁺ (average): 4380.07, found: 4379.79.

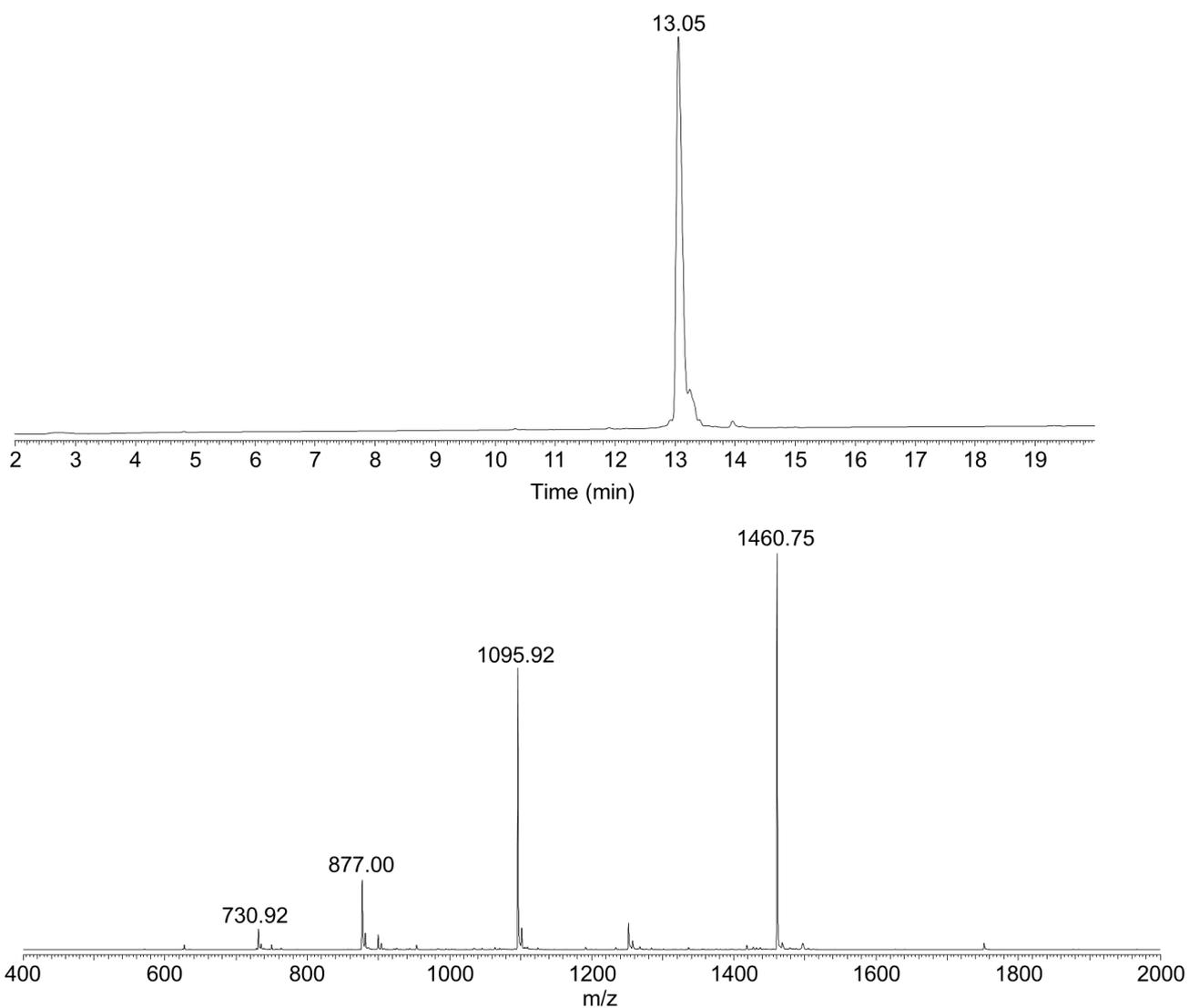


Figure S 10. UPLC-MS analysis of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLRLAIPS-TGPL-NH₂ peptide **C_{138A}-NH₂**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1460.75 ($[M+3H]^{3+}$), 1095.92 ($[M+4H]^{4+}$), 877.00 ($[M+5H]^{5+}$), 730.92 ($[M+6H]^{6+}$); calcd. for $[M]$ (average mass): 4378.07, found: 4379.47.

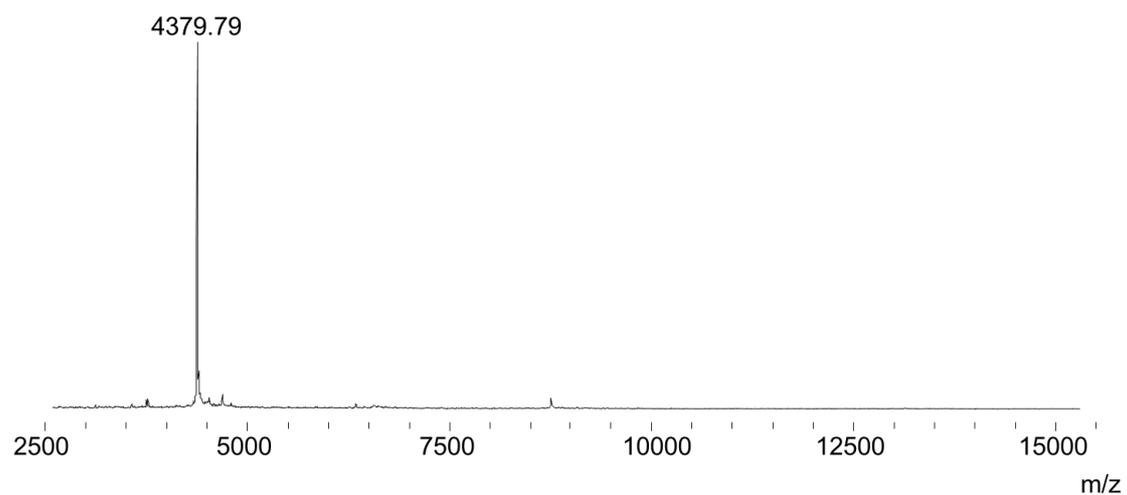


Figure S 11. MALDI-TOF analysis of peptide **Cc138A-NH₂**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 4380.07, found: 4379.79.

CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLR-NH₂ peptide **C_{9-GN-NH₂}** was synthesized on 0.10 mmol scale as described in the general procedure and was cleaved from the solid support using TFA/TIS/H₂O/EDT 94.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v (10 mL). The title peptide was recovered by precipitation from Et₂O/n-heptane 1/1 v/v, solubilized in water and lyophilized. Purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 6 mL min⁻¹, 0-28% eluent B in 10 min and then 28-38% eluent B in 40 min, C18 XBridge 5 μm (19 × 150 mm) column, detection at 215 nm, 50 °C, provided peptide **11** as a white solid after lyophilization (78.8 mg, 18%).

Characterization of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLR-NH₂ peptide C_{9-GN-NH₂}:

Peptide **C_{9-GN-NH₂}** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 12) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 13).

ESI (positive detection mode, see Figure S 12): calcd. for [M] (average mass): 3529.04, found: 3529.04.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 13): calcd. for [M+H]⁺ (average): 3530.04, found: 3529.8.

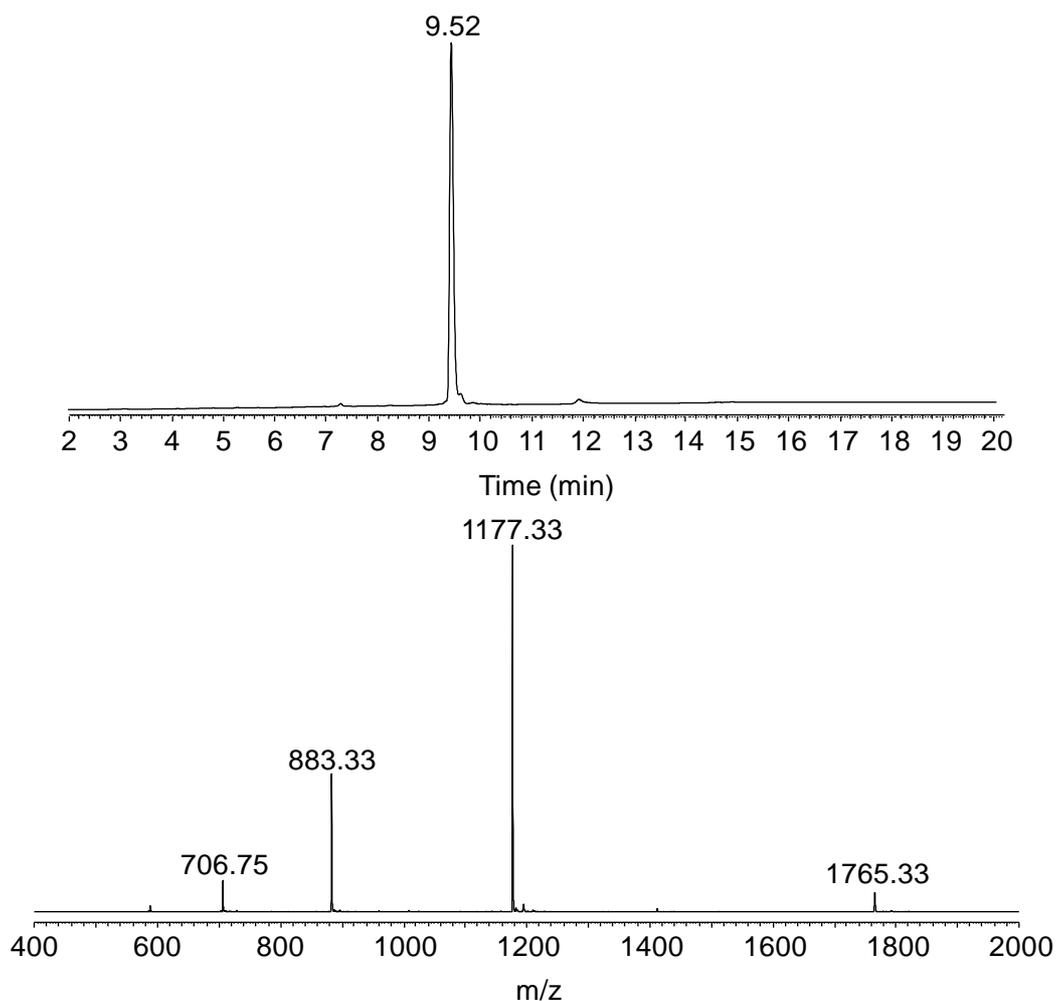


Figure S 12. UPLC-MS analysis of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLR-NH₂ peptide **C₉-GN-NH₂**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1765.33 ([M+2H]²⁺), 1177.33 ([M+3H]³⁺), 883.33 ([M+4H]⁴⁺), 706.75 ([M+5H]⁵⁺); calcd. for [M] (average mass): 3529.04, found: 3529.04.

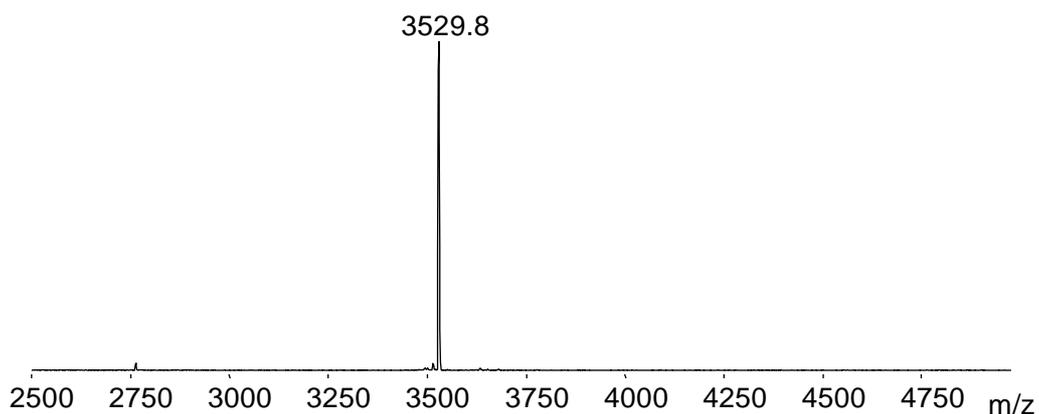


Figure S 13. MALDI-TOF analysis of peptide **C₉-GN-NH₂**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 3530.04, found: 3529.8.

C(StBu)PC(StBu)LAQEGPQGDLTKTQELGR-NH₂ peptide **A₂N-ter** was synthesized on 0.10 mmol scale as described in the general procedure and was cleaved from the solid support using TFA/TIS/H₂O/EDT 94.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v (10 mL). The title peptide was recovered by precipitation from Et₂O/n-heptane 1/1 v/v, solubilized in water and lyophilized. Purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 6 mL min⁻¹, 0-42% eluent B in 10 min and then 42-55% eluent B in 40 min, C18 XBridge 5 μm (10 × 250 mm) column, detection at 215 nm, 20 °C) provided peptide **A₂N-ter** as a white solid after lyophilization (119 mg, 41%).

*Characterization of C(StBu)PC(StBu)LAQEGPQGDLTKTQELGR-NH₂ peptide **A₂N-ter**:*

Peptide **A₂N-ter** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 14) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 15).

ESI (positive detection mode, see Figure S 14): calcd. for [M] (average mass): 2533.04, found: 2532.75.
MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 15): calcd. for [M+H]⁺ (average): 2534.04, found: 2533.6.

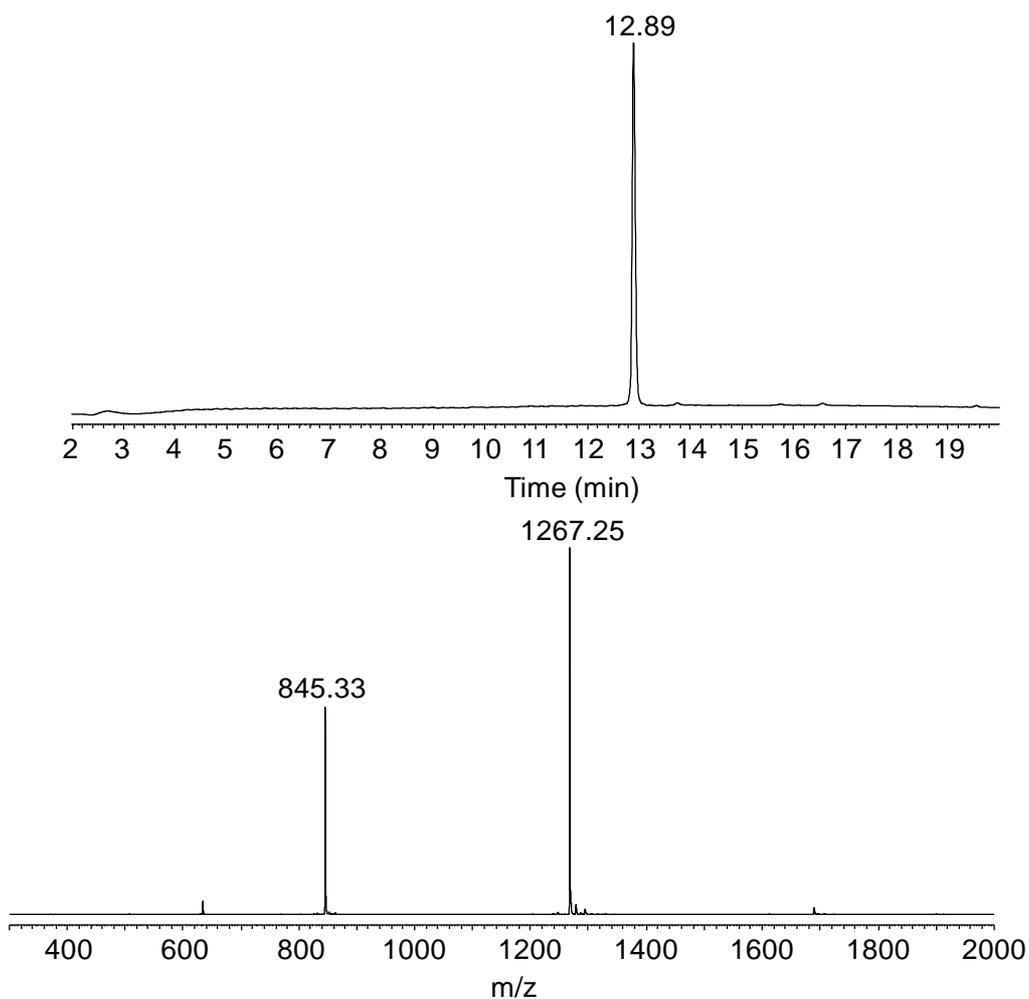


Figure S 14. UPLC-MS analysis of C(StBu)PC(StBu)LAQEGPQGDLLTKTQELGR-NH₂ peptide **A₂N-ter**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1267.25 ([M+2H]²⁺), 845.33 ([M+3H]³⁺); calcd. for [M] (average mass): 2533.04, found: 2532.75.

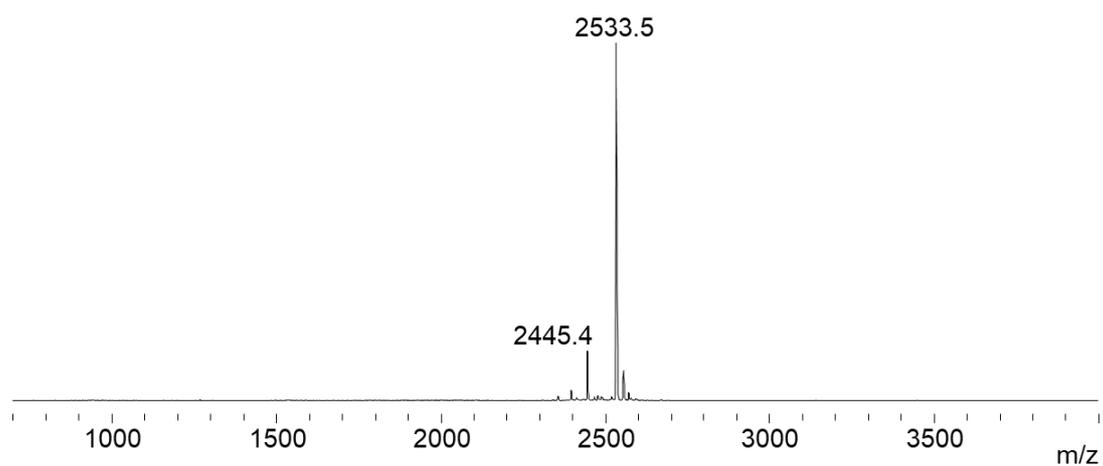


Figure S 15. MALDI-TOF analysis of peptide **A₂N-ter**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 2534.04, found: 2533.5. [M+H]⁺ found 2445.4 correspond to the title peptide without one S-tBu protecting group.

LCIPSTGPL-NH₂ peptide **C-ter**_{15-GN} was synthesized on 0.10 mmol scale as described in the general procedure and was cleaved from the solid support using TFA/TIS/H₂O/EDT 94.5/5/2.5/2.5 (10 mL). The title peptide was recovered by precipitation from Et₂O/n-heptane 1/1 v/v, solubilized in water and lyophilized. Purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, 20 mL min⁻¹, 0-15% eluent B in 10 min and then 15-40% eluent B in 40 min, C18 XBridge 5 μm (19 × 250 mm) column, detection at 215 nm, 20 °C) provided peptide **C-ter**_{15-GN} as a white solid after lyophilization (41.0 mg, 40%).

*Characterization of LCIPSTGPL-NH₂ peptide **C-ter**_{15-GN}:*

Peptide **C-ter**_{15-GN} was analyzed by UPLC-MS (Figure S 16) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 17).

ESI (positive detection mode, see Figure S 16): calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 899.49, found: 899.50.
MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 17): calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 899.49, found: 899.2.

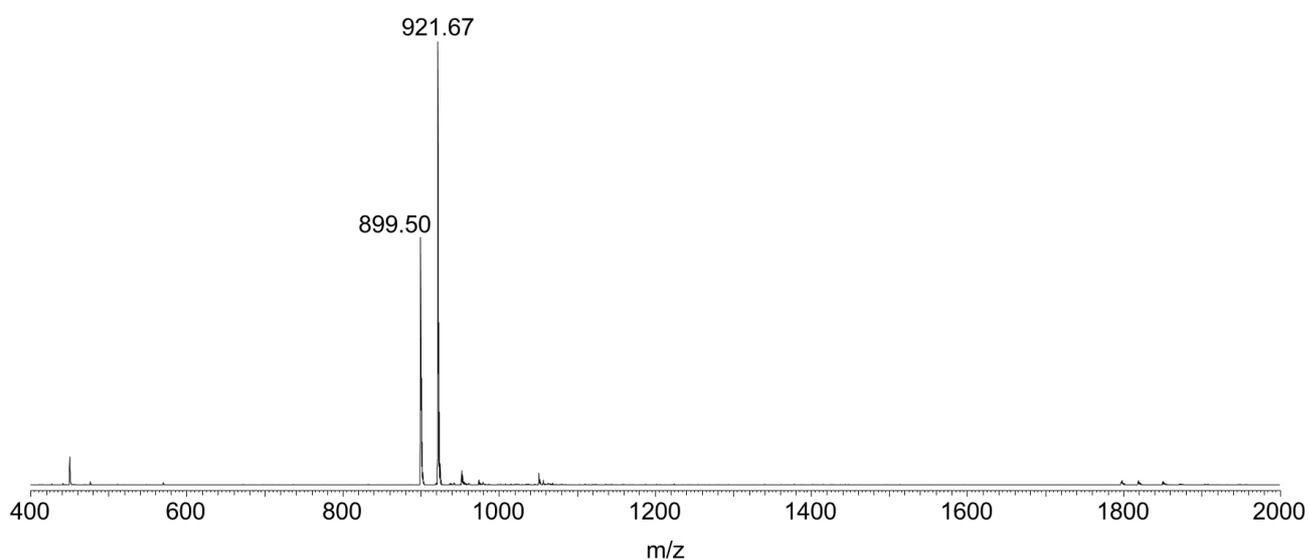
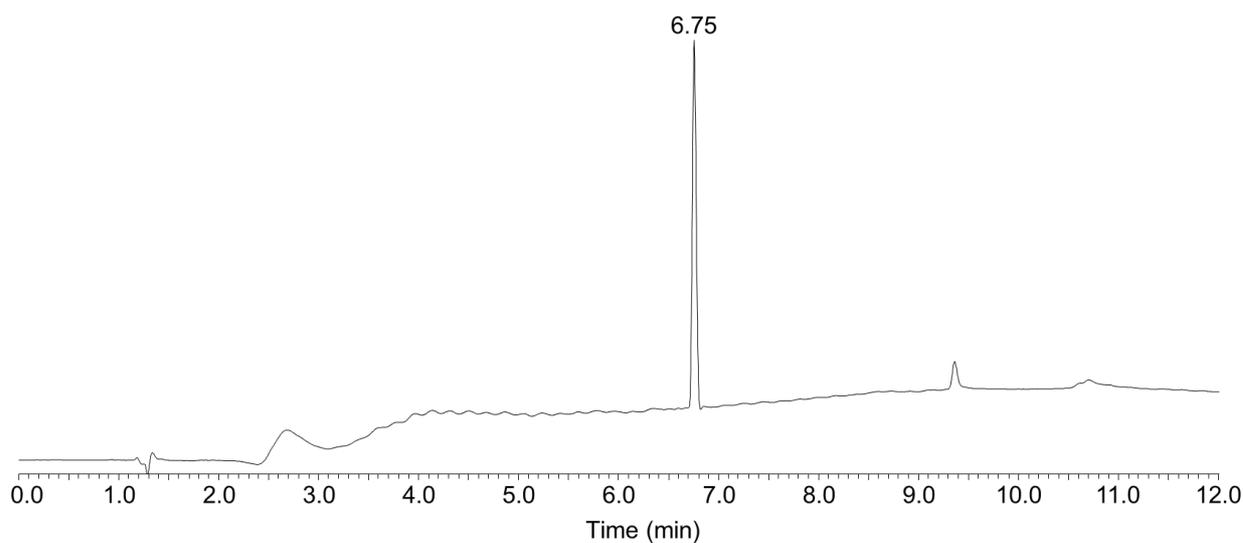


Figure S 16. UPLC-MS analysis of LCIPSTGPL-NH₂ peptide **C-ter**_{15-GN}. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-50% B in 10 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 899.50 ([M+H]⁺), 921.97 ([M+Na]⁺); calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 899.49, found: 899.50.

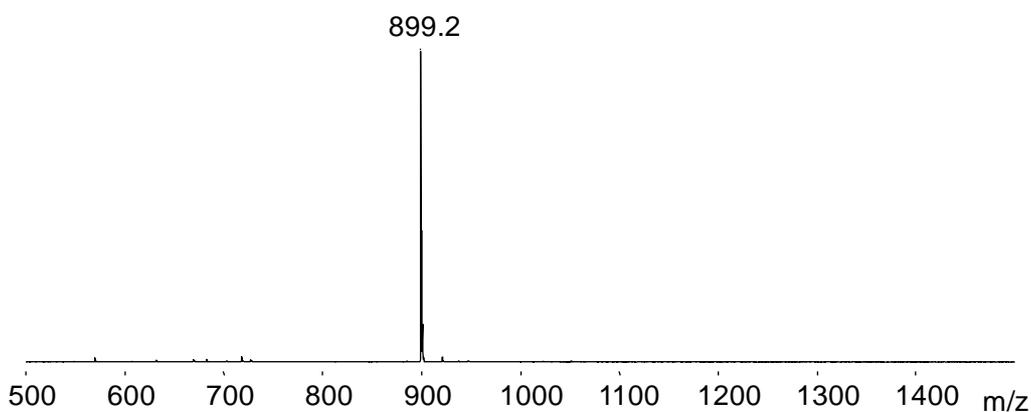


Figure S 17. MALDI-TOF analysis of peptide **C-ter**_{15-GN}. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 899.49, found: 899.2.

3.3. Synthesis and characterization of SEA^{off} peptide

RLDPEYYDLARAHRLRDEEKS-SEA^{off} peptide **A₁-SEA** was synthesized on a 0.20 mmol scale as described in the general procedure starting from SEA PS beads. TFA/EDT/TIS/thiophenol/thioanisole 87.5/2.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v/v (20 mL) was used as the cleavage cocktail. Purification of the crude by preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 0-25% eluent B in 10 min then 25-45% in 60 min, 20 °C, detection at 215 nm, 50 mL min⁻¹, Interchim C18 Uptisphere X-serie 15 µm (30 × 250 mm) column) provided the title peptide as a white solid after lyophilization (232 mg, 45%).

*Characterization of RLDPEYYDLARAHRLRDEEKS-SEA^{off} peptide **A₁-SEA**:*

Peptide **A₁-SEA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 18) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 19).

ESI (positive detection mode, see Figure S 18): calcd. for [M] (average): 2565.91, found: 2565.92.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 19): calcd. for [M+H]⁺ (average): 2566.92, found: 2566.47.

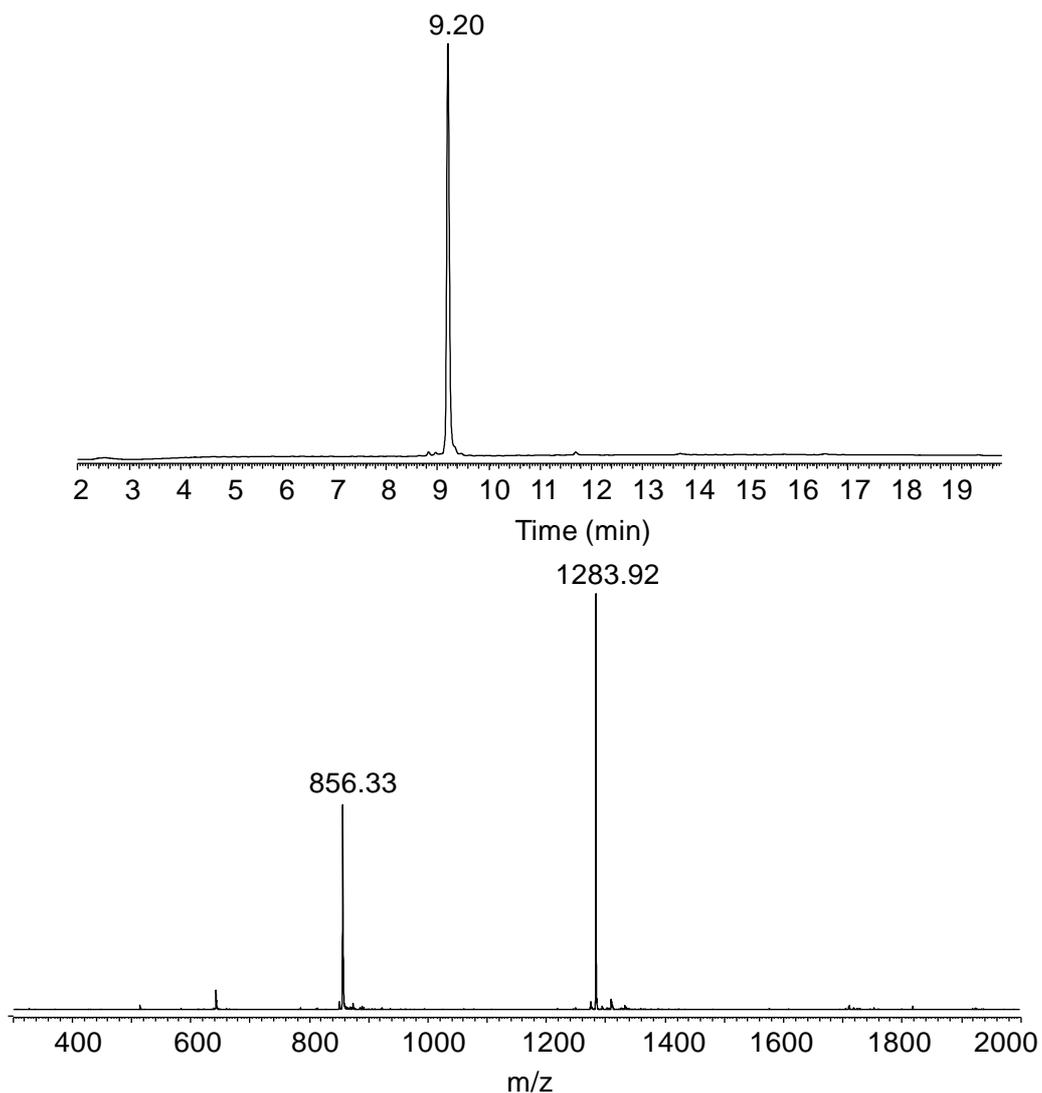


Figure S 18. UPLC-MS analysis of RLDPEYYDLARAHLRDEEKS-SEA^{off} peptide A₁-SEA. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1283.92 ([M+2H]²⁺), 856.33 ([M+3H]³⁺); calcd. for [M] (average mass): 2565.91, found: 2565.92.

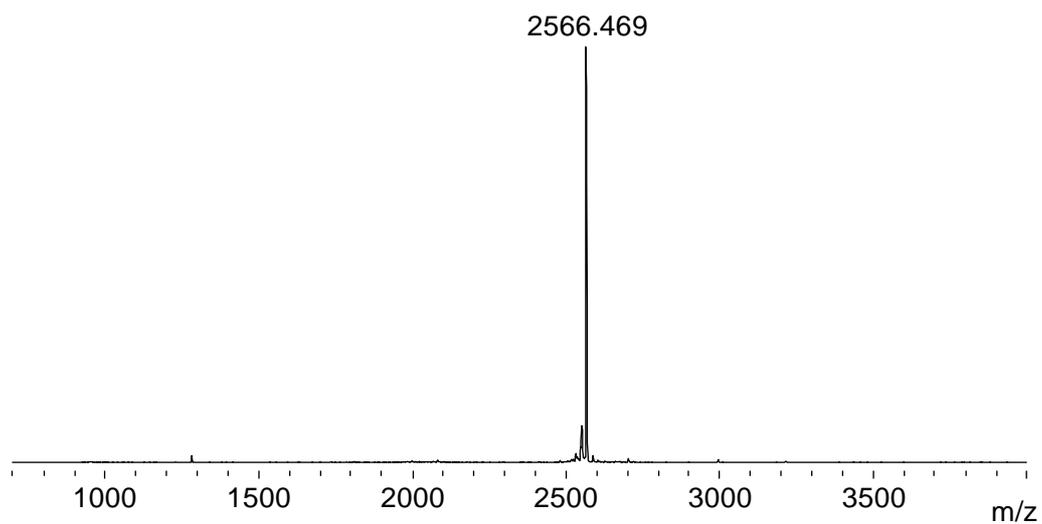


Figure S 19. MALDI-TOF analysis of peptide **A₁-SEA**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 2566.91, found: 2566.47.

C(StBu)PC(StBu)LAQEGPQGDLTKTQELGRDYRT-SEA^{off} peptide **A₂-SEA** was synthesized on a 0.10 mmol scale as described in the general procedure starting from SEA PS beads. TFA/EDT/TIS/thiophenol/thioanisole 87.5/2.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v/v (10 mL) was used as the cleavage cocktail. Purification of the crude by preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 0-45% eluent B in 10 min then 45-55% in 30 min, 20 °C, detection at 215 nm, 50 mL min⁻¹, Interchim C18 Uptispher X-serie 15 μm (30 × 250 mm) column) provided the title peptide as a white solid after lyophilization (106 mg, 29%).

*Characterization of C(StBu)PC(StBu)LAQEGPQGDLTKTQELGRDYRT-SEA^{off} peptide **A₂-SEA**:*

Peptide **A₂-SEA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 20) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 21).

ESI (positive detection mode, see Figure S 20): calcd. for [M] (average): 3186.81, found: 3186.38.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 21): calcd. for [M+H]⁺ (average): 3187.81, found: 3187.65.

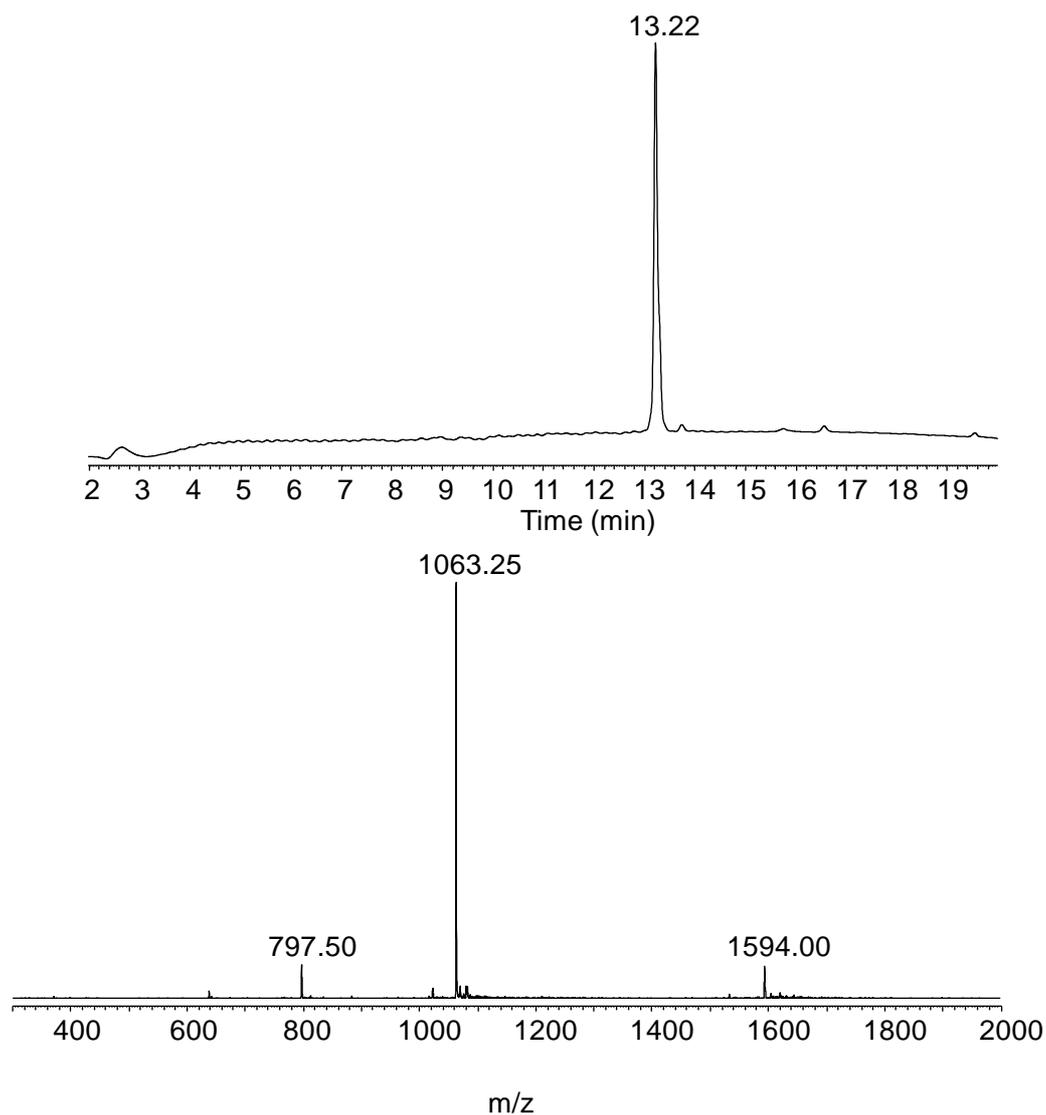


Figure S 20. UPLC-MS analysis of $C(\text{StBu})\text{PC}(\text{StBu})\text{LAQEGPQG DLLTKTQELGRDYRT-SEA}^{\text{off}}$ peptide $\text{A}_2\text{-SEA}$. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH_3CN . C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min^{-1} , UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1594.00 ($[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$), 1063.25 ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$), 797.50 ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$); calcd. for $[\text{M}]$ (average mass): 3186.81, found: 3186.38.

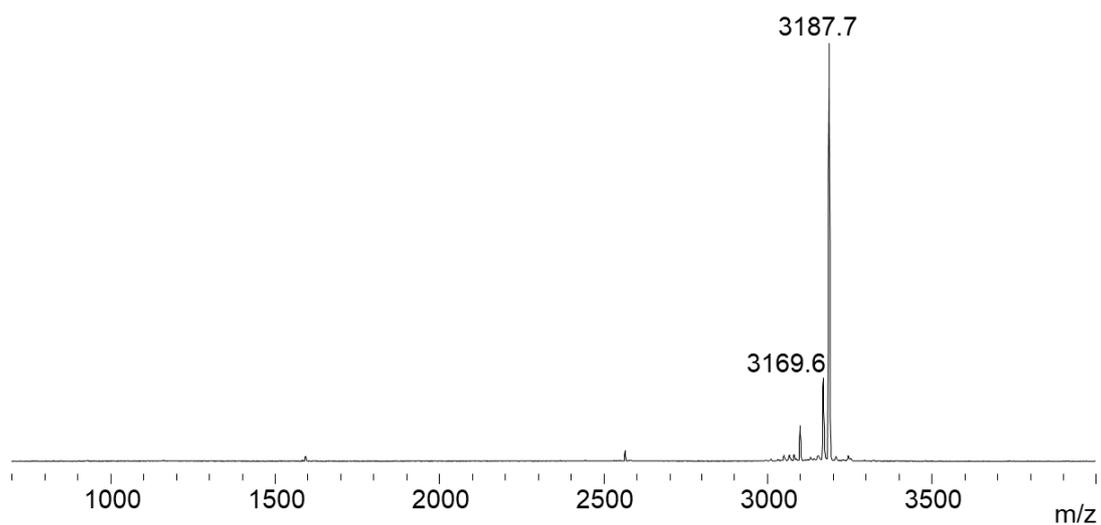


Figure S 21. MALDI-TOF analysis of peptide **A₂-SEA**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 3187.81, found: 3187.7. $[M+H]^+$ found 3169.6 can correspond to a dehydration product without further detail.

C(StBu)LTIVQKLKMMVDKPTQRSVSNAATRVC(StBu)RTGRSRWRDV-SEA^{off} peptide **B-SEA** was synthesized on a 0.10 mmol scale as described in the general procedure starting from SEA ChemMatrix[®] beads. TFA/EDT/TIS/thiophenol/thioanisole 87.5/2.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v/v (10 mL) was used as the cleavage cocktail. Purification of the crude by preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 0-32% eluent B in 2 min then 32-44% in 30 min, 50 °C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, C18 Xbridge 5 μm (10 × 250 mm) column) provided the title peptide as a white solid after lyophilisation (97.2 mg, 17%).

Characterization of C(StBu)LTIVQKLKMMVDKPTQRSVSNAATRVC(StBu)RTGRSRWRDV-SEA^{off} peptide B-SEA:

Peptide **B-SEA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 22) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 23).

ESI (positive detection mode, see Figure S 22): calcd. for [M] (average): 4682.77, found: 4682.95.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 23): calcd. for [M+H]⁺ (average): 4683.77, found: 4684.22.

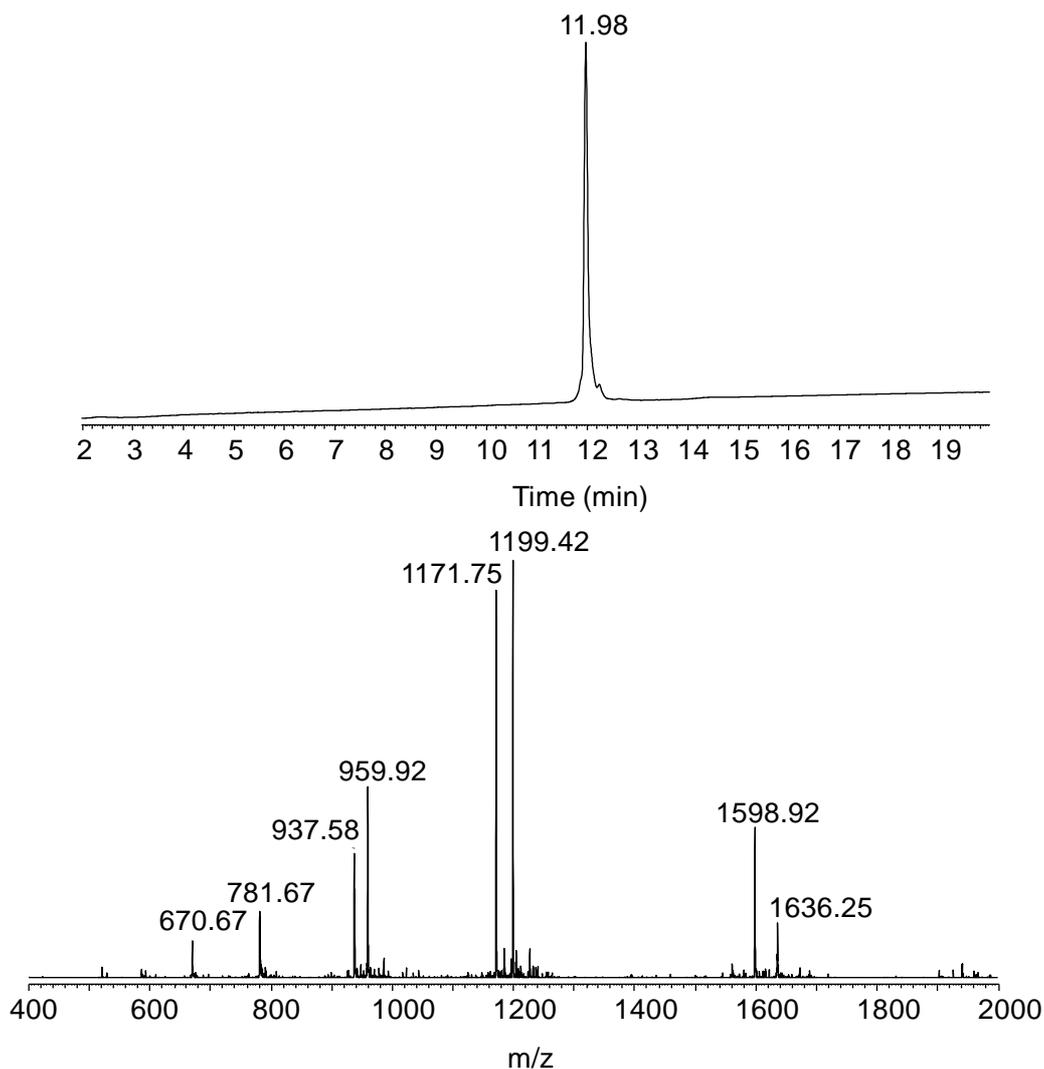


Figure S 22. UPLC-MS analysis of C(StBu)LTIVQKLKMKMVDKPTQRSVSNAATRVC(StBu)-RTGRSRWRDV-SEA^{off} peptide **B-SEA**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1636.25 ([M+2M_{TFA}+3H]³⁺), 1598.92 ([M+M_{TFA}+3H]³⁺), 1199.42 ([M+M_{TFA}+4H]⁴⁺), 1171.75 ([M+4H]⁴⁺), 959.92 ([M+M_{TFA}+5H]⁵⁺), 937.58 ([M+5H]⁵⁺), 781.67 ([M+6H]⁶⁺), 670.67 ([M+7H]⁷⁺); calcd. for [M] (average mass): 4682.77, found: 4682.95.

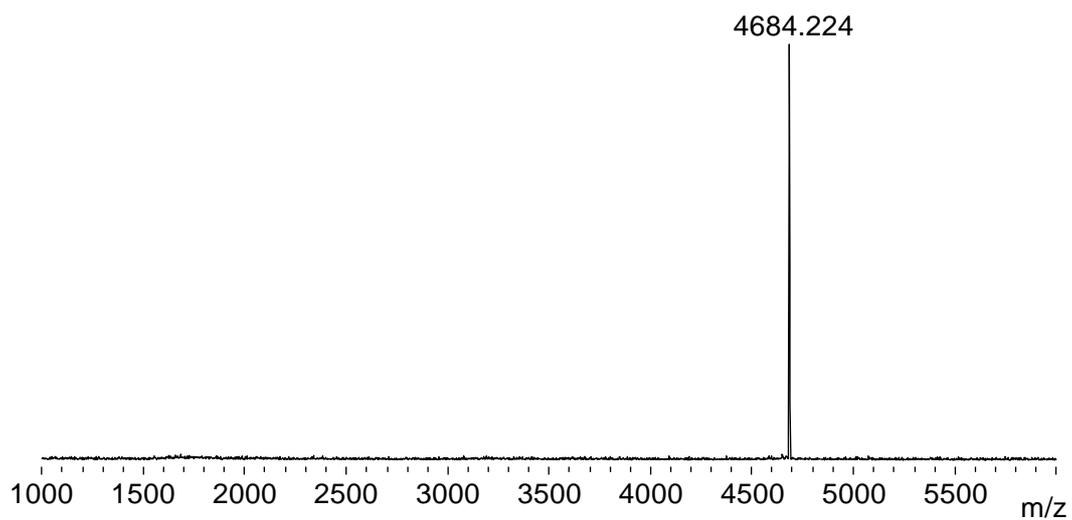


Figure S 23. MALDI-TOF analysis of peptide **B-SEA**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 4683.77, found: 4684.22.

C(StBu)PC(StBu)LAQEGPQGDLTKTQELGRDCRT-SEA^{off} peptide **A₂Y66C-SEA** was synthesized on a 0.10 mmol scale as described in the general procedure starting from SEA PS beads. TFA/EDT/TIS/thiophenol/thioanisole 87.5/2.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v/v (10 mL) was used as the cleavage cocktail. Purification of the crude by preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 0-45% eluent B in 10 min then 45-55% in 30 min, 20 °C, detection at 215 nm, 50 mL min⁻¹, Interchim C18 Uptispher X-serie 15 μm (30 × 250 mm) column) provided the title peptide as a white solid after lyophilisation (107 mg, 34%).

*Characterization of C(StBu)PC(StBu)LAQEGPQGDLTKTQELGRDCRT-SEA^{off} peptide **A₂Y66C-SEA**:*

Peptide **A₂Y66C-SEA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 24) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 25).

ESI (positive detection mode, see Figure S 24): calcd. for [M] (average): 3214.94, found: 3214.93.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 25): calcd. for [M+H]⁺ (average): 3215.94, found: 3215.59.

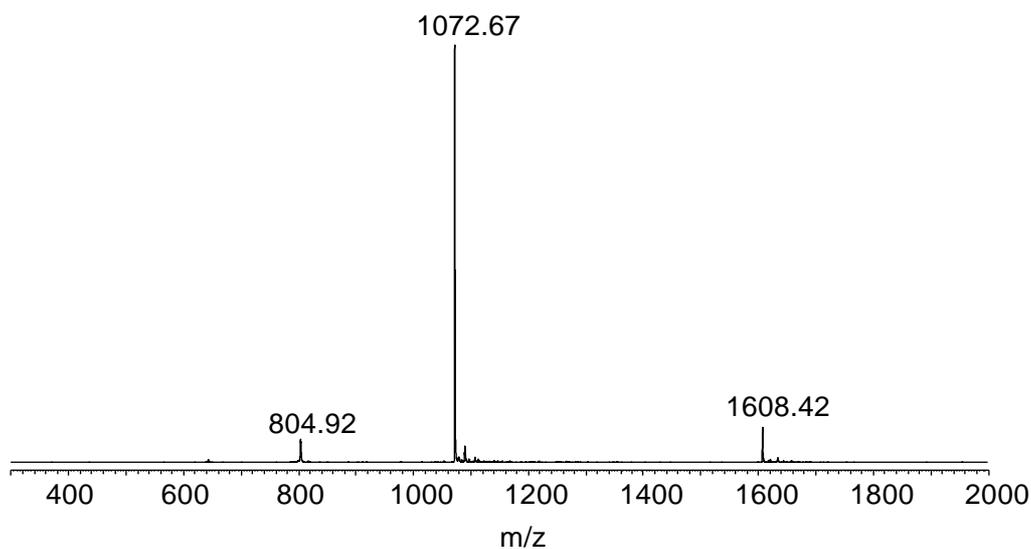
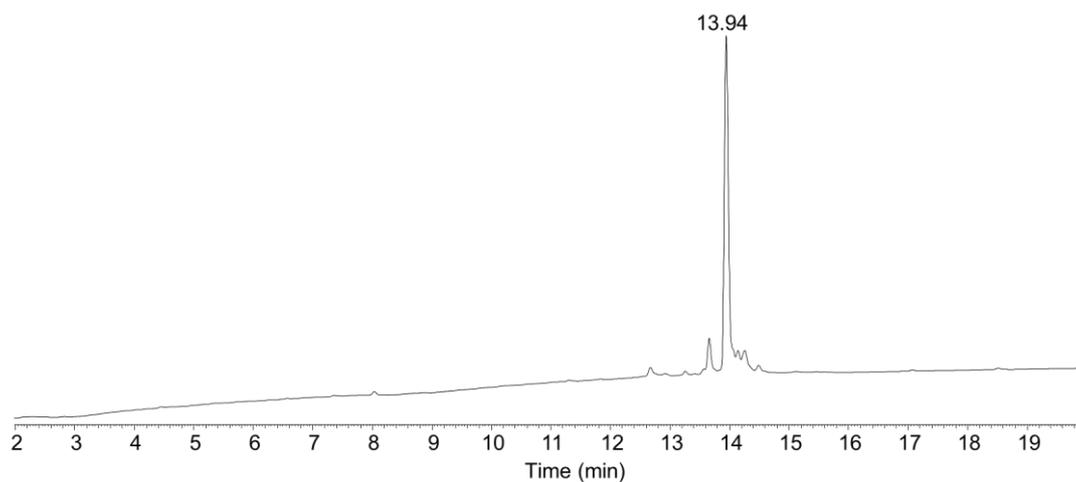


Figure S 24. UPLC-MS analysis of C(StBu)PC(StBu)LAQEGPQGDLTKTQELGRDCRT-SEA^{off} peptide **A₂Y66C-SEA**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1608.42 ([M+2H]²⁺), 1072.67 ([M+3H]³⁺), 804.92 ([M+4H]⁴⁺); calcd. for [M] (average mass): 3214.94, found: 3214.93.

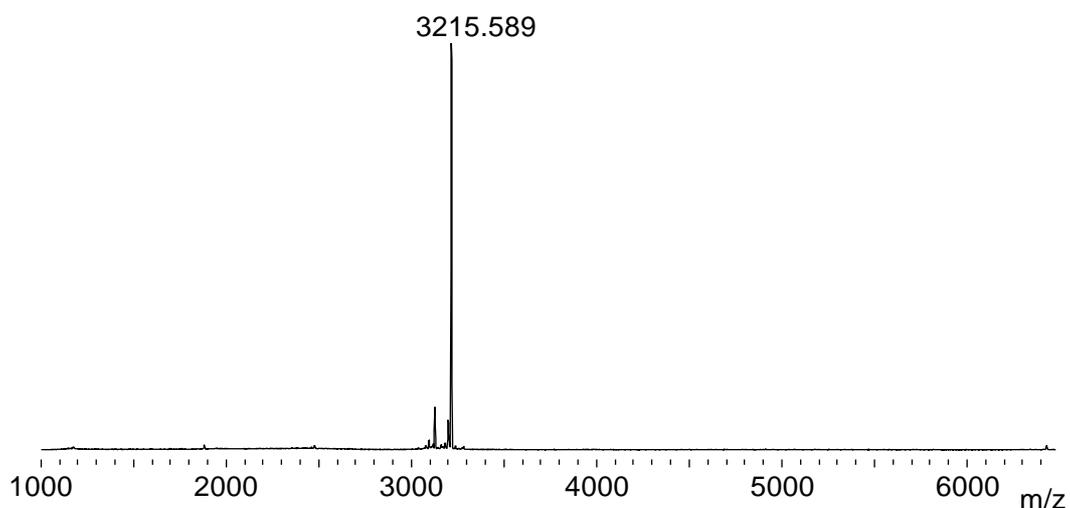


Figure S 25. MALDI-TOF analysis of peptide **A₂Y66C-SEA**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 3215.94, found: 3215.59.

RLDPEYYDLARAHLRDEEKSAPALAQEGPQGDLLTKTQELGRDYRT-SEA^{off} peptide **A_{APA}-SEA** was synthesized on a 0.20 mmol scale as described in the general procedure starting from SEA PS beads. TFA/EDT/TIS/thiophenol/thioanisole 87.5/2.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v/v (20 mL) was used as the cleavage cocktail. Purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, 20 mL min⁻¹, 0-15% eluent B in 10 min and then 15-40% eluent B in 40 min, C18 XBridge 5 μm (19 × 250 mm) column, detection at 215 nm, 20 °C) provided peptide **8** as a white solid after lyophilization (34.1 mg, 30%).

*Characterization of RLDPEYYDLARAHLRDEEKSAPALAQEGPQGDLLTKTQELGRDYRT-SEA^{off} peptide **A_{APA}-SEA**:*

Peptide **8** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 26) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 27).

ESI (positive detection mode, see Figure S 26): calcd. for [M] (average): 5377.02, found: 5377.25.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 27): calcd. for [M+H]⁺ (average): 5378.02, found: 5377.86.

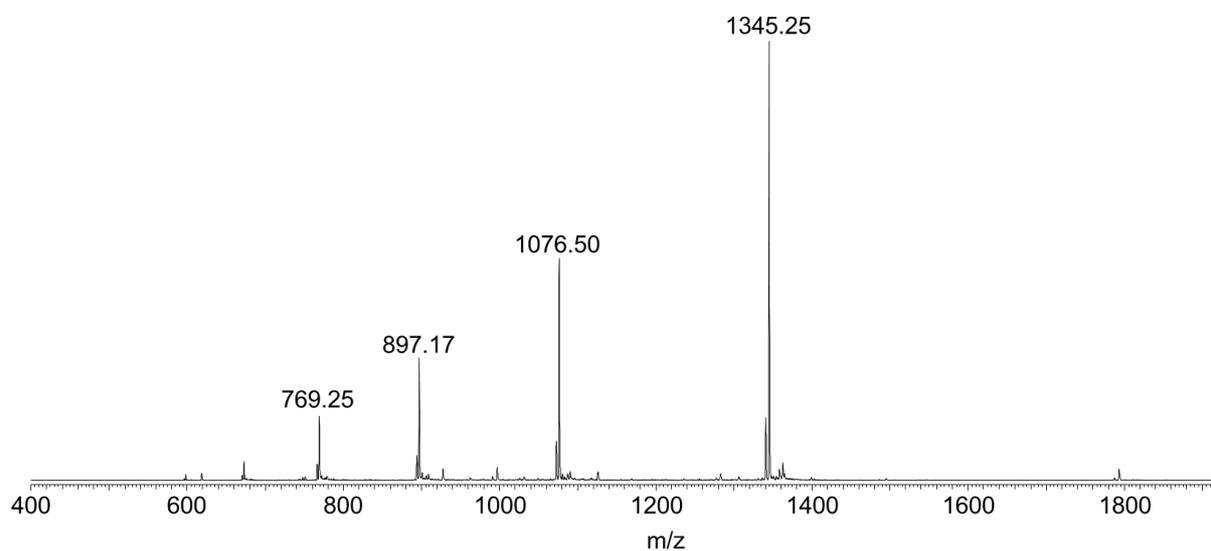
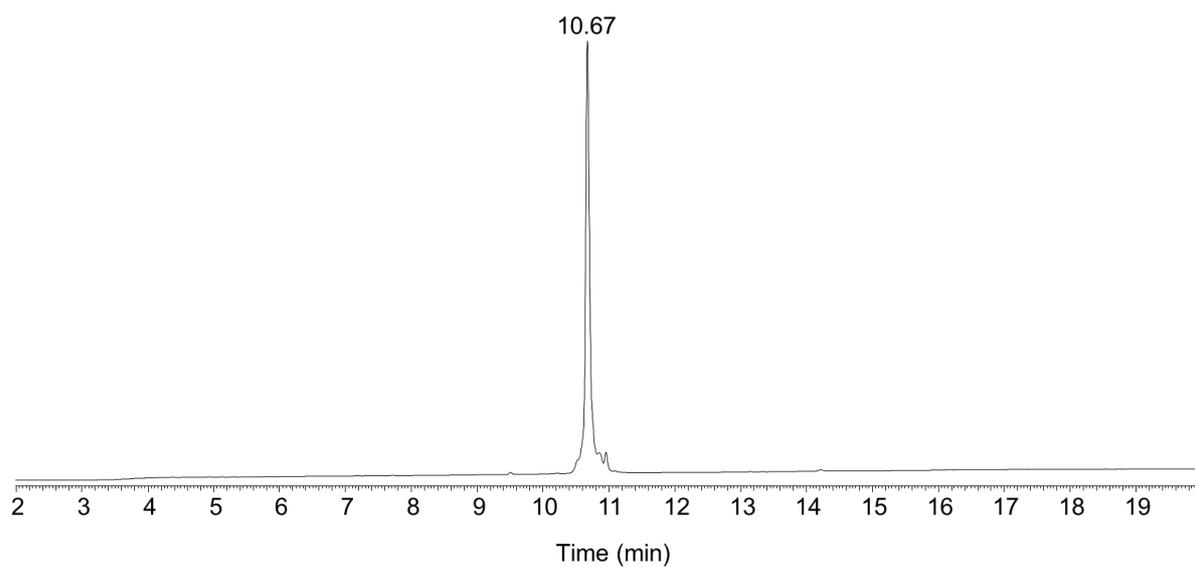


Figure S 26. UPLC-MS analysis of RLDPEYYDLARAHLRDEEKSAPALAQEGPQGDLTKT-QELGRDYRT-SEA^{off} peptide **AAPA-SEA**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1345.25 ([M+4H]⁴⁺), 1076.50 ([M+5H]⁵⁺), 897.17 ([M+6H]⁶⁺), 769.25 ([M+7H]⁷⁺); calcd. for [M] (average mass): 5377.02, found: 5377.25.

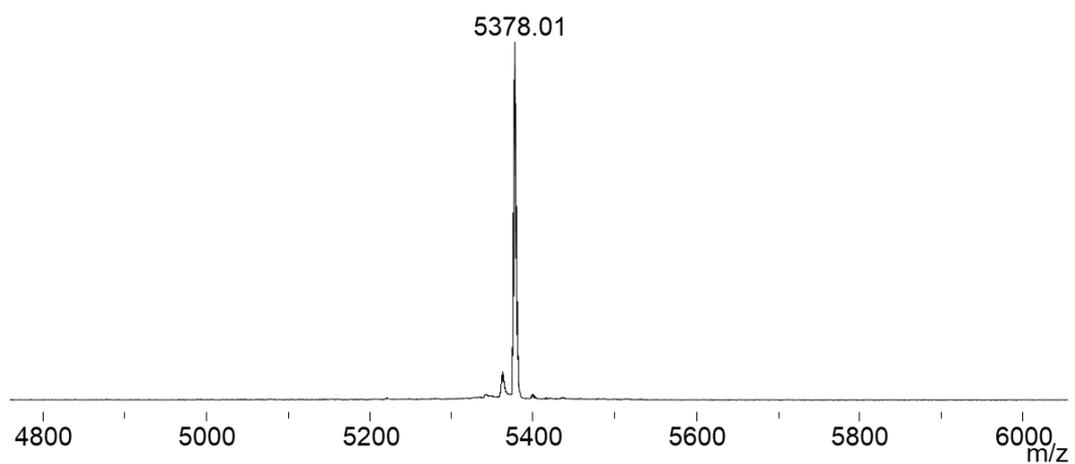


Figure S 27. MALDI-TOF analysis of peptide **A_{APA}-SEA**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 5378.02, found: 5378.01.

DYRT-SEA^{off} peptide **A_{9-GN}** was synthesized on a 0.10 mmol scale as described in the general procedure starting from SEA PS beads. TFA/EDT/TIS/thiophenol/thioanisole 87.5/2.5/5/2.5/2.5 v/v/v/v/v (20 mL) was used as the cleavage cocktail. Purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, 20 mL min⁻¹, 0-10% eluent B in 10 min and then 10-30% eluent B in 45 min, C18 XBridge 5 μm (19 × 250 mm) column, detection at 215 nm, 20 °C) provided peptide **A_{9-GN}** as a white solid after lyophilisation (45.0 mg, 50%).

*Characterization of DYRT-SEA^{off} peptide **A_{9-GN}**:*

Peptide **A_{9-GN}** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 28) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 29). ESI (positive detection mode, see Figure S 28): calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 671.26, found: 671.42. MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 29): calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 671.26, found: 671.15.

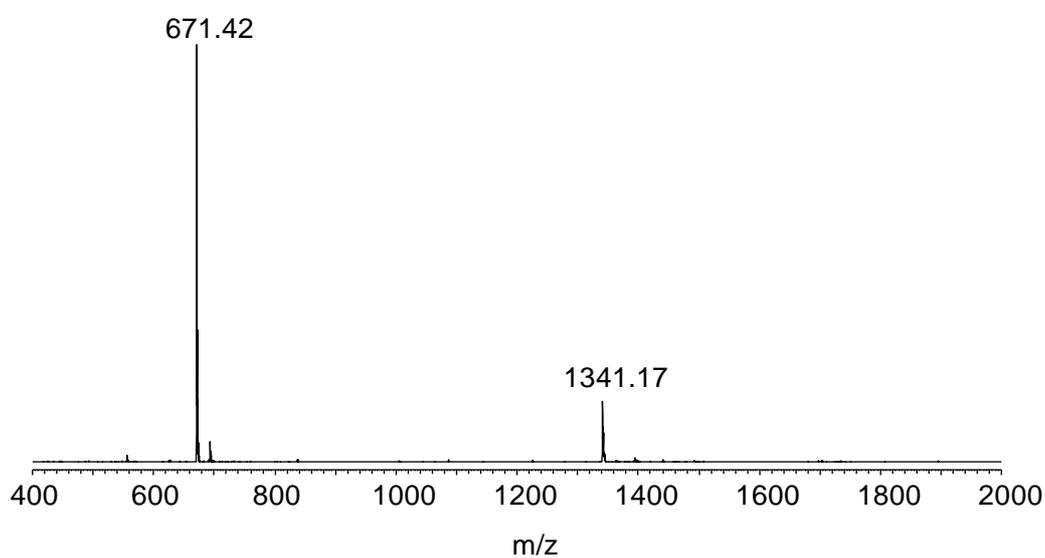
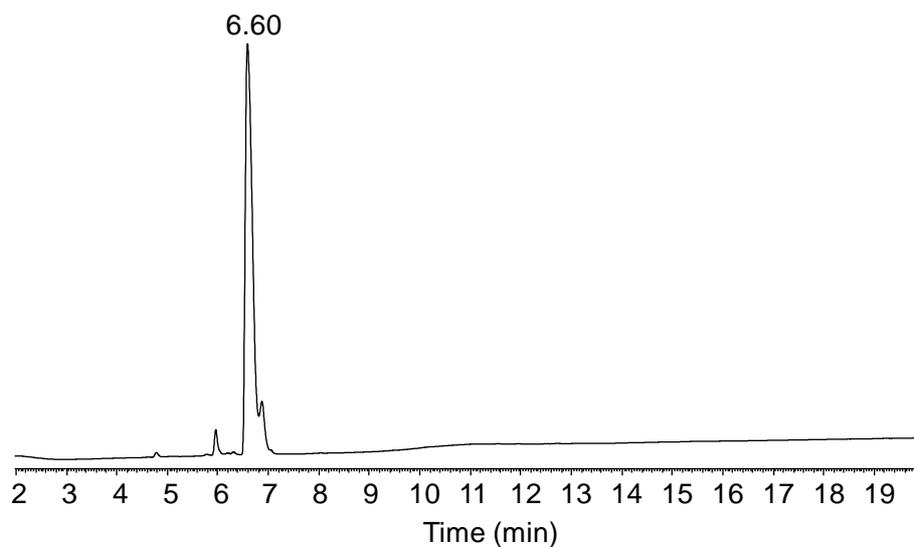


Figure S 28. UPLC-MS analysis of DYRT-SEA^{off} peptide A_{9-GN}. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 671.42 ([M+H]⁺); calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 671.26, found: 671.42.

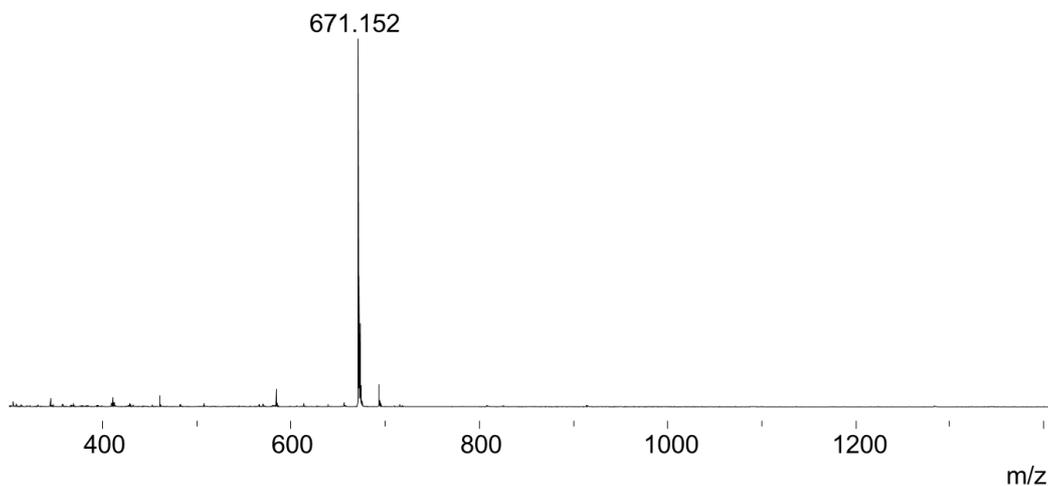


Figure S 29. MALDI-TOF analysis of peptide A_{9-GN}. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 671.26, found: 671.15.

3.4. Synthesis and characterization of MPA thioester peptide

RLDPEYYDLARAHLRDEEKS-MPA peptide **A₁-MPA** was synthesized by converting SEA^{off} peptide **A₁-SEA** into the corresponding MPA thioester using the following procedure.

Peptide **A₁-SEA** (30 mg, 9.2 μmol), MPA (0.10 mL, 5%-vol), TCEP·HCl (46 mg, 0.16 mmol) were dissolved in 6 M Gn·HCl aqueous solution (2.0 mL). The pH of the solution was adjusted to 4.0 by adding 6 M NaOH and the reaction mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 37 °C for 18 h. The purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 6 mL min⁻¹, 0-25% eluent B in 10 min then 25-35% eluent B in 60 min, C18 XBridge 5 μm (10 × 250 mm) column, detection at 215 nm, 50 °C) provided RLDPEYYDLARAHLRDEEKS-MPA peptide **2** as a white solid after lyophilization (23.5 mg, 40%).

Characterization of RLDPEYYDLARAHLRDEEKS-MPA peptide A₁-MPA:

Peptide **A₁-MPA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 30) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 31).

ESI (positive detection mode, see Figure S 30): calcd. for [M] (average): 2536.81, found: 2536.80.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 31): calcd. for [M+H]⁺ (average): 2537.81, found: 2537.11.

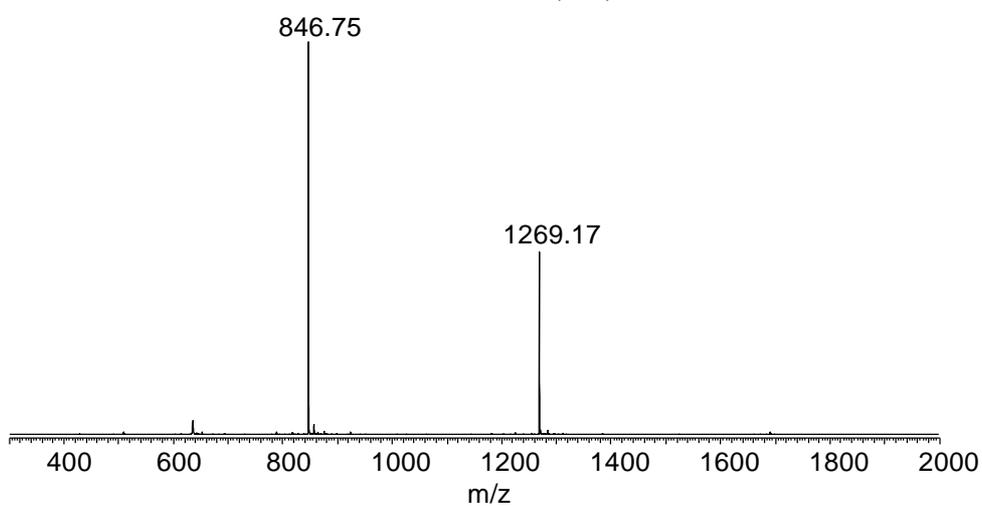
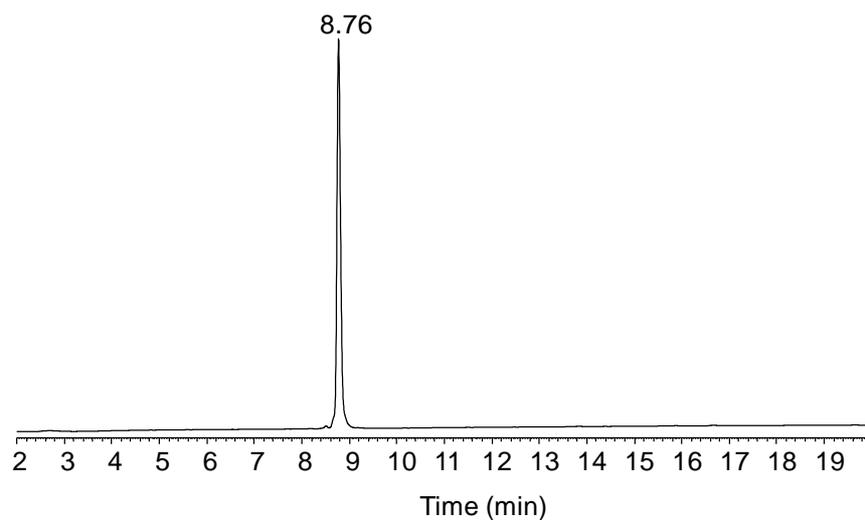


Figure S 30. UPLC-MS analysis of RLSPEYYDLARAHLRDEEKS-MPA peptide **A₁-MPA**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1269.17 ([M+2H]²⁺), 846.75 ([M+3H]³⁺); calcd. for [M] (average mass): 2536.81, found: 2536.80.

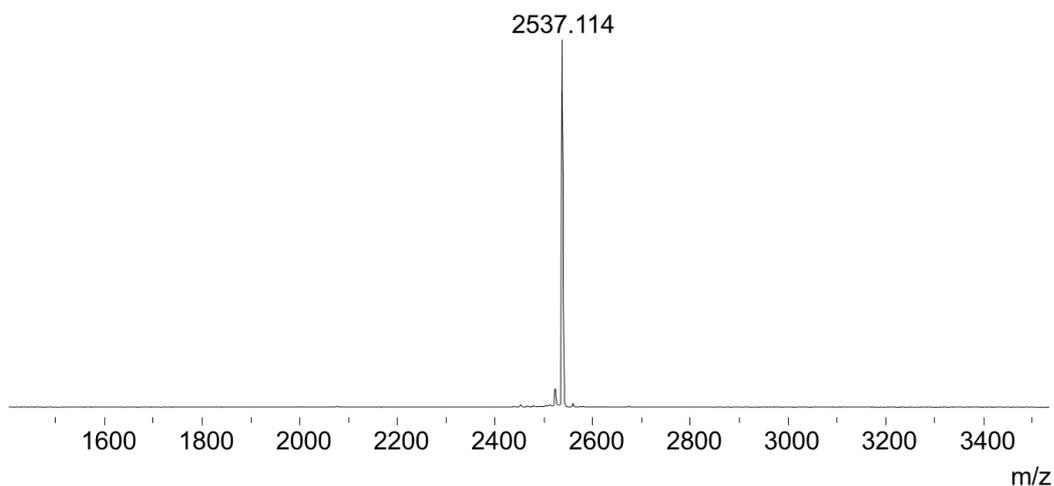


Figure S 31. MALDI-TOF analysis of peptide **A₁-MPA**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 2537.81, found: 2537.11.

RLDPEYYDLARAHRLRDEEKSAPALAQEGPQGDLLTKTQELGRDYRT-MPA peptide **A_{APA}-MPA** was synthesized by converting SEA^{off} peptide **A_{APA}-SEA** into the corresponding MPA thioester using the following procedure.

MPA (50 μ L, 5%-vol), TCEP·HCl (57 mg, 0.20 mmol) were dissolved in 6 M Gn·HCl aqueous solution (1 mL). Peptide **A_{APA}-SEA** (10 mg, 1.6 μ mol) was dissolved in 0.39 mL of the former solution. The pH was adjusted to 4.0 by adding 6 M NaOH and the reaction mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 37 °C for 22 h. The purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 6 mL min⁻¹, 0-30% eluent B in 15 min then 30-45% eluent B in 50 min, C18 XBridge 5 μ m (10 \times 250 mm) column, detection at 215 nm, 50 °C) provided RLDPEYYDLARAHRLRDEEKSAPALAQEGPQGDLLTKTQELGRDYRT-MPA peptide **A_{APA}-MPA** as a white solid after lyophilization (7.08 mg, 83%).

*Characterization of RLDPEYYDLARAHRLRDEEKSAPALAQEGPQGDLLTKTQELGRDYRT-MPA peptide **A_{APA}-MPA**:*

Peptide **11** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 32) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 33).

ESI (positive detection mode, see Figure S 32): calcd. for [M] (average): 5347.92, found: 5347.95.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 33): calcd. for [M+H]⁺ (average): 5348.92, found: 5348.60.

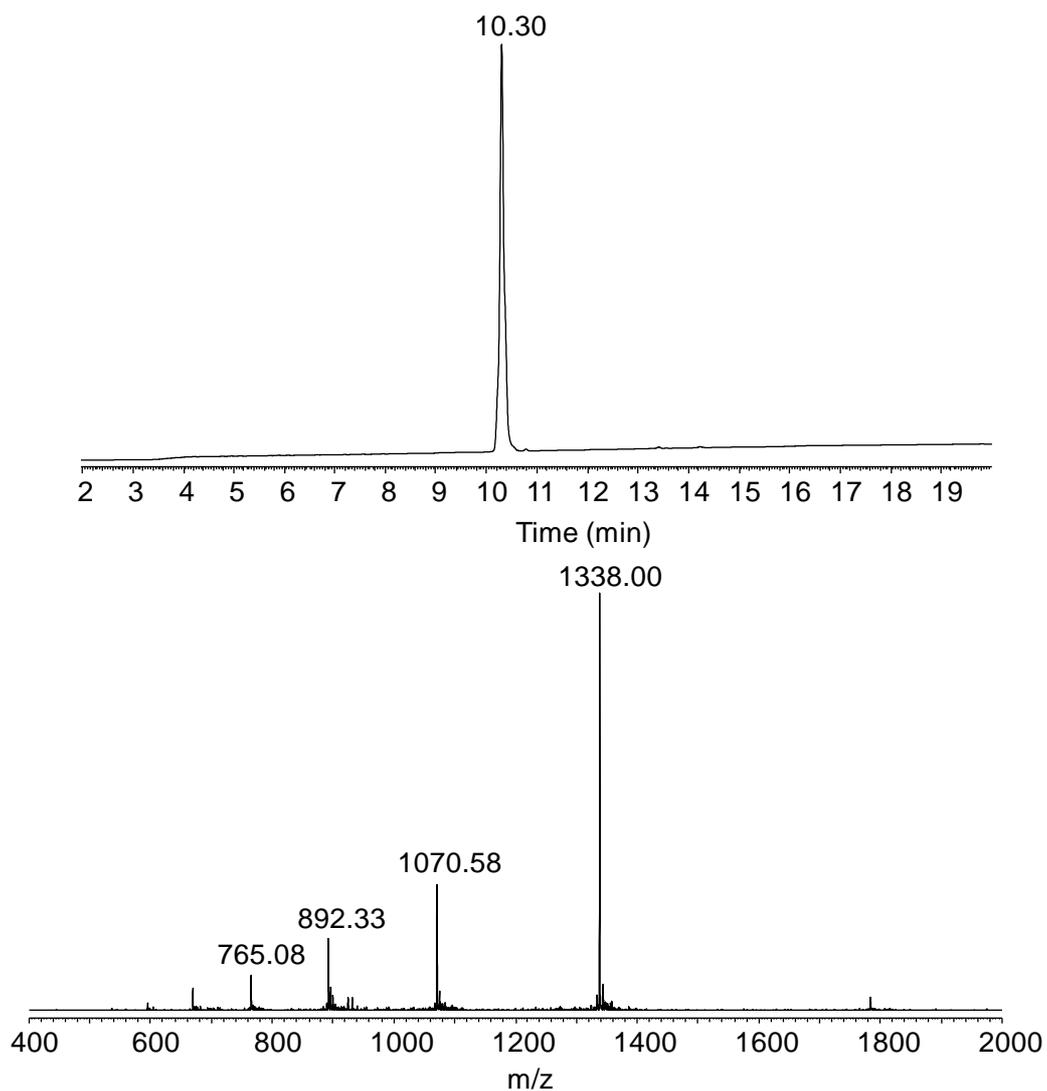


Figure S 32. UPLC-MS analysis of RLDPEYYDLARAHLRDEEKSAPALAQEGPQGDLTKT-QELGRDYRT-MPA peptide **A_{APA}-MPA**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1338.00 ([M+4H]⁴⁺), 1070.58 ([M+5H]⁵⁺), 892.33 ([M+6H]⁶⁺), 765.08 ([M+7H]⁷⁺); calcd. for [M] (average mass): 5347.92, found: 5347.95.

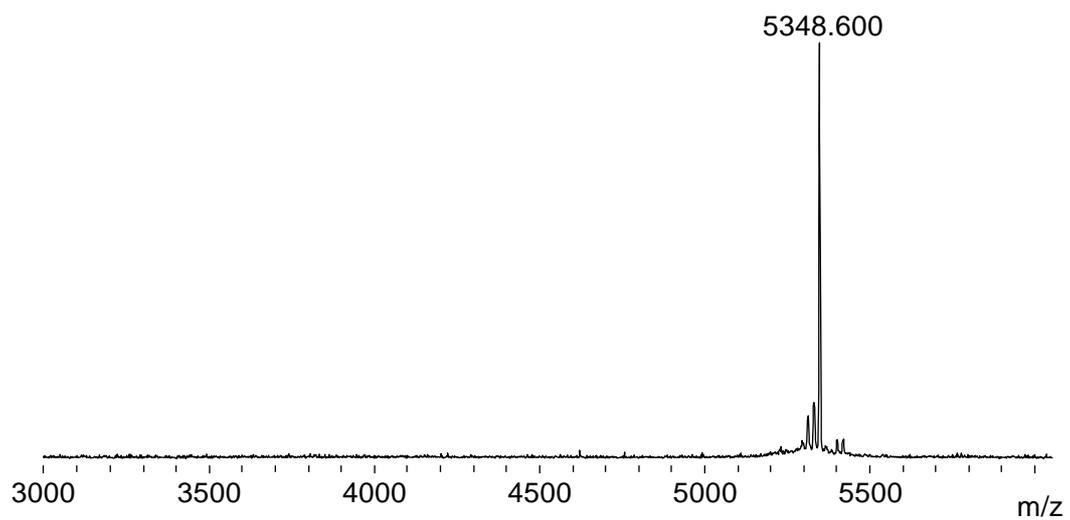


Figure S 33. MALDI-TOF analysis of peptide **A_{APA}-MPA**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 5348.92, found: 5348.60.

DYRT-MPA peptide **A_{9-GN}-MPA** was synthesized by converting SEA^{off} peptide **A_{9-GN}-SEA** into the corresponding MPA thioester using the following procedure.

MPA (0.15 mL, 5%-vol), TCEP-HCl (0.17 g, 0.59 mmol) were dissolved in 3.0 mL of 6 M Gn·HCl aqueous solution. Peptide **A_{9-GN}-SEA** (10 mg, 15 μmol) was dissolved in 3.0 mL of the former solution, pH was adjusted to 4.0 by addition of 6 M NaOH and the reaction mixture was stirred under nitrogen atmosphere at 37 °C for 24 h. Purification of the crude by semi-preparative HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN/water 4/1 v/v, 6 mL min⁻¹, 0-20% eluent B in 35 min, C18 XBridge 5 μm (10 × 250 mm) column, detection at 215 nm, 50 °C) provided DYRT-MPA peptide **A_{9-GN}-MPA** as a white solid after lyophilization (8.33 mg, 64%).

*Characterization of DYRT-MPA peptide **A_{9-GN}-MPA**:*

Peptide **A_{9-GN}-MPA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 34) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 35).

ESI (positive detection mode, see Figure S 34): calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 642.25, found: 642.42.
MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 35): calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 642.25, found: 642.18.

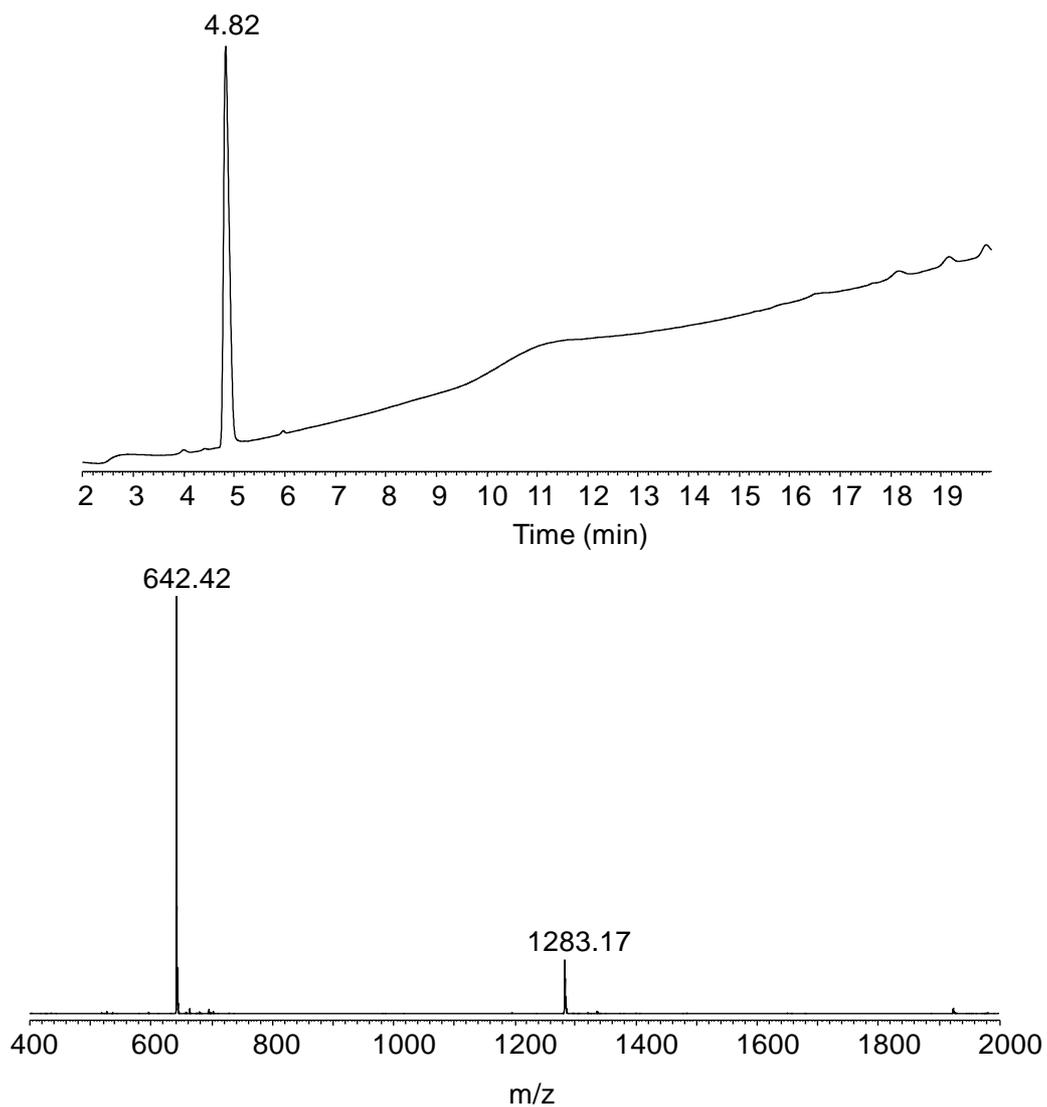


Figure S 34. UPLC-MS analysis of DYRT-MPA peptide **A₉-GN-MPA**. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1283.17 ([2M+H]⁺), 642.42 ([M+H]⁺); calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 642.25, found: 642.42.

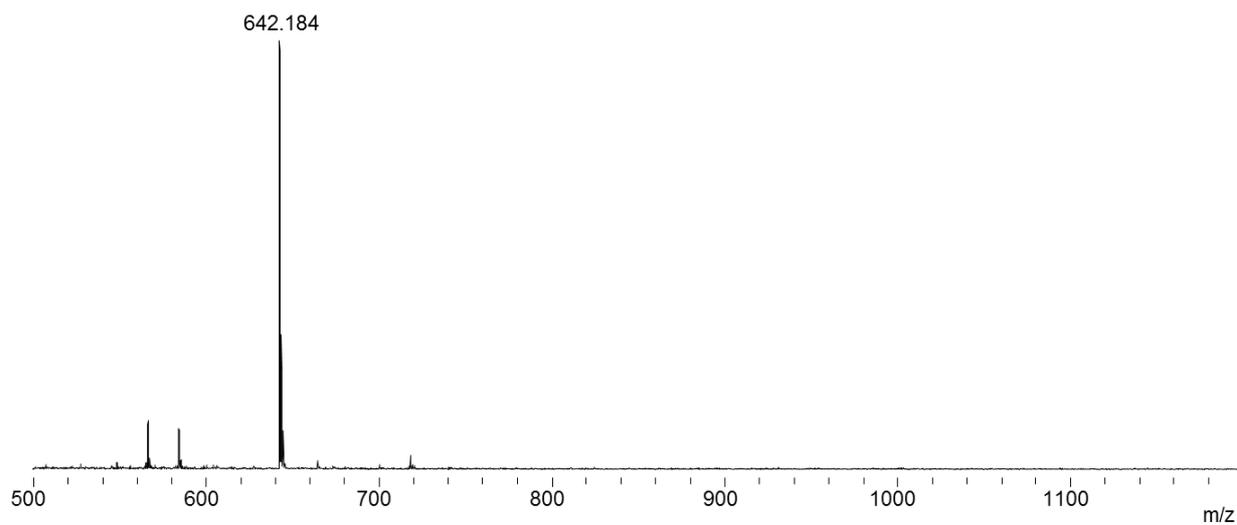


Figure S 35. MALDI-TOF analysis of peptide **A₉-GN-MPA**. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (monoisotopic): 642.25, found: 642.18.

4. Synthesis of linear granulysin polypeptides

4.1. Assembly of 15-GN-I

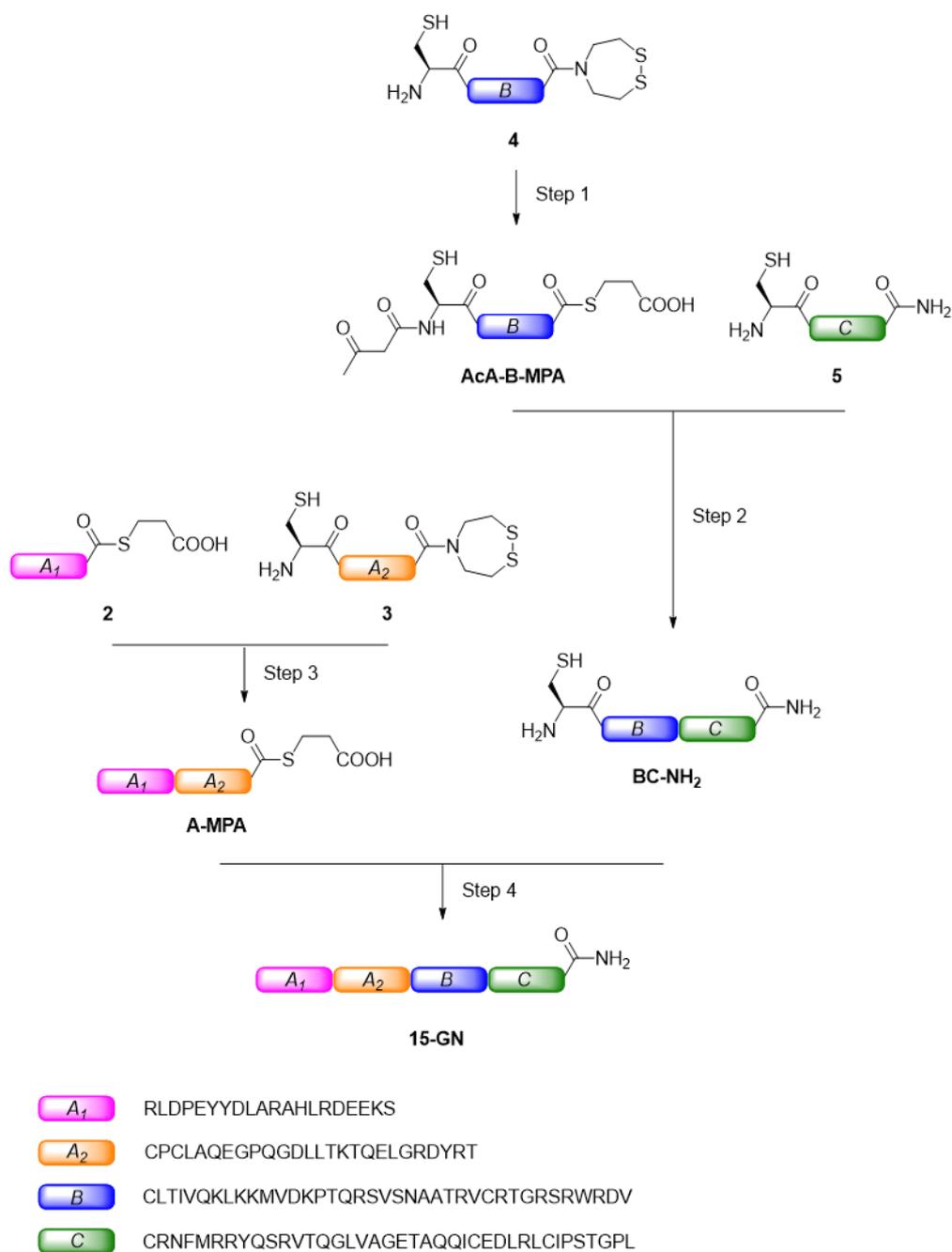


Figure S 36 General scheme for assembly of 15-GN.

*Step 1. Synthesis of peptide thioester **AcA-B-MPA***

To a solution of Gn·HCl (1.1 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (1.2 mL) was added MPAA (17 mg, 50 mM). Peptide **4** (15 mg, 2.6 μmol , 1.0 equiv.) and AcA-MTG (77 μL of a 0.10 M solution in ACN, 7.7 μmol , 3.0 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (1.3 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 37 °C for 8 h. 3.0 additional equivalents of AcA-MTG were added to and the mixture was further stirred at 37 °C for 16 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), SEA peptide **AcA-B-SEA^{off}** was converted into the corresponding MPA thioester in one-pot. To perform this reaction, TCEP·HCl (34 mg, 0.10 M), diselenide catalyst (20 mg, 50 mM) and MPA (65 μL , 5%-vol) were added to the previous mixture. The pH was adjusted to 4.0 by addition of 6 M NaOH and the reaction mixture was stirred at 37 °C for 72 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted in 10 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-37% eluent B in 15 min, then 37-57% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give **AcA-B-MPA** as a white solid after lyophilization (5.09 mg, 34%).

*Characterization of **AcA-B-MPA**:*

Peptide **AcA-B-MPA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 37) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 38).

ESI (positive detection mode, see Figure S 37): calcd. for [M] (average): 4561.40, found: 4561.79.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 38): calcd. for [M+H]⁺ (average): 4562.40, found: 4562.87.

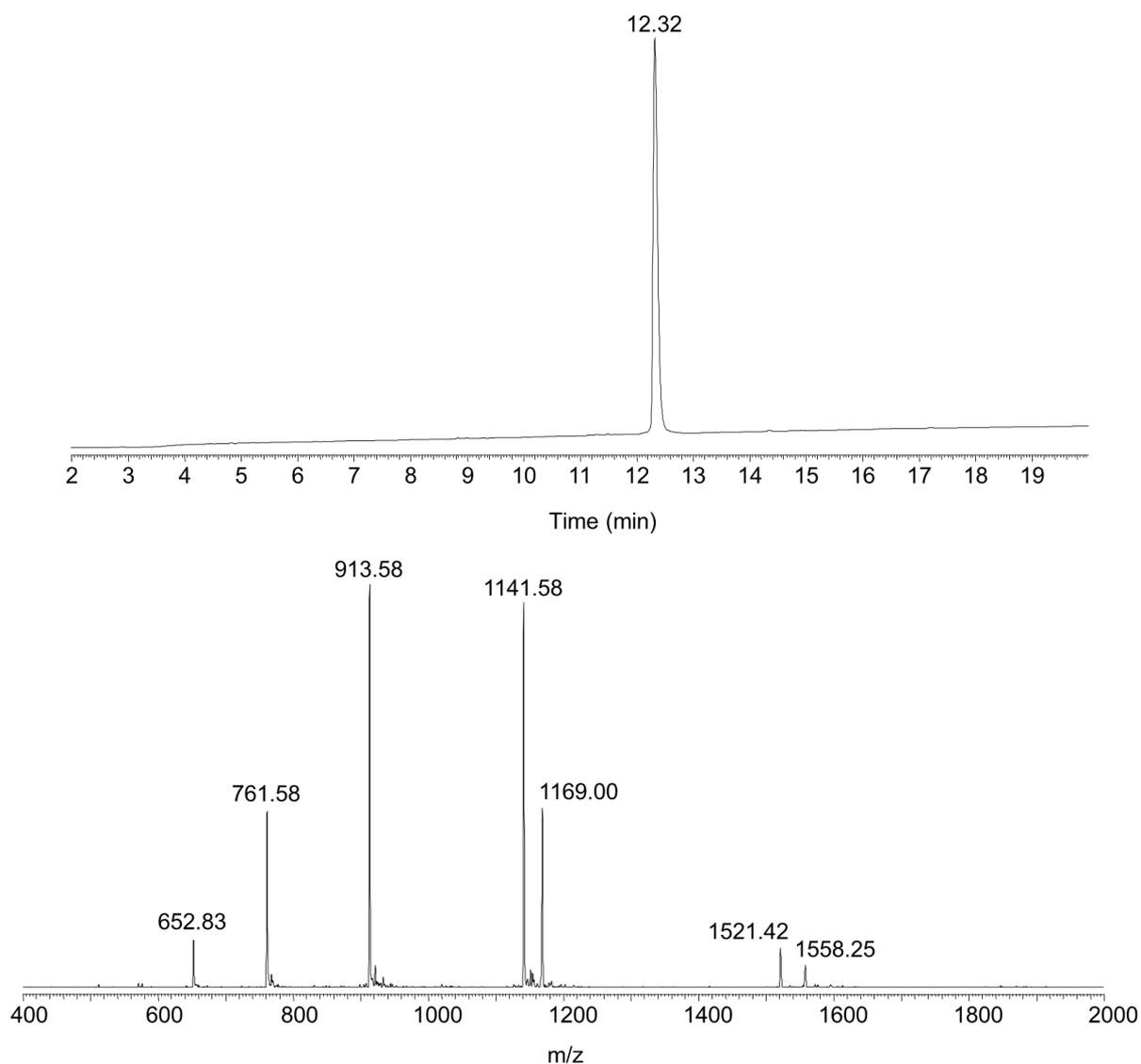


Figure S 37. UPLC-MS analysis of peptide AcA-B-MPA. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1558.25 ([M+M_{TFA}+3H]³⁺), 1521.42 ([M+3H]³⁺), 1169.00 ([M+M_{TFA}+4H]⁴⁺), 1141.58 ([M+4H]⁴⁺), 913.58 ([M+5H]⁵⁺), 761.58 ([M+6H]⁶⁺), 652.83 ([M+7H]⁷⁺); calcd. for [M] (average mass): 4561.40, found: 4561.79.

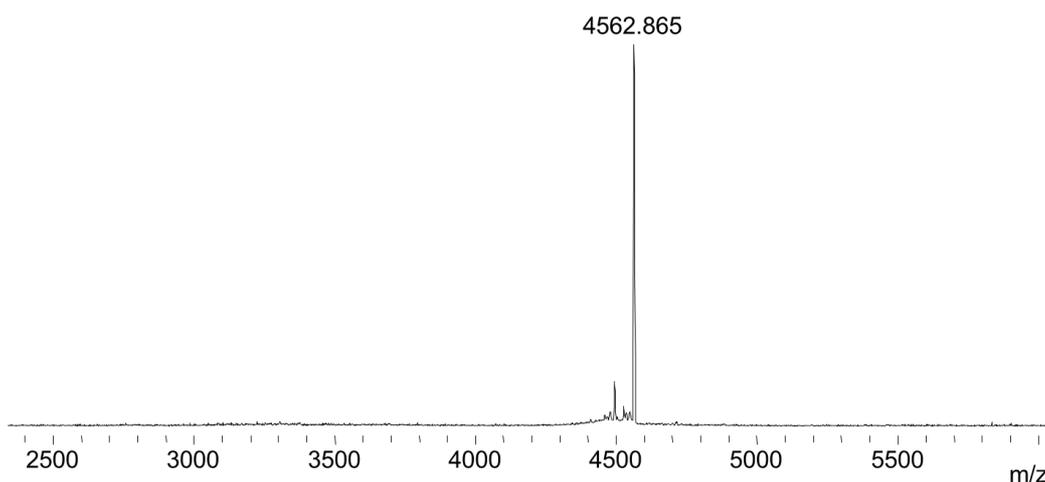


Figure S 38. MALDI-TOF analysis of peptide AcA-B-MPA. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 4562.40, found: 4562.87.

Step 2. Synthesis of peptide amide **BC-NH₂**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 M) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. **AcA-B-MPA** (5.1 mg, 0.89 μmol , 1.0 equiv.) and peptide **5** (5.1 mg, 0.98 μmol , 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.18 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), the AcA protecting group of **AcA-BC-NH₂** was removed by reaction with NH₂OH. To perform this deprotection, the reaction mixture was first acidified to pH 3.0 with 6 M HCl and extracted 3 times with 1.0 mL of Et₂O to remove MPAA. The mixture was then treated with a 0.5 M solution of NH₂OH·HCl in H₂O (36 μL , 18 μmol , 20 equiv.) and the pH was adjusted to 5.5. After 4 h stirring at 37 °C, pH was adjusted to 3.0 with 0.25 g mL⁻¹ aqueous solution of TCEP·HCl. The crude was then diluted in 4.0 mL of water containing 0.25% TFA and purified by HPLC (eluent A = water containing 0.25% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.25% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-35% eluent B in 10 min, then 35-55% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to afford **BC-NH₂** as a white solid after lyophilization (4.90 mg, 52%).

Characterization of **BC-NH₂**:

Peptide **BC-NH₂** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 39) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 40).

ESI (positive detection mode, see Figure S 39): calcd. for $[M]$ (average): 8782.32, found: 8782.33.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 40): calcd. for $[M+H]^+$ (average): 8783.32, found: 8783.72.

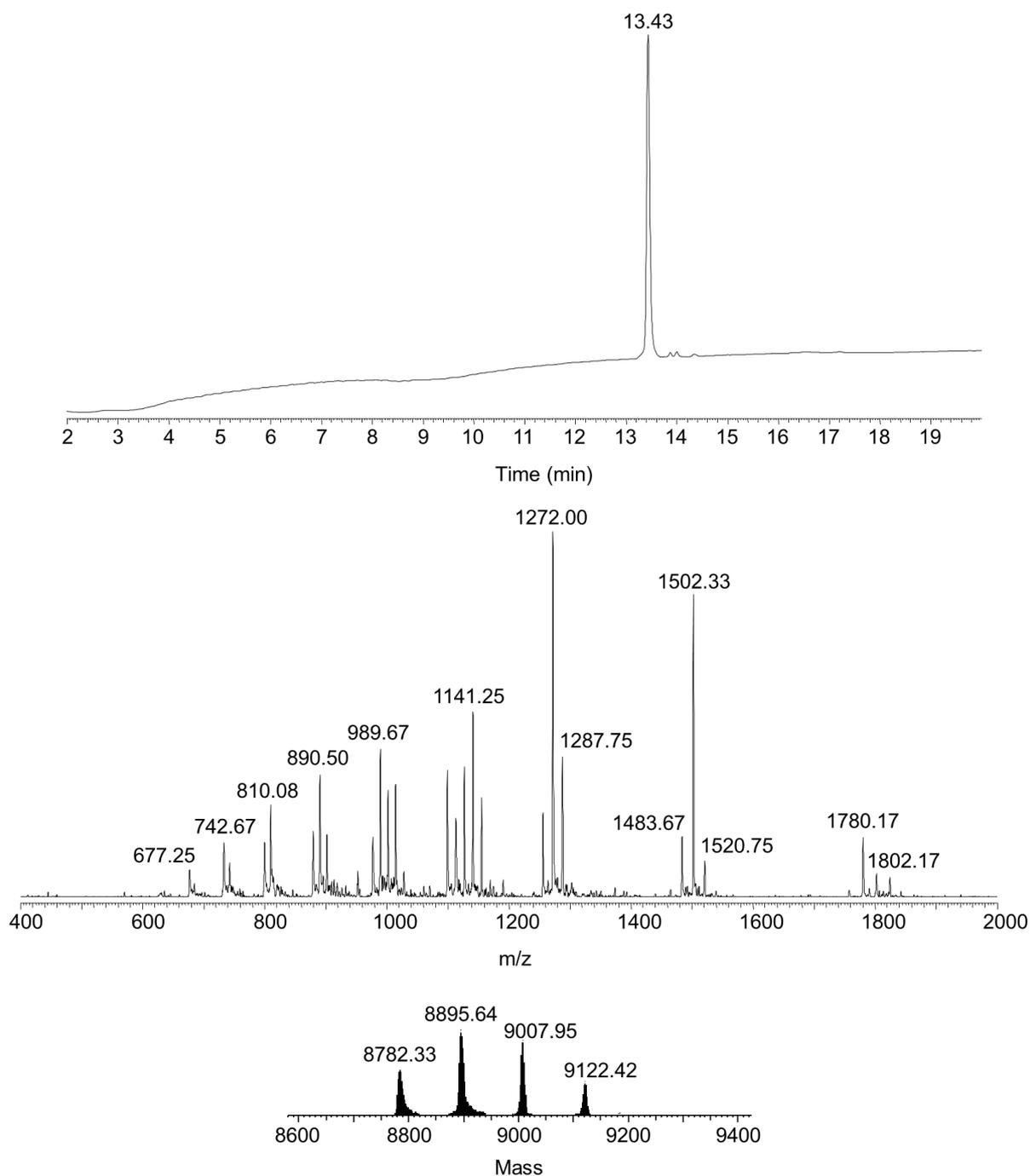


Figure S 39. UPLC-MS analysis of peptide BC-NH₂. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M] (average mass): 8782.32, found: 8782.33 (8895.64 [M+M_{TFA}], 9007.95 [M+2M_{TFA}], 9122.42 [M+3M_{TFA}]).

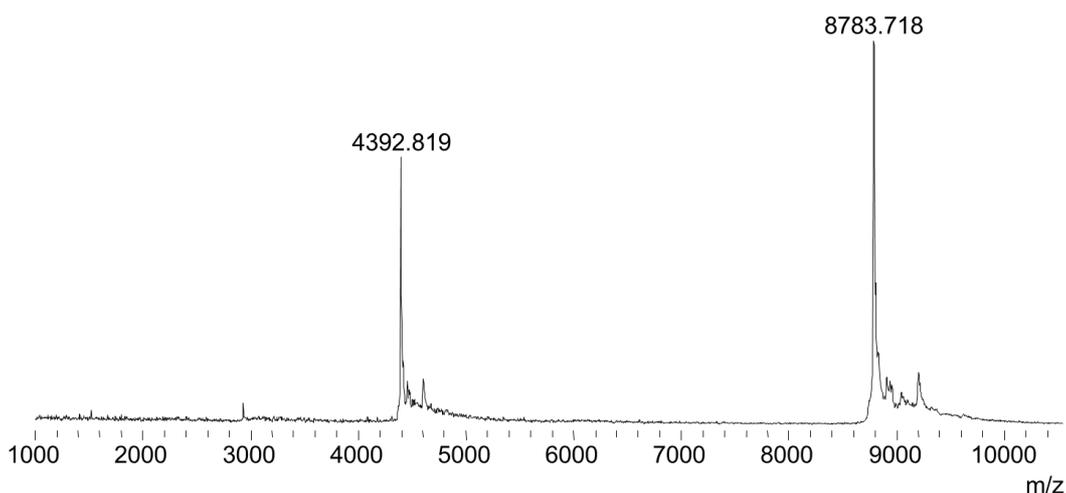


Figure S 40. MALDI-TOF analysis of peptide BC-NH₂. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 8783.33, found: 8783.72.

Step 3. Synthesis of peptide thioester **A-MPA**

To a solution of Gn·HCl (1.1 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (1.2 mL) was added MPAA (67 mg, 200 mM). Peptide **3** (13 mg, 3.7 μmol, 1.2 equiv.) and peptide **2** (10 mg, 3.1 μmol, 1.0 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.77 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 4 °C for 24 h under nitrogen atmosphere.⁷ Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), SEA peptide **A-SEA^{off}** was directly converted into the corresponding MPA thioester. To perform this reaction, the mixture was first acidified to pH 3.0 with 6 M HCl and extracted 3 times with 2.0 mL of Et₂O to remove MPAA. TCEP·HCl (44 mg, 0.20 mM), and MPA (40 μL, 5%-vol) were added to the previous mixture. The pH was adjusted to 4.0 by addition of 6 M NaOH and the reaction mixture was stirred at 37 °C for 20 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted in 5.0 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-22% eluent B in 10 min, then 22-42% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give peptide thioester **A-MPA** as a white solid after lyophilization (10.4 mg, 53%).

Characterization of **A-MPA**:

Peptide thioester **A-MPA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 41) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 42).

ESI (positive detection mode, see Figure S 41): calcd. for [M] (average): 5412.04, found: 5412.61.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 42): calcd. for [M+H]⁺ (average): 5413.04, found: 5413.06.

⁷ Snella, B.; Diemer, V.; Drobecq, H.; Agouridas, V.; Melnyk, O. Native Chemical Ligation at Serine Revisited *Org. Lett.* **2018**, *23*, 7616–7619.

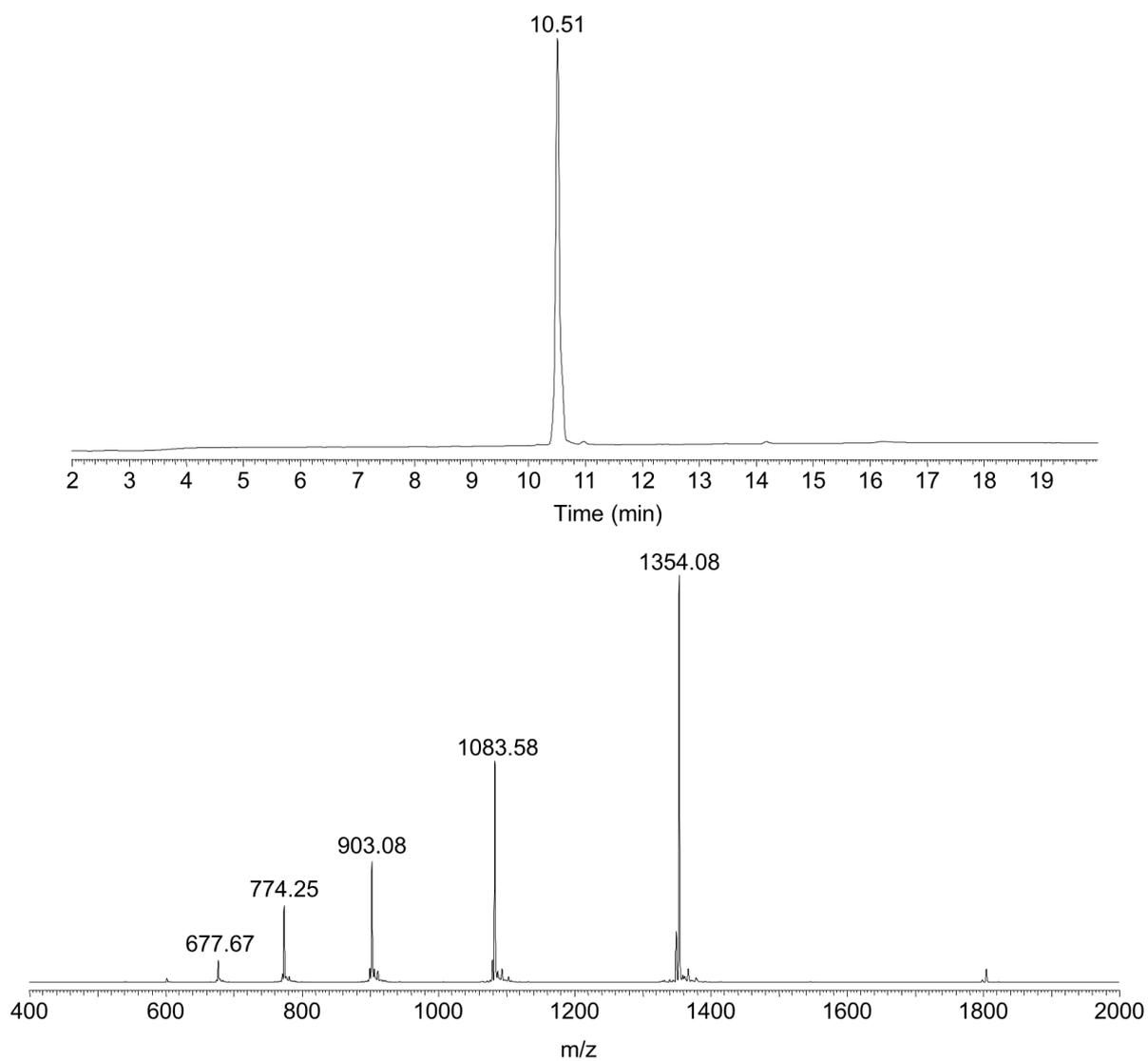


Figure S 41. UPLC-MS analysis of peptide A-MPA. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH_3CN . C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min^{-1} , UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1354.08 ($[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$), 1083.58 ($[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$), 903.08 ($[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$), 774.25 ($[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$), 677.67 ($[\text{M}+7\text{H}]^{7+}$); calcd. for [M] (average mass): 5412.04, found: 5412.61.

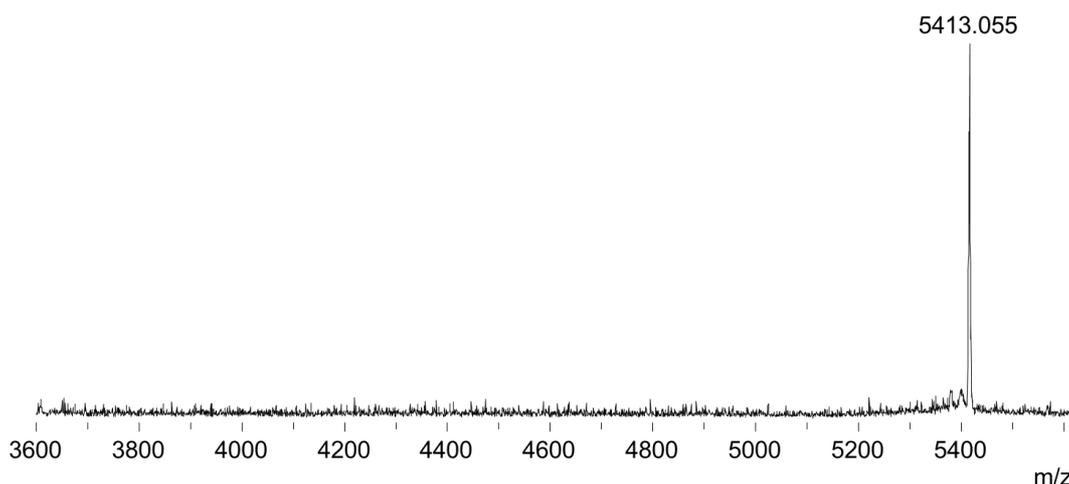


Figure S 42. MALDI-TOF analysis of peptide A-MPA. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 5413.04, found: 5413.06.

Step 4. Synthesis of **15-GN-I**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 M) and the pH of the mixture was adjusted to 7.7 by addition of 6 M NaOH. BC-NH₂ (4.9 mg, 0.47 μmol, 1.0 equiv.) and peptide thioester A-MPA (3.2 mg, 0.51 μmol, 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.12 mL). The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), TCEP·HCl (6.7 mg, 23 μmol) was added to the reaction medium to reduce mixed disulfides. The resulting mixture was diluted in 4.0 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-42% eluent B in 15 min, then 42-62% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give 15-GN as a white solid after lyophilization (3.08 mg, 40%).

Characterization of **15-GN-I**:

Peptide 15-GN was analyzed by UPLC-MS (Figure S 43) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 44).

ESI (positive detection mode, see Figure S 43): calcd. for $[M]$ (average): 14088.22, found: 14087.89.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 44): calcd. for $[M+H]^+$ (average): 14089.22, found: 14088.58.

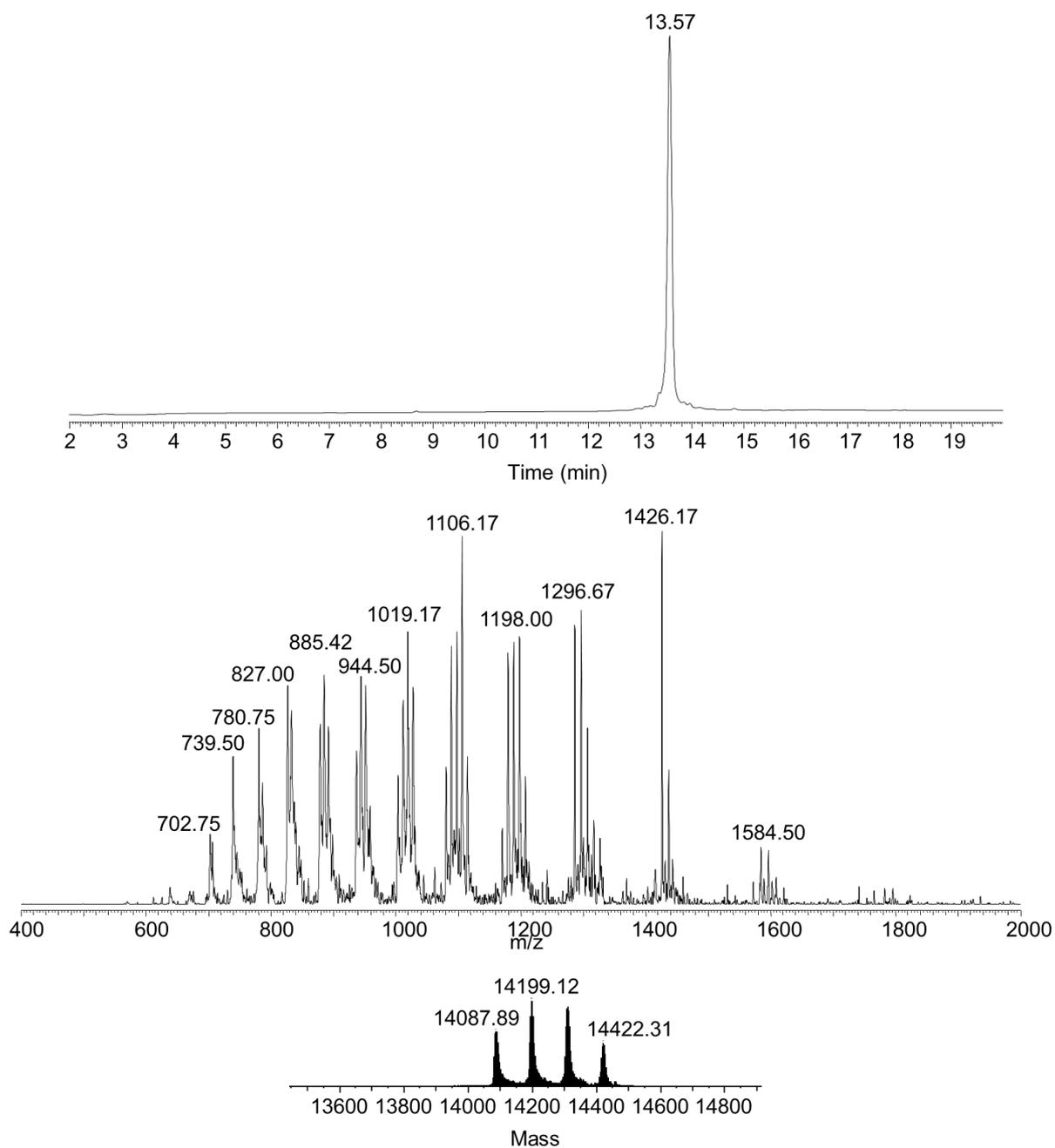


Figure S 43. UPLC-MS analysis of peptide 15-GN. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH_3CN . C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min^{-1} , UV detection at 215 nm. MS trace: m/z calcd. for [M] (average mass): 14088.22, found: 14087.89 (14199.12 [M+M_{TFA}], 14311.51 [M+2M_{TFA}], 14422.31 [M+3M_{TFA}]).

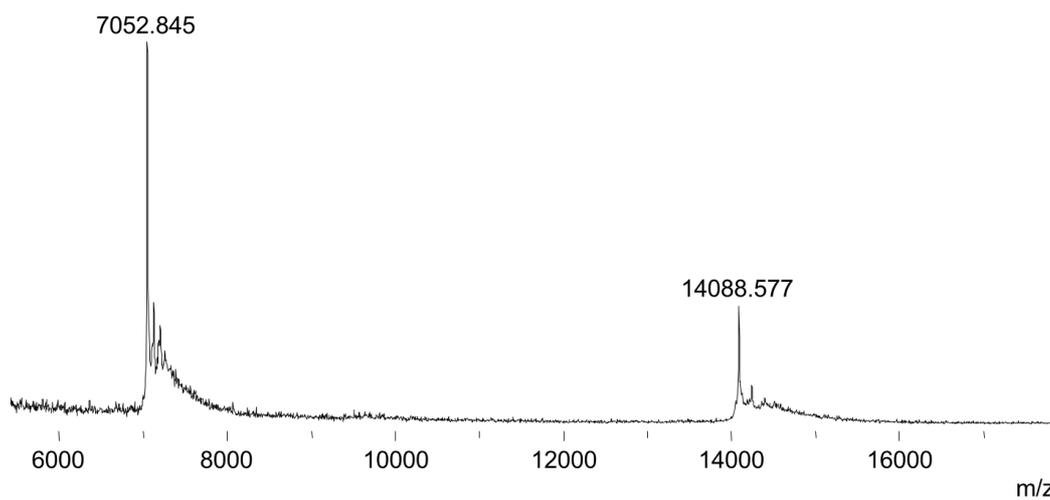


Figure S 44. MALDI-TOF analysis of peptide 15-GN. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 14089.22, found: 14088.58.

4.2. Assembly of 9-GN-I

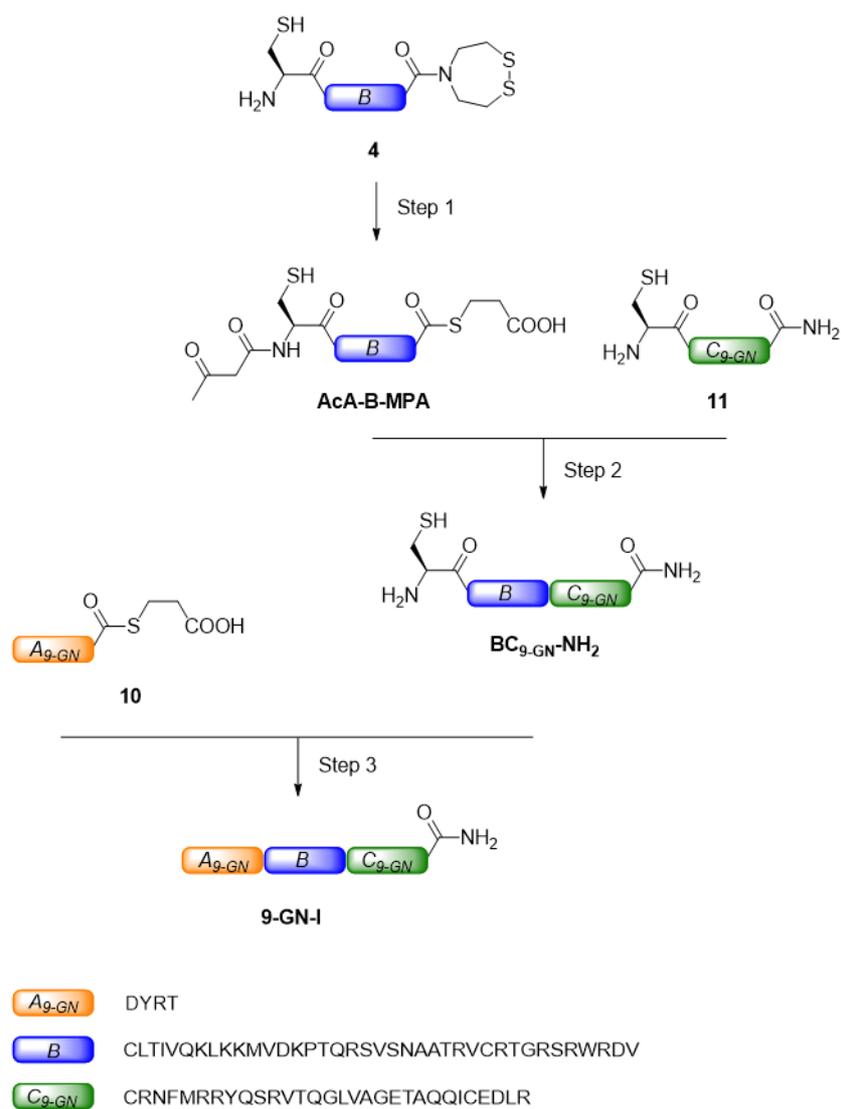


Figure S 45 General scheme for assembly of 9-GN.

Step 1. Synthesis of peptide thioester **AcA-B-MPA** was performed as described above (§4.1)

Step 2. Synthesis of peptide amide **BC_{9-GN}-NH₂**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M, pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 mM) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. **AcA-B-MPA** (3.5 mg, 0.61 μmol, 1.0 equiv.) and peptide **11** (2.8 mg, 0.67 μmol, 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.12 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), the AcA protecting group of **AcA-BC-NH₂** was removed by reaction with NH₂OH. To perform this deprotection, the reaction mixture was first acidified to pH 3.0 with 6 M HCl and extracted 3 times with 1.0 mL of Et₂O to remove MPAA. The mixture is then treated with a 0.5 M solution of NH₂OH·HCl in H₂O (26 μL, 13 μmol, 20 equiv.) and the pH was adjusted to 5.5. After 4 h stirring at 37 °C, pH was adjusted to 3.0 with 0.25 g mL⁻¹ aqueous solution of TCEP·HCl. The crude was further diluted in 4.0 mL of water containing 0.25% TFA and purified by HPLC (eluent A* = water containing 0.25% TFA, eluent B* = acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.25% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-40% eluent B* in 10 min, then 40-50% eluent B* in 45 min, C18XBridge column) to afford **BC_{9-GN}-NH₂** as a white solid after lyophilization (3.49 mg, 56%).

Characterization of BC_{9-GN}-NH₂:

Peptide **BC_{9-GN}-NH₂** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 46) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 47).

ESI (positive detection mode, see Figure S 46): calcd. for [M] (average): 7899.22, found: 7899.94.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 47): calcd. for [M+H]⁺ (average): 7900.22, found: 7901.49.

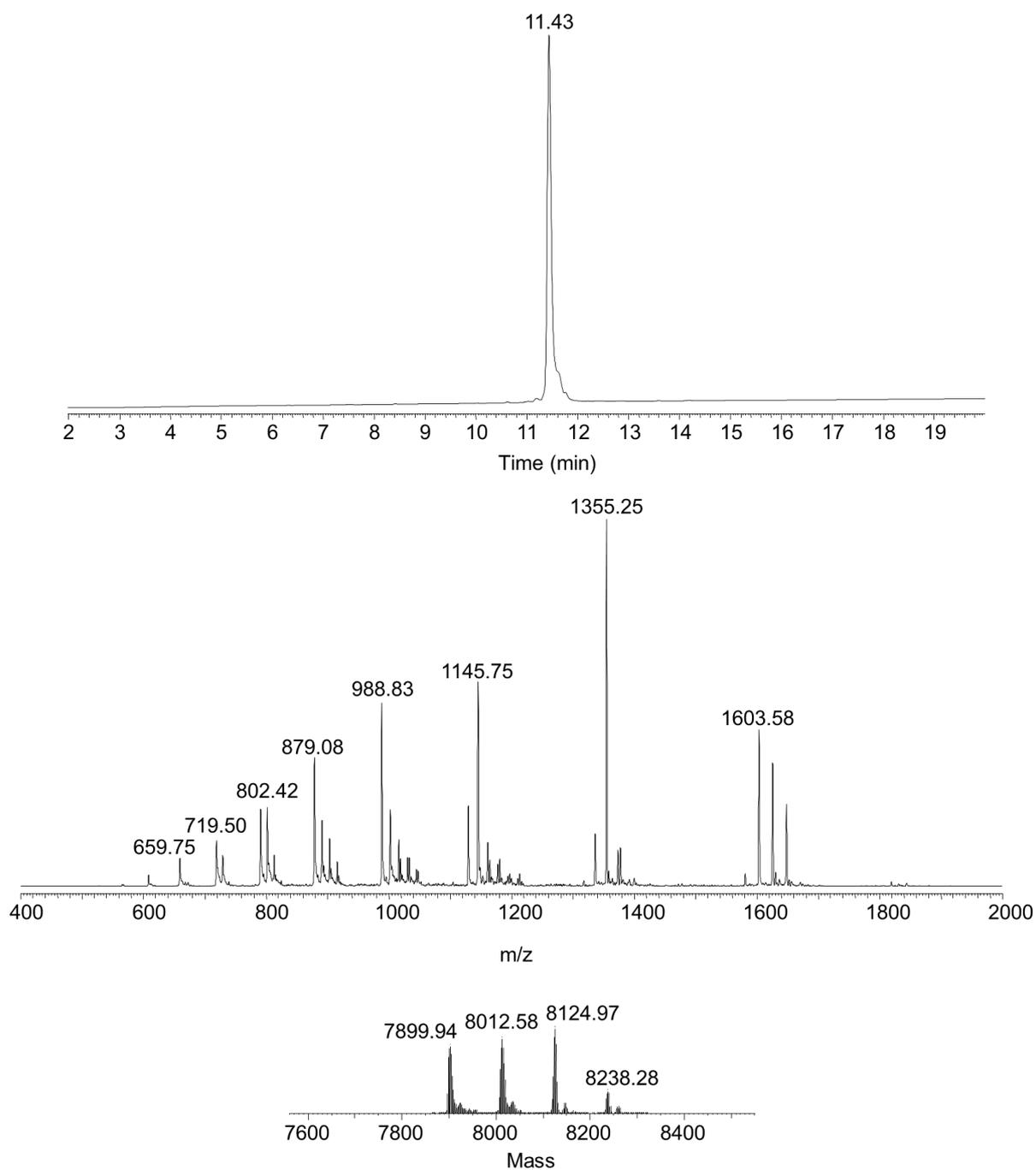


Figure S 46. UPLC-MS analysis of peptide BC₉-GN-NH₂. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M] (average mass): 7899.22, found: 7899.94 (8012.58 [M+M_{TFA}], 8124.97 [M+2M_{TFA}], 8238.28 [M+3M_{TFA}]).

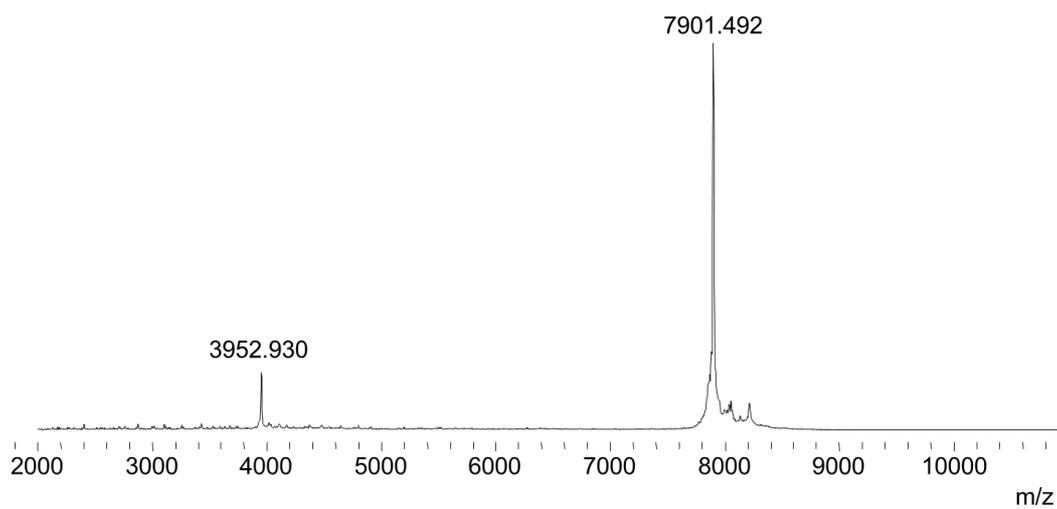


Figure S 47. MALDI-TOF analysis of peptide $BC_{9-GN-NH_2}$. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 7900.22, found: 7901.49.

Step 3. Synthesis of **9-GN-I**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 mM) and the pH of the mixture was adjusted to 7.7 by addition of 6 M NaOH. **BC_{9-GN}-NH₂** (3.5 mg, 0.36 μmol, 1.0 equiv.) and peptide **10** (0.38 mg, 0.36 μmol, 1.0 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (91 μL) The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), TCEP·HCl (5.2 mg, 18 μmol) was added to the reaction medium to reduce any mixed disulfide formed during ligation. The resulting mixture was diluted in 3.0 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-38% eluent B in 10 min, then 38-58% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give **9-GN** as a white solid after lyophilization (2.92 mg, 78%).

Characterization of **9-GN-I**:

Peptide **9-GN** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 48) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 49). ESI (positive detection mode, see Figure S 48): calcd. for [M] (average): 8435.79, found: 8435.45.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 49): calcd. for [M+H]⁺ (average): 8436.79, found: 8436.65.

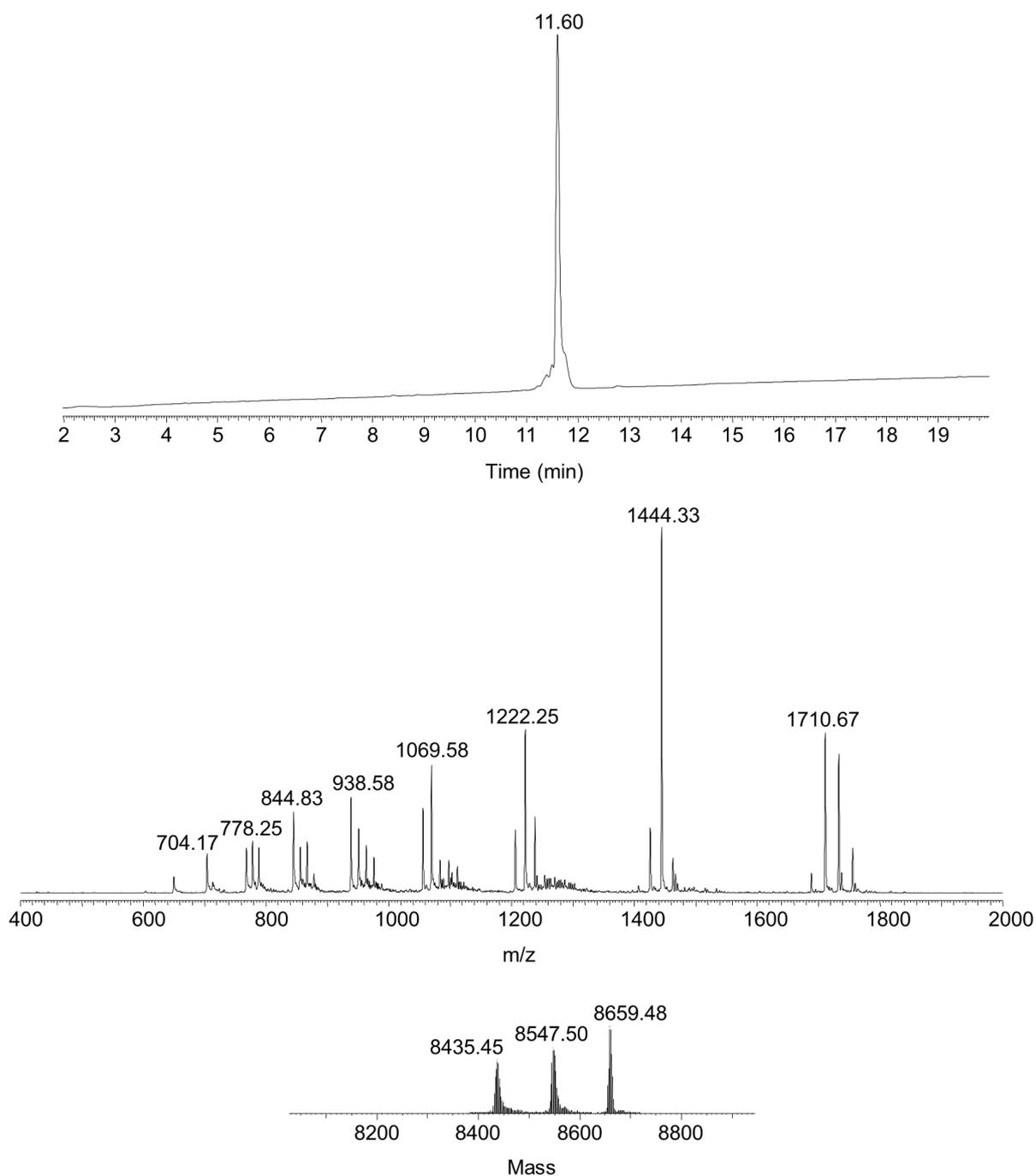


Figure S 48. UPLC-MS analysis of peptide 9-GN. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH_3CN . C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min^{-1} , UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for $[M]$ (average mass): 8435.79, found: 8435.45 (8547.50 $[M+M_{\text{TFA}}]$, 8659.48 $[M+2M_{\text{TFA}}]$).

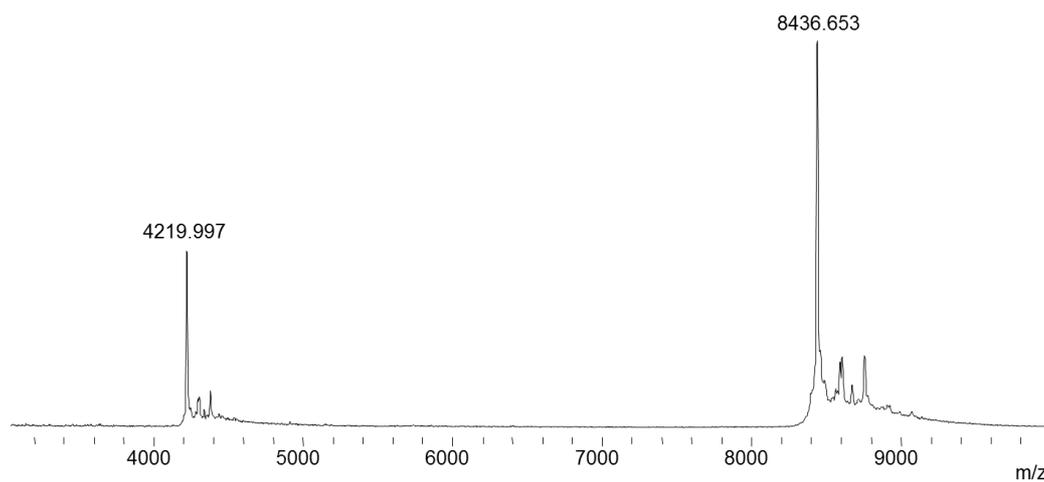


Figure S 49. MALDI-TOF analysis of peptide 9-GN. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 8436.79, found: 8436.65.

4.3. Assembly of Nter₁₅-GN-I

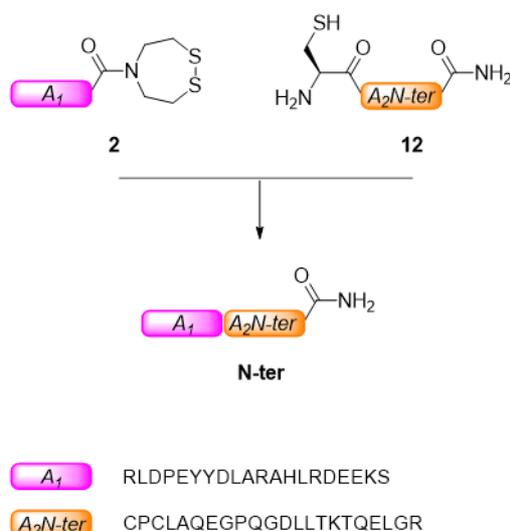


Figure S 50. Assembly of N-ter.

To a solution of Gn·HCl (1.1 mg) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (1.2 mL) was added MPAA (67 mg, 0.20 M) and TCEP·HCl (0.12 g, 0.20 mM). Peptide **12** (10 mg, 3.5 μmol, 1.1 equiv.) and peptide **1** (10 mg, 3.1 μmol, 1.0 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.74 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 5.5 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 4 °C for 28 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the SEA-mediated ligation (28 h), the mixture was first acidified to pH 3.0 with 6 M HCl and extracted 3 times with 2.0 mL of Et₂O to remove MPAA. The crude was diluted in 4 mL of water containing 0.1% TFA and purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-30% eluent B in 10 min, then 30-45% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give **N-ter** as a white solid after lyophilization (6.38 mg, 36%).

Characterization of N-ter_{15-GN-I}:

Peptide **N-ter_{15-GN-I}** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 51) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 52).

ESI (positive detection mode, see Figure S 51): calcd. for [M] (average): 4787.37, found: 4787.47.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, see Figure S 52): calcd. for [M+H]⁺ (average): 4788.37, found: 4788.53.

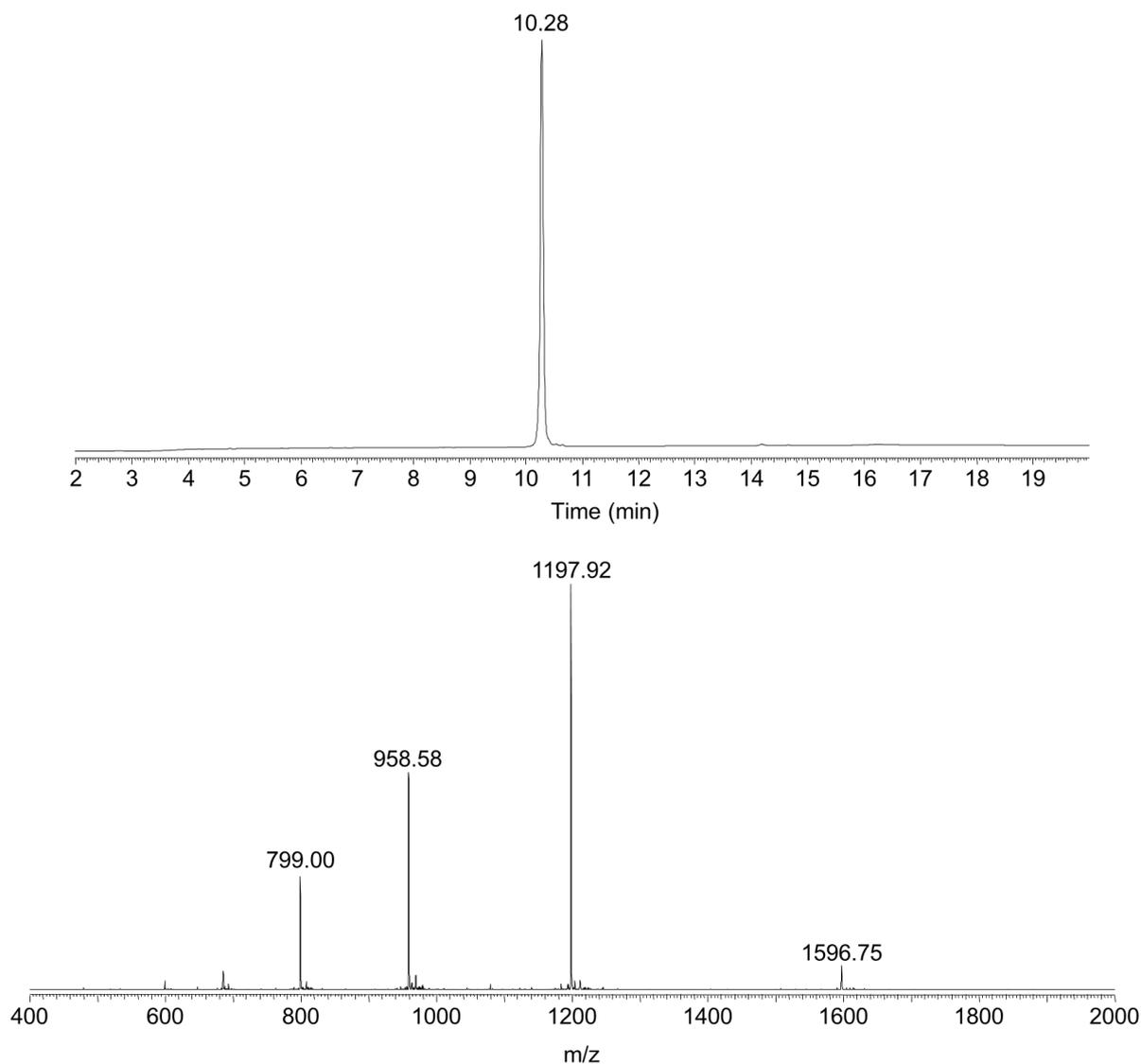


Figure S 51. UPLC-MS analysis of peptide N-ter. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1596.75 ([M+3H]³⁺), 1197.92 ([M+4H]⁴⁺), 958.58 ([M+5H]⁵⁺), 799.00 ([M+6H]⁶⁺); calcd. for [M] (average mass): 4787.37, found: 4787.47.

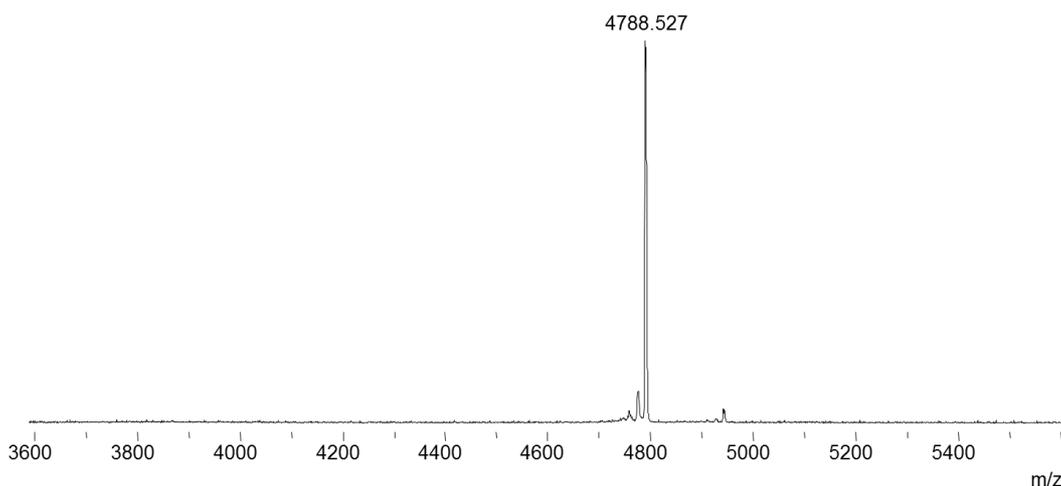


Figure S 52. MALDI-TOF analysis of peptide *N-ter*. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 4788.37, found: 4788.53.

I₂ oxydation

N-ter (2.27 mg, 0.398 μmol) was dissolved in 10 mL of AcOH/water 1/9 v/v. A solution of I₂ in DMSO ($\approx 1 \text{ mg mL}^{-1}$) was added dropwise until persistence of the yellow color of iodine in the reaction mixture. After 30 s of stirring, the peptide was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-20% eluent B in 10 min, then 20-40% eluent B in 50 min, C18XBridge column) to give **N-ter_{15-GN-f}** as a white solid after lyophilization (1.93 mg, 85%)

Oxidized peptide **N-ter-f** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 53).

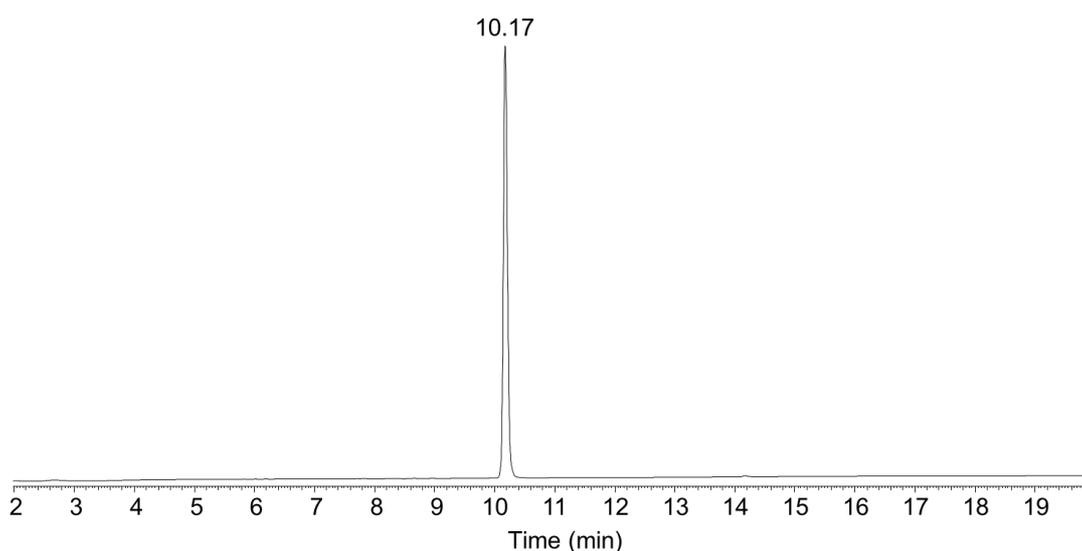


Figure S 53. UPLC-MS analysis of *N-ter-f*. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm.

4.4. Assembly of 15-GN_{Y66C}-I

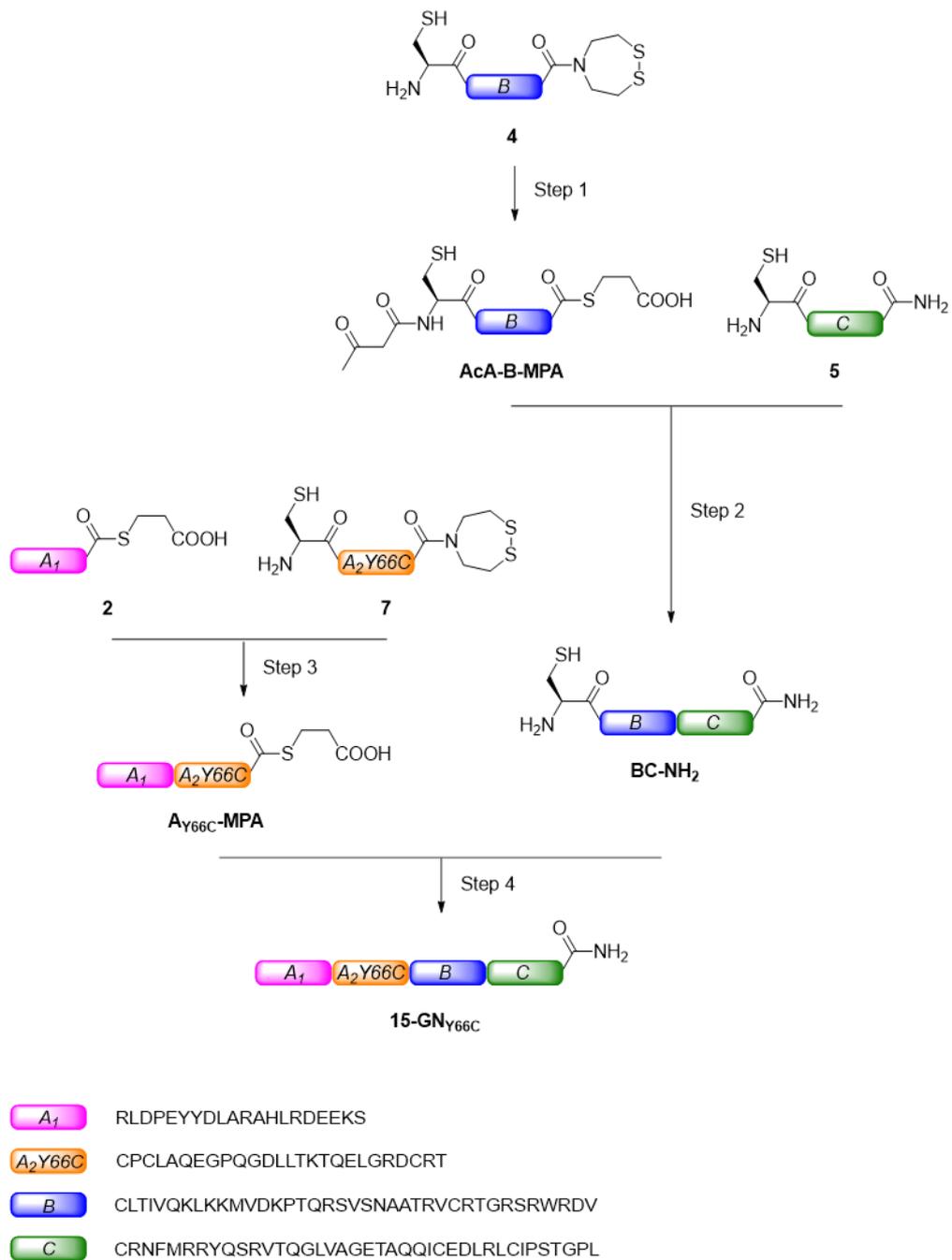


Figure S 54 General scheme for assembly of 15-GN_{Y66C}.

Step 1. Synthesis of peptide thioester **AcA-B-MPA** was performed as described above (§4.1)

Step 2. Synthesis of peptide amide **BC-NH₂** was performed as described above (§4.1)

Step 3. Synthesis of peptide amide **A_{Y66C}-MPA**

To a solution of Gn·HCl (1146 mg) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (1.2 mL) was added MPAA (16.8 mg, 50 mM). Peptide **7** (13.5 mg, 3.69 μmol, 1.2 equiv.) and peptide **2** (10.0 mg, 3.08 μmol, 1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (770 μL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 4 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), SEA peptide **A_{Y66C}-SEA^{off}** was directly converted into the corresponding MPA thioester. To perform this reaction, the mixture was first acidified to pH 3 with 6 M HCl and extracted 3 times with 2 mL of Et₂O to remove MPAA. TCEP·HCl (44.1 mg, 200 mM), and MPA (40 μL, 5% by-vol) were added to the previous mixture. The pH was adjusted to 4.00 by addition of 6 M NaOH and the reaction mixture was stirred at 37 °C for 20 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted in 5 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-22% eluent B in 10 min, then 22-42% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give **A_{Y66C}-MPA** as a white solid after lyophilization (10.4 mg, 34%).

Characterization of A_{Y66C}-MPA:

Peptide **A_{Y66C}-MPA** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 55) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 56).

ESI (positive detection mode, see Figure S 55): calcd. for [M] (average): 5352.00, found: 5352.03.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 56): calcd. for [M+H]⁺ (average): 5353.00, found: 5353.54.

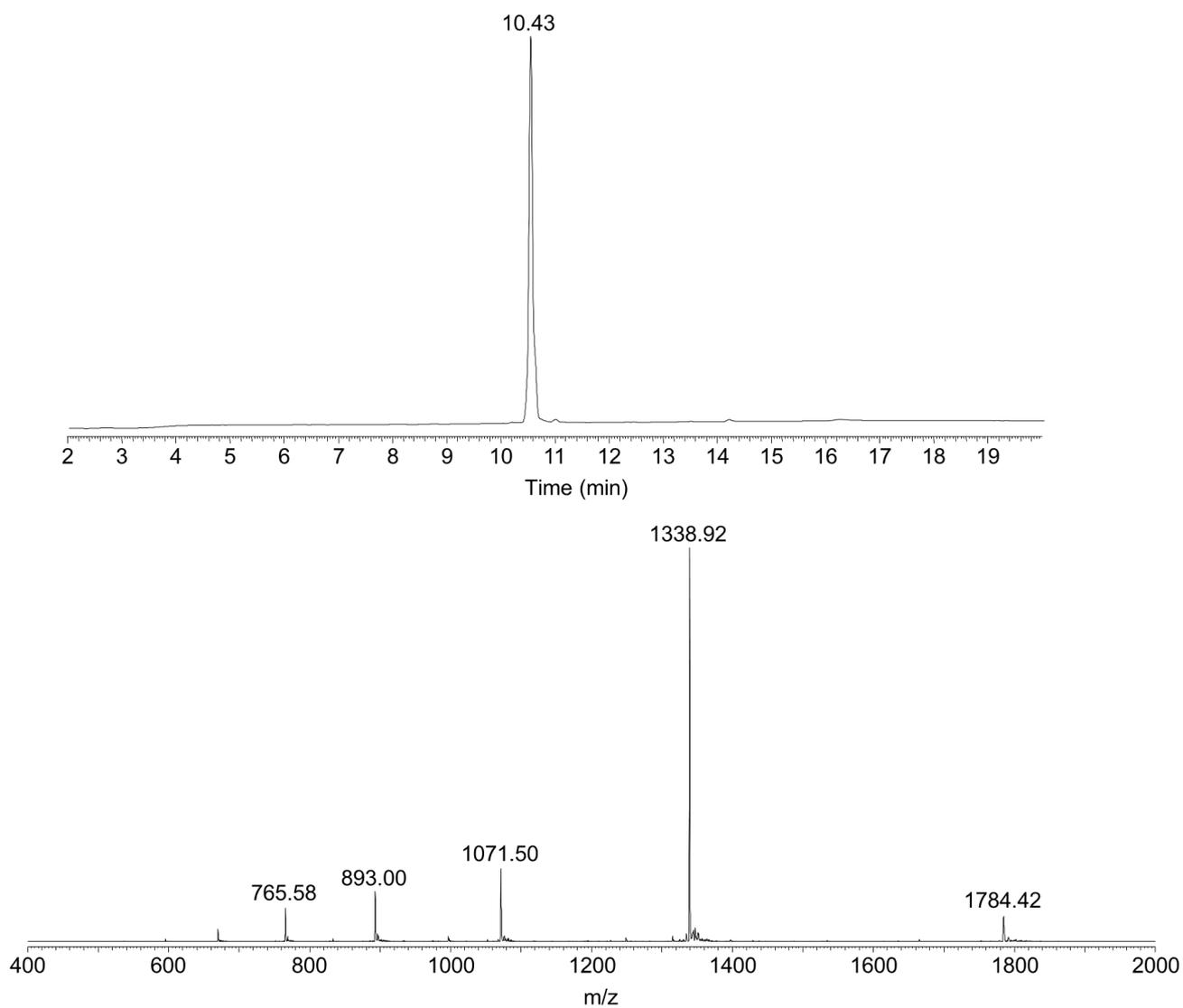


Figure S 55. UPLC-MS analysis of peptide A_{V66C} -MPA. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH_3CN . C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min^{-1} , UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1784.42 ($[M+3H]^{3+}$), 1338.92 ($[M+4H]^{4+}$), 1071.50 ($[M+5H]^{5+}$), 893.00 ($[M+6H]^{6+}$), 765.58 ($[M+7H]^{7+}$); calcd. for $[M]$ (average mass): 5352.00, found: 5352.03.

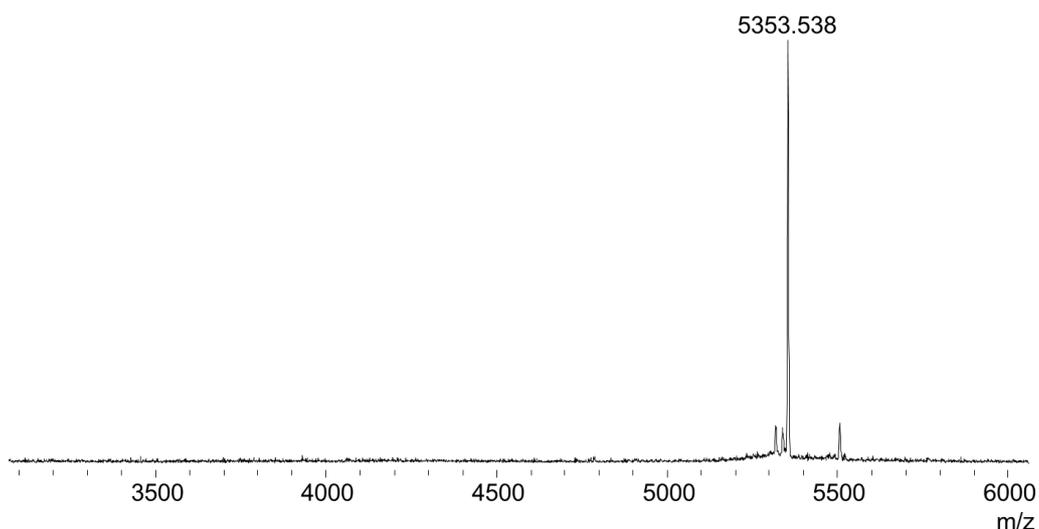


Figure S 56. MALDI-TOF analysis of peptide A_{Y66C} -MPA. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 5353.00, found: 5353.54.

Step 4. Synthesis of **15-GN_{Y66C}**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M, pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 mM) and the pH of the mixture was adjusted to 7.7 by addition of 6 M NaOH. **BC-NH₂** (4.3 mg, 0.41 μ mol, 1.0 equiv.) and **A_{Y66C}-MPA** (2.9 mg, 0.45 μ mol, 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.10 mL). The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), TCEP-HCl (6.1 mg, 21 μ mol) was added to the reaction medium to destroy MPAA adducts. The resulting mixture was diluted in 3.0 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-39% eluent B in 10 min, then 39-59% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give **15-GN_{Y66C}** as a white solid after lyophilization (3.22 mg, 47%).

Characterization of **15-GN_{Y66C}**:

Peptide **15-GN_{Y66C}** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 57) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 58).

ESI (positive detection mode, see Figure S 57): calcd. for $[M]$ (average): 14028.18, found: 14029.04.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 58): calcd. for $[M+H]^+$ (average): 14029.18, found: 14029.09.

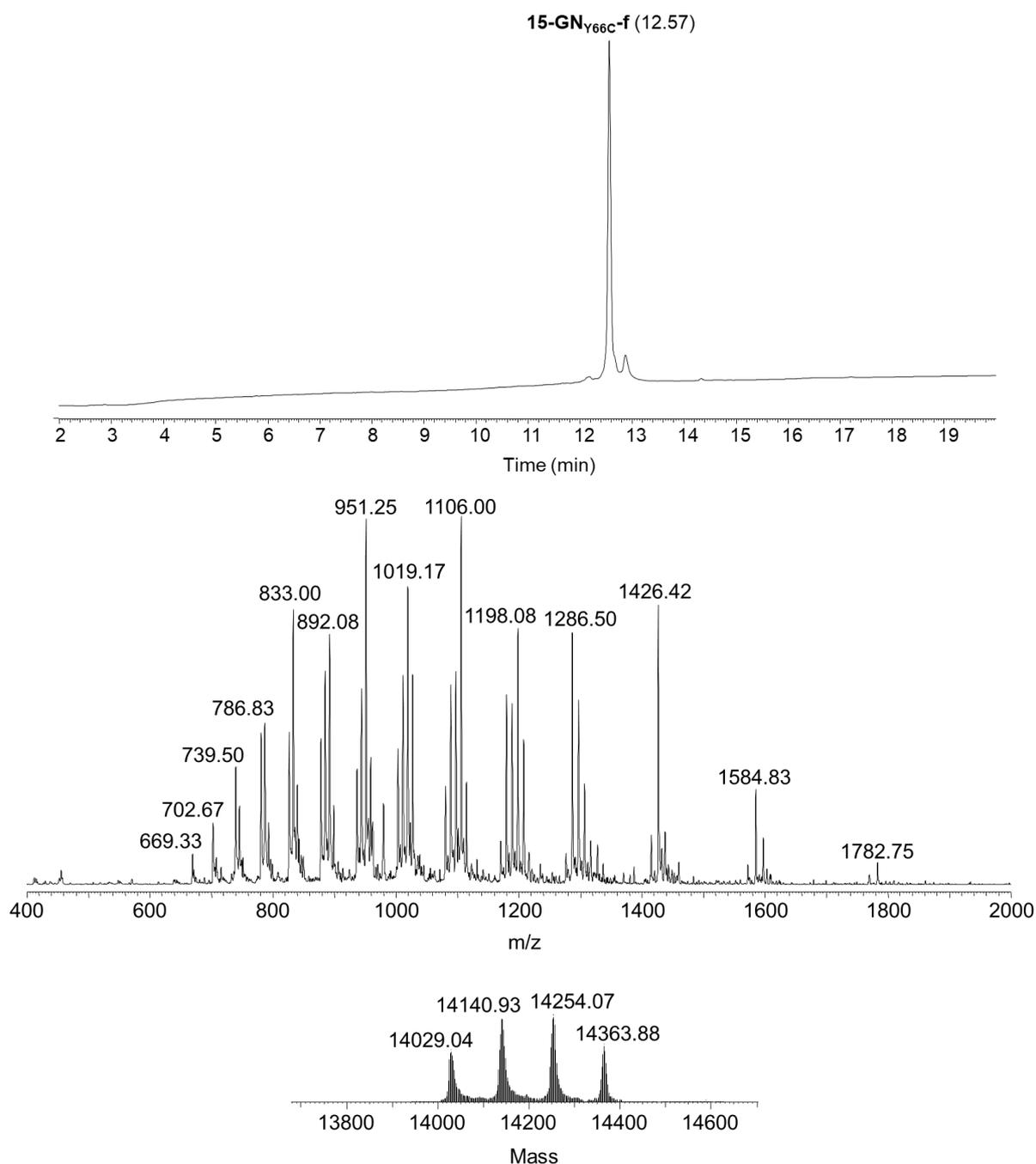


Figure S 57. UPLC-MS analysis of peptide 15-GN_{Y66C}. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z calcd. for [M] (average mass): 14028.18, found:14029.04 (14140.93 [M+M_{TFA}], 14254.07 [M+2M_{TFA}], 14363.88 [M+3M_{TFA}]).

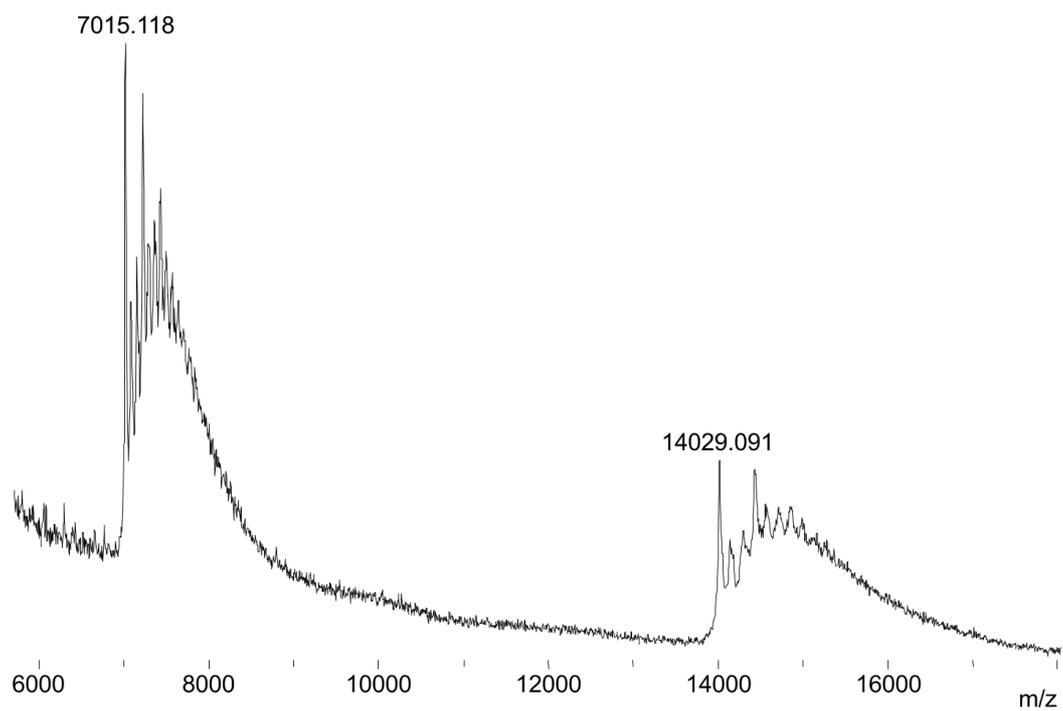


Figure S 58. MALDI-TOF analysis of peptide 15-GN_{Y66C}. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 14029.18, found: 14029.09.

4.5. Assembly of 15-GN_{C138A}-I

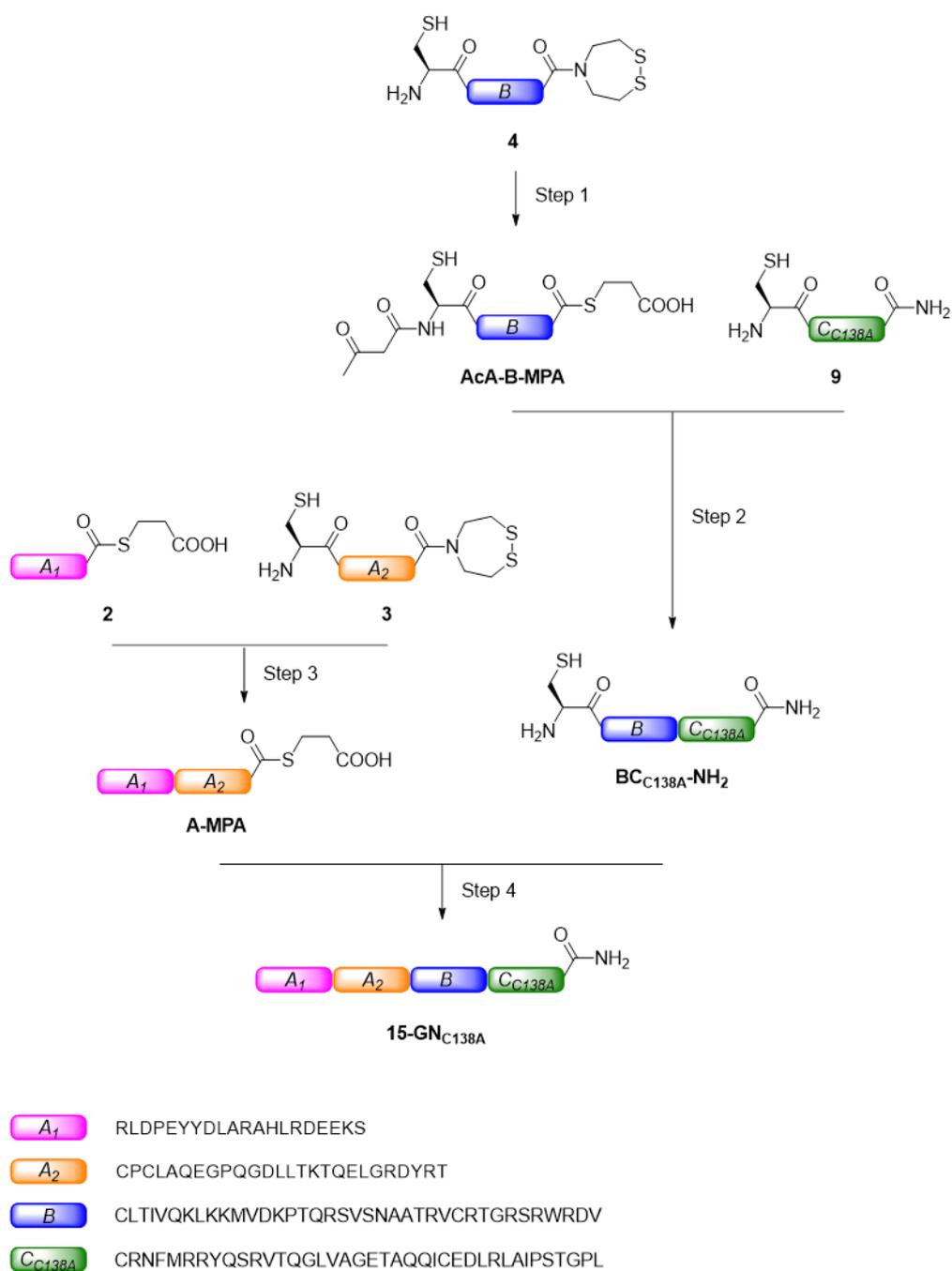


Figure S 59. General scheme for assembly of 15-GN_{C138A}.

Step 1. Synthesis of peptide thioester **AcA-B-MPA** as described above (§4.1)

Step 2. Synthesis of peptide amide **BC_{C138A}-NH₂**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 mM) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. **AcA-B-MPA** (7.4 mg, 1.3 μmol, 1.0 equiv.) and peptide **11** (7.3 mg, 1.4 μmol, 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.26 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), the AcA protecting group of **AcA-BC-NH₂** was removed by reaction with NH₂OH. To perform this deprotection, the reaction mixture was first acidified to pH 3.0 with 6 M HCl and extracted 3 times with 1.0 mL of Et₂O to remove MPAA. The mixture is then treated with a 0.5 M solution of NH₂OH·HCl in H₂O (52 μL, 26 μmol, 20 equiv.) and the pH was adjusted to 5.5. After 4 h stirring at 37 °C, pH was adjusted to 3.0 with 0.25 g mL⁻¹ aqueous solution of TCEP·HCl. The crude was further diluted in 4.0 mL of water containing 0.25% TFA and purified by HPLC (eluent A = water containing 0.25% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.25% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-40% eluent B in 10 min, then 40-60% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to afford **BC_{C138A}-NH₂** as a white solid after lyophilization (6.39 mg, 47%).

Characterization of BC_{C138A}-NH₂:

Peptide **BC_{C138A}-NH₂** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 60) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 61).

ESI (positive detection mode, see Figure S 60): calcd. for [M] (average): 8749.25, found: 8749.40.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 61): calcd. for [M+H]⁺ (average): 8750.25, found: 8750.63.

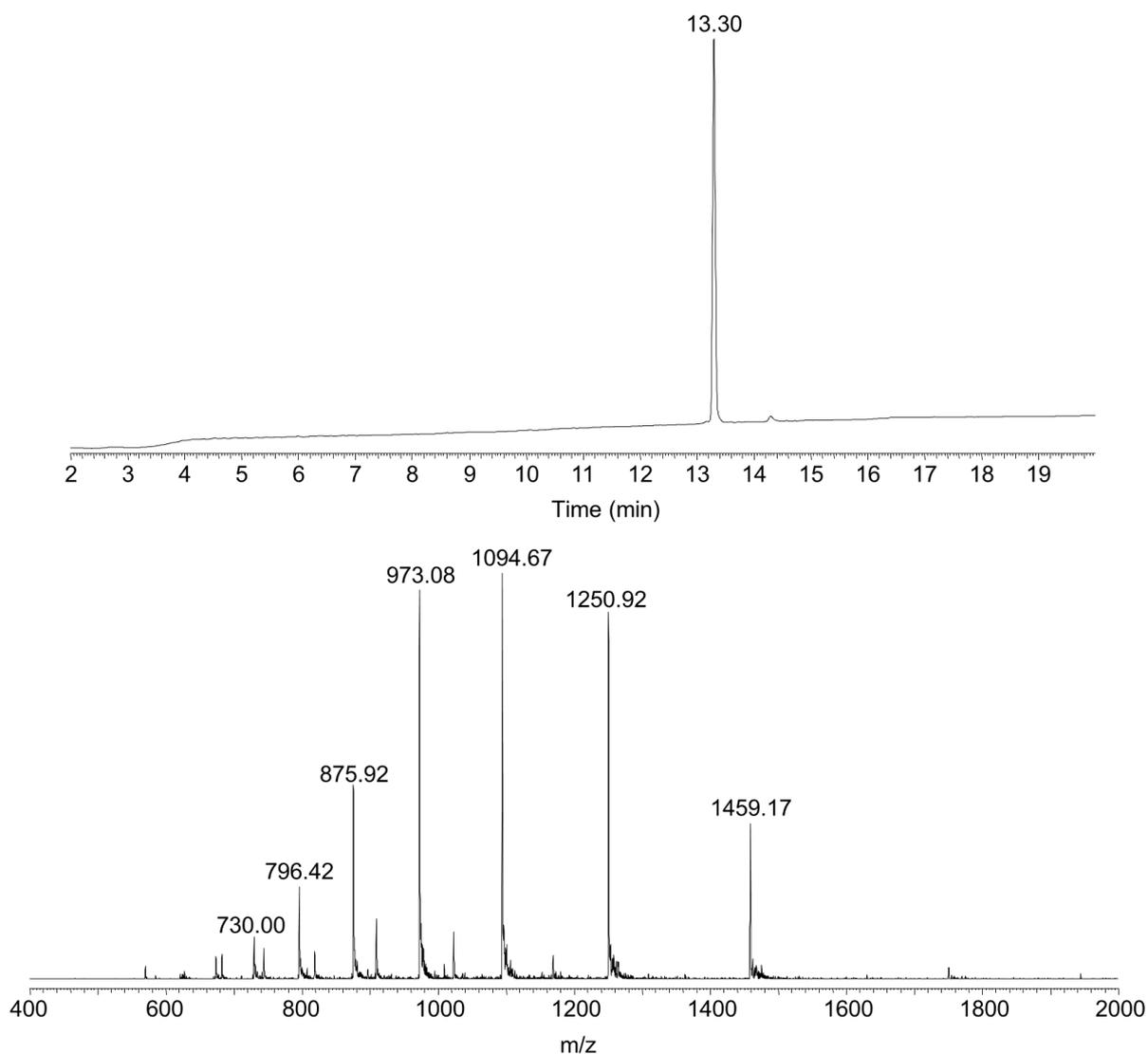


Figure S 60. UPLC-MS analysis of peptide $BC_{C138A}-NH_2$. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH_3CN . C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min^{-1} , UV detection at 215 nm. MS trace (recorded with heat temperature set at 450 °C, spray voltage at 2.8 kV, capillary temperature at 450 °C, capillary voltage at 10 V, tube lens voltage at 75 V): m/z 1459.17 ($[M+6H]^{6+}$), 1250.92 ($[M+7H]^{7+}$), 1094.67 ($[M+8H]^{8+}$), 973.08 ($[M+9H]^{9+}$), 875.92 ($[M+10H]^{10+}$), 796.42 ($[M+11H]^{11+}$), 730.00 ($[M+12H]^{12+}$); calcd. for $[M]$ (average mass): 8749.25, found: 8749.40.

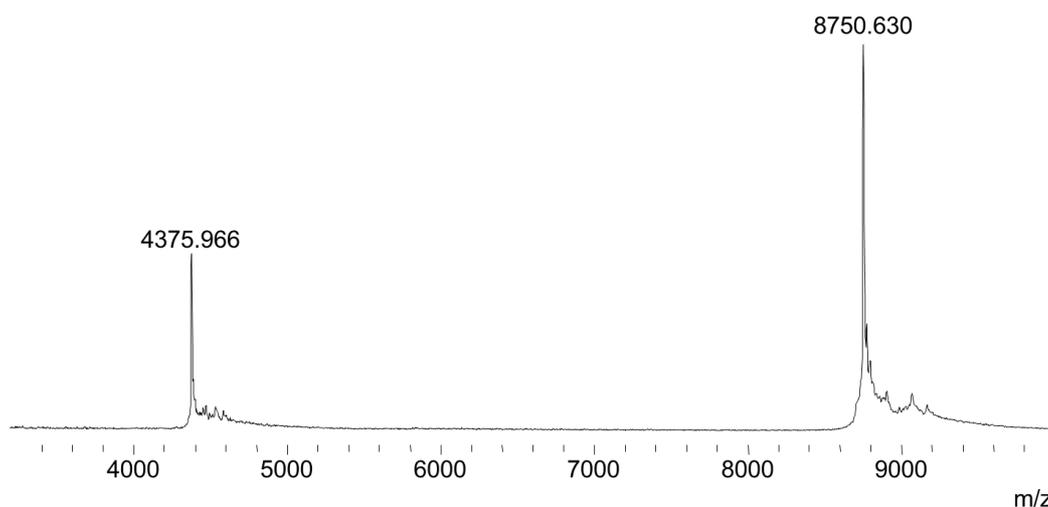


Figure S 61. MALDI-TOF analysis of peptide $BC_{C138A}-NH_2$. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 8750.25, found: 8750.63.

Step 3. Synthesis of peptide thioester **A-MPA** as described above (§4.1)

Step 4. Synthesis of **15-GN_{C138A}**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M, pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 mM) and the pH of the mixture was adjusted to 7.7 by addition of 6 M NaOH. **BC_{C138A}-NH₂** (6.4 mg, 0.61 μ mol, 1.0 equiv.) and peptide thioester **A-MPA** (4.2 mg, 6.7 μ mol, 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.15 μ L). The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), TCEP·HCl (8.8 mg, 31 μ mol) was added to the reaction medium to destroy MPAA adducts. The resulting mixture was diluted in 3.0 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-28% eluent B in 10 min, then 28-43% eluent B in 55 min, C18XBridge column) to give **15-GN_{C138A}** as a white solid after lyophilization (6.16 mg, 60%).

Characterization of 15-GN_{C138A}:

Peptide **15-GN_{C138A}** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 62) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 63).

ESI (positive detection mode, see Figure S 62): m/z calcd. For [M] (average): 14056.15, found: 14056.72.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 63): calcd. for $[M+H]^+$ (average): 14057.15, found: 14058.17.

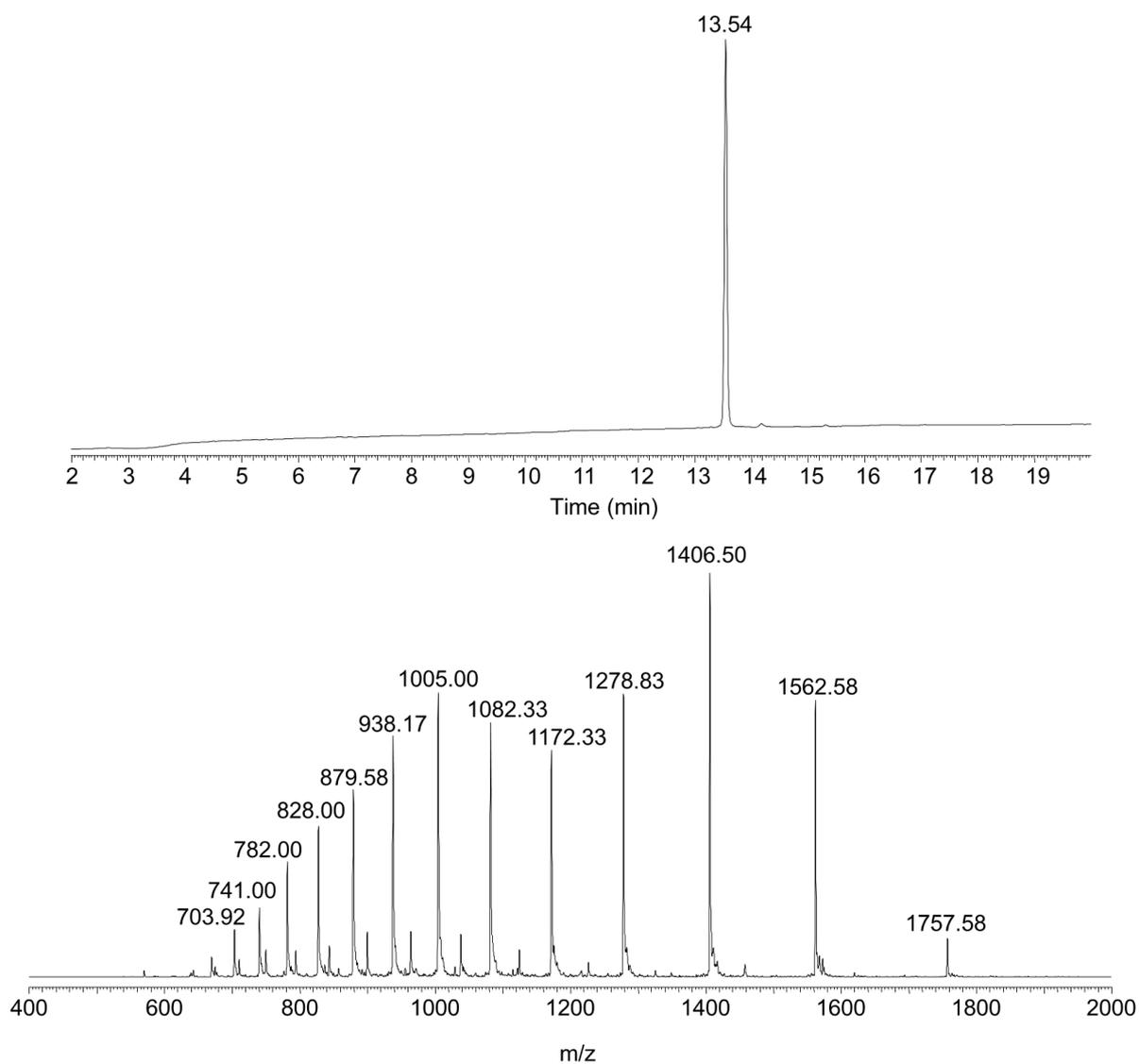


Figure S 62. UPLC-MS analysis of peptide 15-GN_{C138A}. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace (recorded with heat temperature set at 450 °C, spray voltage at 2.8 kV, capillary temperature at 450 °C, capillary voltage at 10 V, tube lens voltage at 75 V): m/z 1757.58 ([M+8H]⁸⁺), 1562.58 ([M+9H]⁹⁺), 1406.50 ([M+10H]¹⁰⁺), 1278.83 ([M+11H]¹¹⁺), 1172.33 ([M+12H]¹²⁺), 1082.33 ([M+13H]¹³⁺), 1005.00 ([M+14H]¹⁴⁺), 938.17 ([M+15H]¹⁵⁺), 879.58 ([M+16H]¹⁶⁺), 828.00 ([M+17H]¹⁷⁺), 782.00 ([M+18H]¹⁸⁺), 741.00 ([M+19H]¹⁹⁺), 703.92 ([M+20H]²⁰⁺); calcd. for [M] (average mass): 14056.15, found: 14056.72.

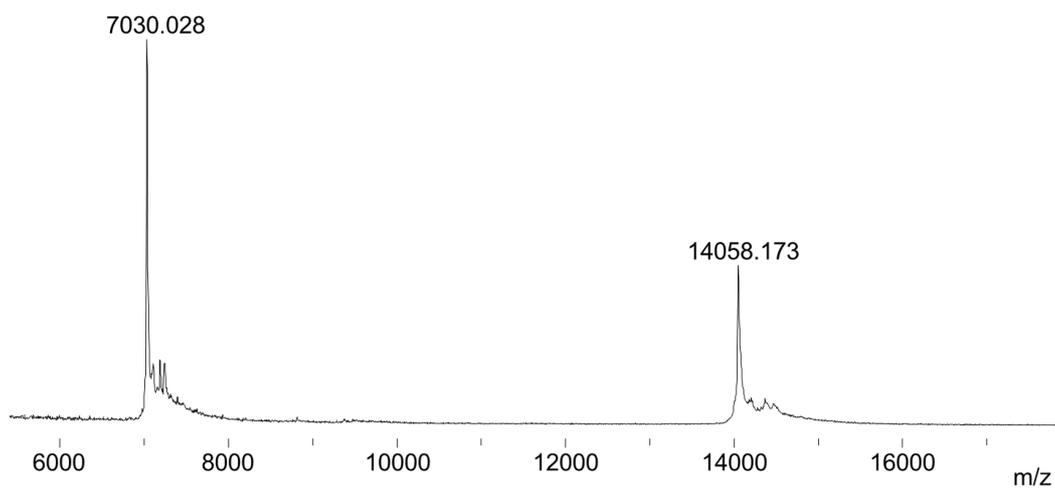


Figure S 63. MALDI-TOF analysis of peptide 15-GN_{C138A}. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 14057.15, found: 14058.17.

4.6. Assembly of 15-GN_{APA}-I

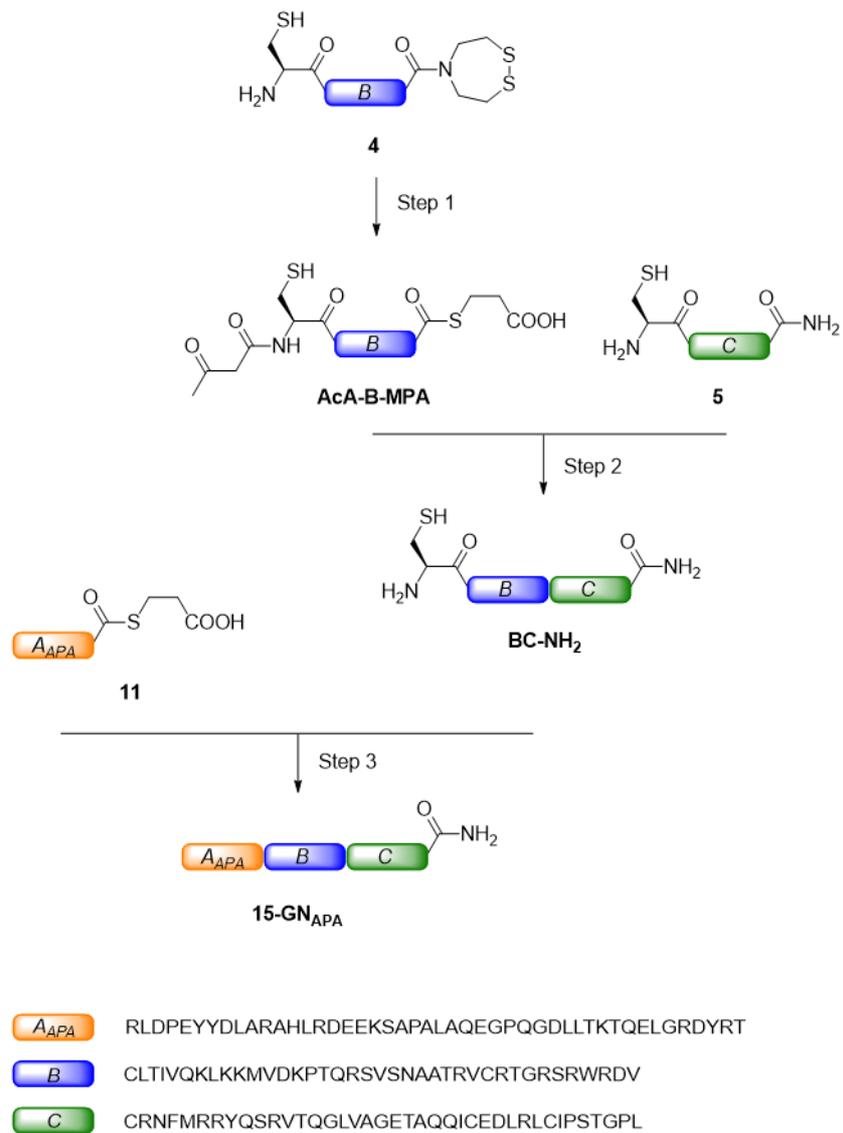


Figure S 64. General scheme for assembly of 15-GN_{APA}.

Step 1. Synthesis of peptide thioester **AcA-B-MPA** as described above (§4.1)

Step 2. Synthesis of peptide amide **BC-NH₂** as described above (§4.1)

Step 3. Synthesis of **15-GN_{APA}**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 mM) and the pH of the mixture was adjusted to 7.7 by addition of 6 M NaOH. **BC-NH₂** (4.9 mg, 0.47 μmol, 1.0 equiv.) and **11** (3.2 mg, 0.51 μmol, 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.12 μL). The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), TCEP·HCl (6.7 mg, 23 μmol) was added to the reaction medium to destroy MPAA adducts. The resulting mixture was diluted in 3.0 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-42% eluent B in 10 min, then 42-62% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give **15-GN_{APA}** as a white solid after lyophilization (3.08 mg, 40%).

Characterization of 15-GN_{APA}:

Peptide **15-GN_{APA}** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 65) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 66).

ESI (positive detection mode, see Figure S 65): calcd. for [M] (average): 14024.01, found: 14024.54.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 66): calcd. for [M+H]⁺ (average): 14025.01, found: 14025.56.

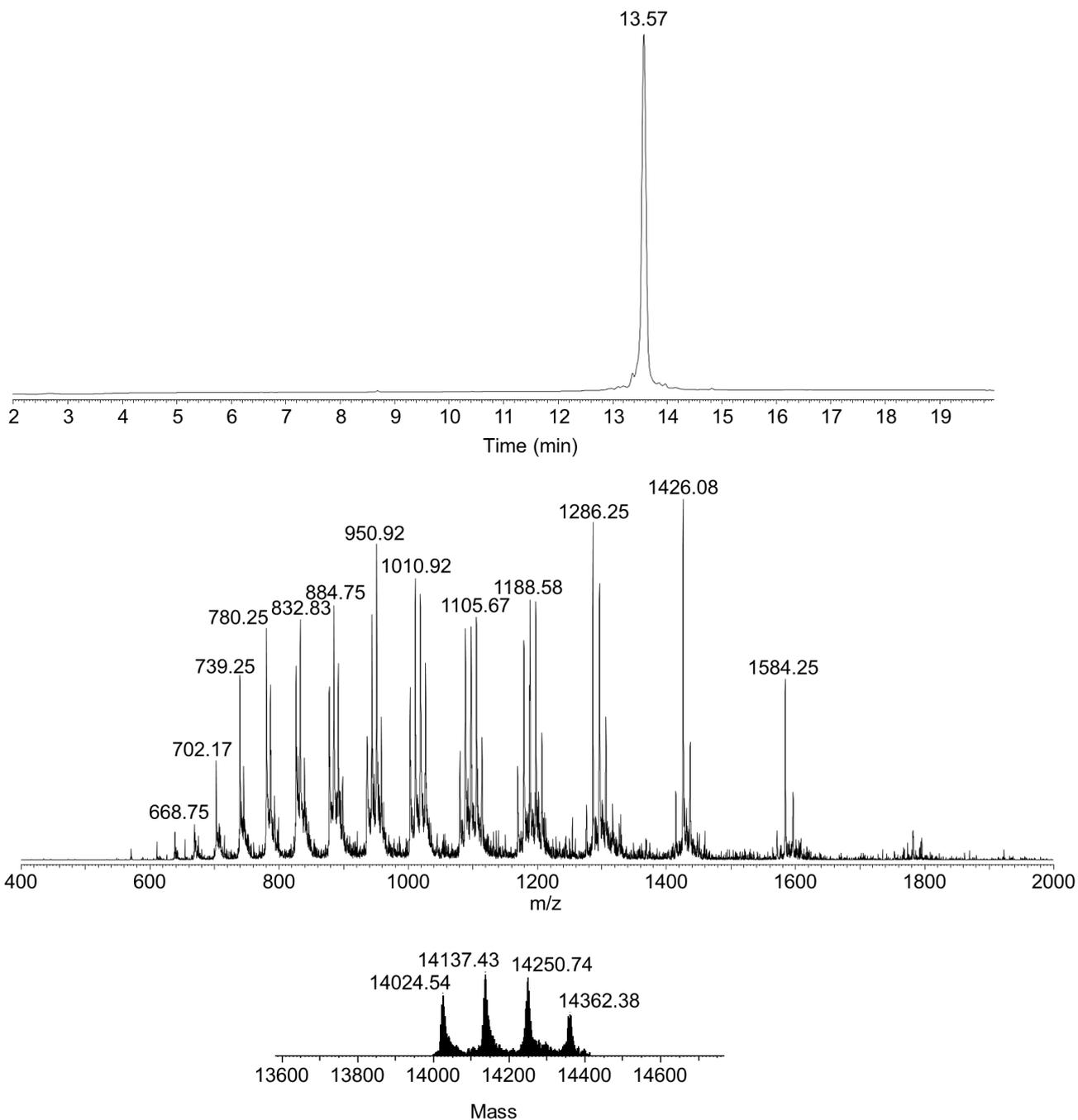


Figure S 65. UPLC-MS analysis of peptide 15-GN_{APA}. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M] (average mass): 14024.01, found: 14024.54 (14137.43 [M+M_{TFA}], 14250.74 [M+2M_{TFA}], 14362.38 [M+3M_{TFA}]).

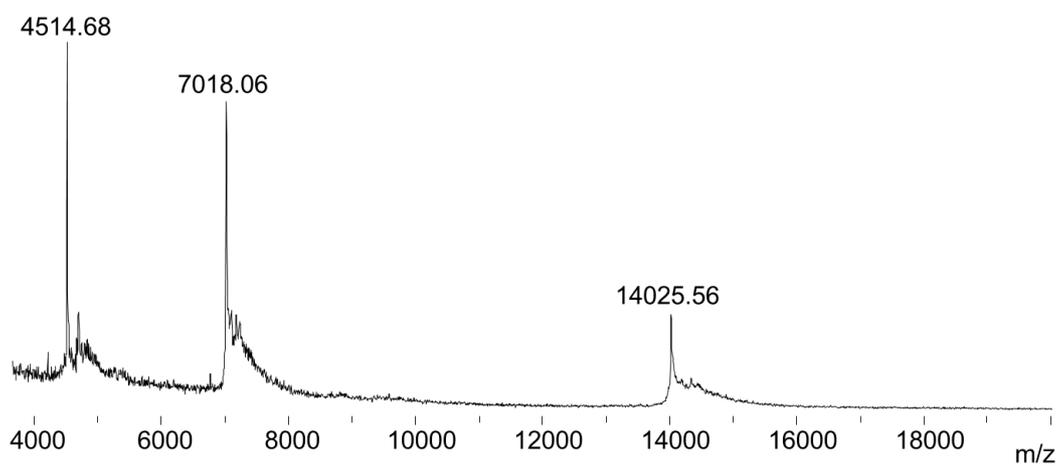


Figure S 66. MALDI-TOF analysis of peptide 15-GN_{APA}. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 14025.01, found: 14025.56.

4.7. Assembly of 15-GN_{biot}-I

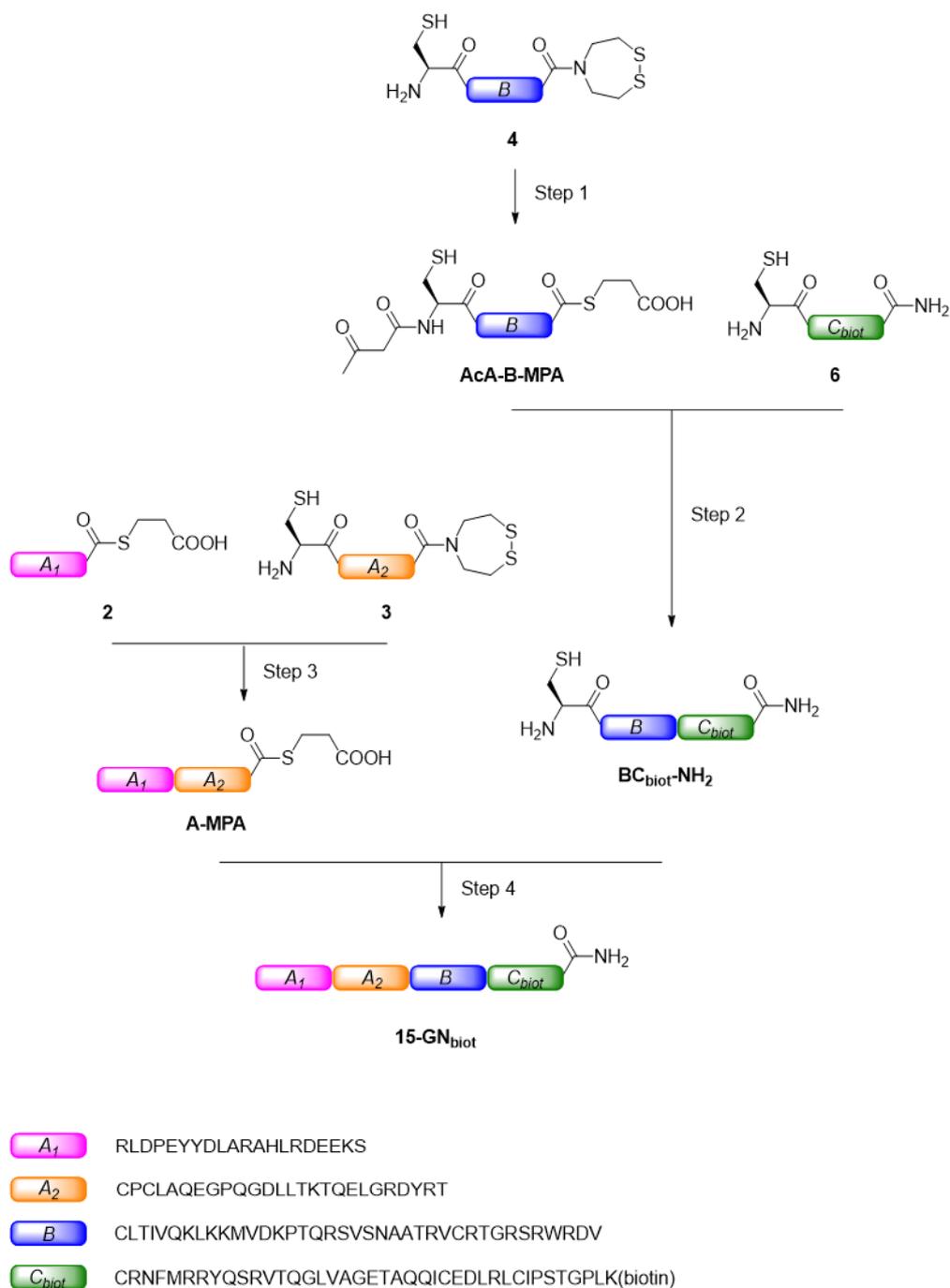


Figure S 67. General scheme for the assembly of 15-GN_{biot}.

Step 1. Synthesis of peptide thioester **AcA-B-MPA** was performed as described above (§4.1)

Step 2. Synthesis of peptide amide **BC_{biot}-NH₂**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 M) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. **AcA-B-MPA** (5.6 mg, 0.98 μmol , 1.0 equiv.) and peptide **5** (5.6 mg, 1.1 μmol , 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.20 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), the AcA protecting group of **AcA-BC_{biot}-NH₂** was removed by reaction with NH₂OH. To perform this deprotection, the reaction mixture was first acidified to pH 3.0 with 6 M HCl and extracted 3 times with 1.0 mL of Et₂O to remove MPAA. The mixture was then treated with a 0.5 M solution of NH₂OH·HCl in H₂O (40 μL , 20 μmol , 20 equiv.) and the pH was adjusted to 5.5. After 4 h stirring at 37 °C, pH was adjusted to 3.0 with 0.25 g mL⁻¹ aqueous solution of TCEP·HCl. The crude was then diluted in 4.0 mL of water containing 0.25% TFA and purified by HPLC (eluent A = water containing 0.25% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.25% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-35% eluent B in 10 min, then 35-55% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to afford **BC_{biot}-NH₂** as a white solid after lyophilization (3.59 mg, 34%).

Characterization of BC_{biot}-NH₂:

Peptide **BC_{biot}-NH₂** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 68) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 69).

ESI (positive detection mode, see Figure S 68): calcd. for [M] (average): 9135.78, found: 9135.32.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 69): calcd. for [M+H]⁺ (average): 9136.78, found: 9136.92.

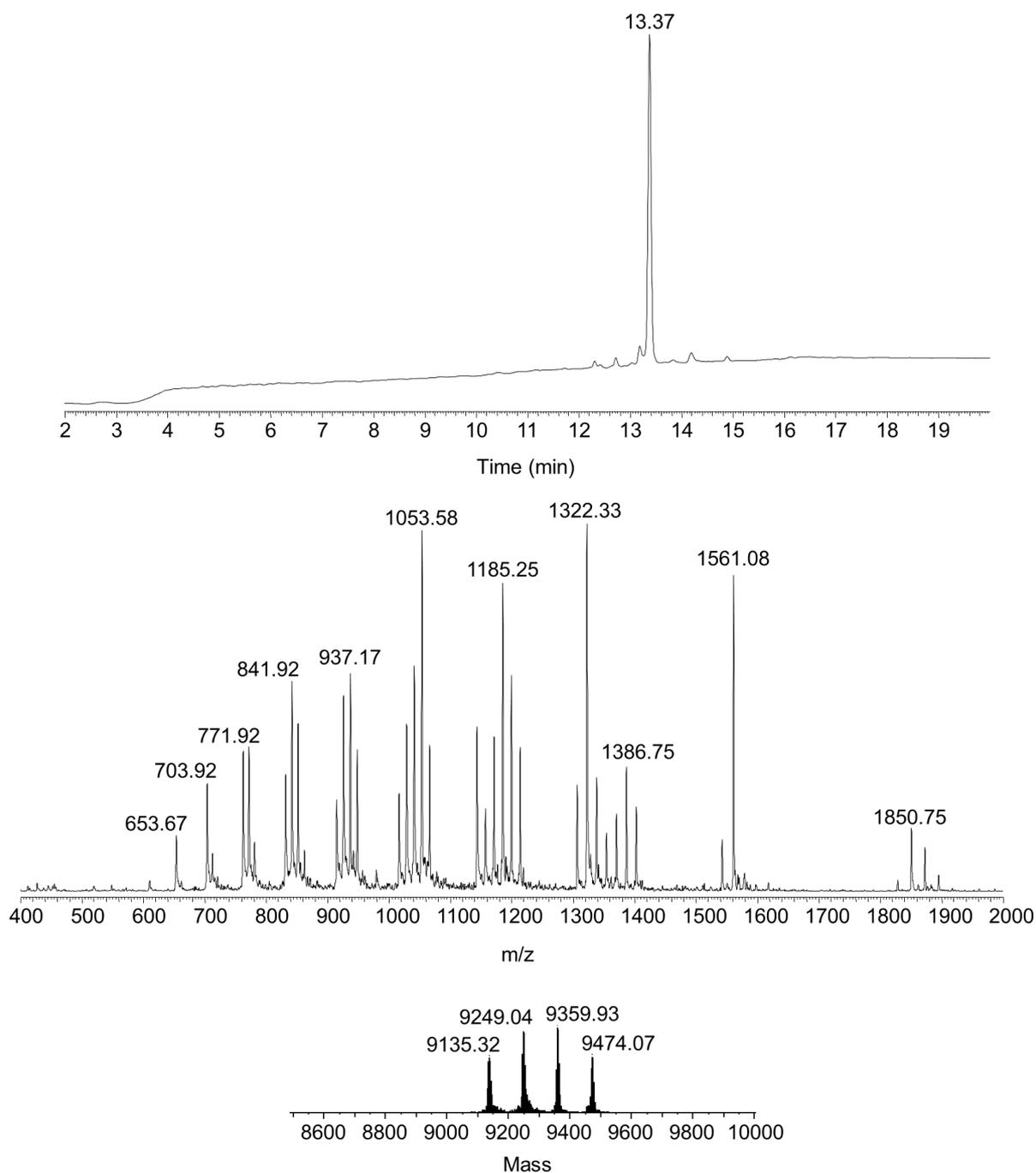


Figure S 68. UPLC-MS analysis of peptide $BC_{biot}-NH_2$. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH_3CN . C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min^{-1} , UV detection at 215 nm. MS trace: m/z calcd. for $[M]$ (average mass): 9135.78, found: 9135.32 (9249.04 $[M+M_{TFA}]$, 9359.93 $[M+2M_{TFA}]$, 9474.07 $[M+3M_{TFA}]$).

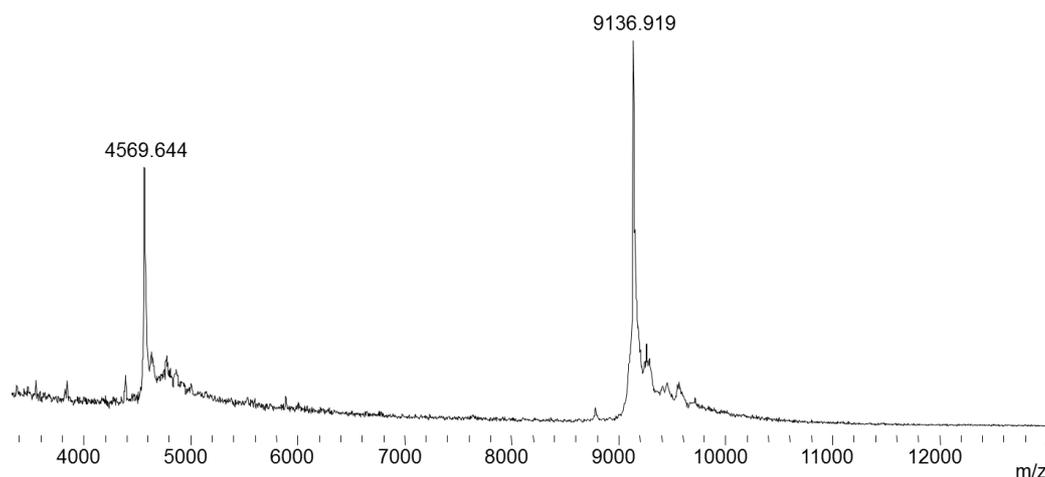


Figure S 69. MALDI-TOF analysis of peptide $BC_{\text{biot}}\text{-NH}_2$. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[M+H]^+$ (average): 9136.78, found: 9136.92.

Step 3. Synthesis of peptide thioester **A-MPA** as described above (§4.1)

Step 4. Synthesis of **15-GN_{biot}**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 M) and the pH of the mixture was adjusted to 7.7 by addition of 6 M NaOH. $BC_{\text{biot}}\text{-NH}_2$ (3.6 mg, 0.33 μmol , 1.0 equiv.) and peptide thioester **A-MPA** (1.8 mg, 0.28 μmol , 1.1 equiv.) were then successively dissolved in the MPAA solution (69 μL). The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), TCEP·HCl (4.0 mg, 14 μmol) was added to the reaction medium to reduce mixed disulfides. The resulting mixture was diluted in 3.0 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-40% eluent B in 15 min, then 40-55% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give **15-GN_{biot}** as a white solid after lyophilization (2.71 mg, 48%).

Characterization of 15-GN_{biot}:

Peptide **15-GN_{biot}** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 70) and MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 71).

ESI (positive detection mode, see Figure S 70): calcd. for $[M]$ (average): 14442.68, found: 14443.21.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, Figure S 71): calcd. for $[M+H]^+$ (average): 14443.68, found: 14442.87.

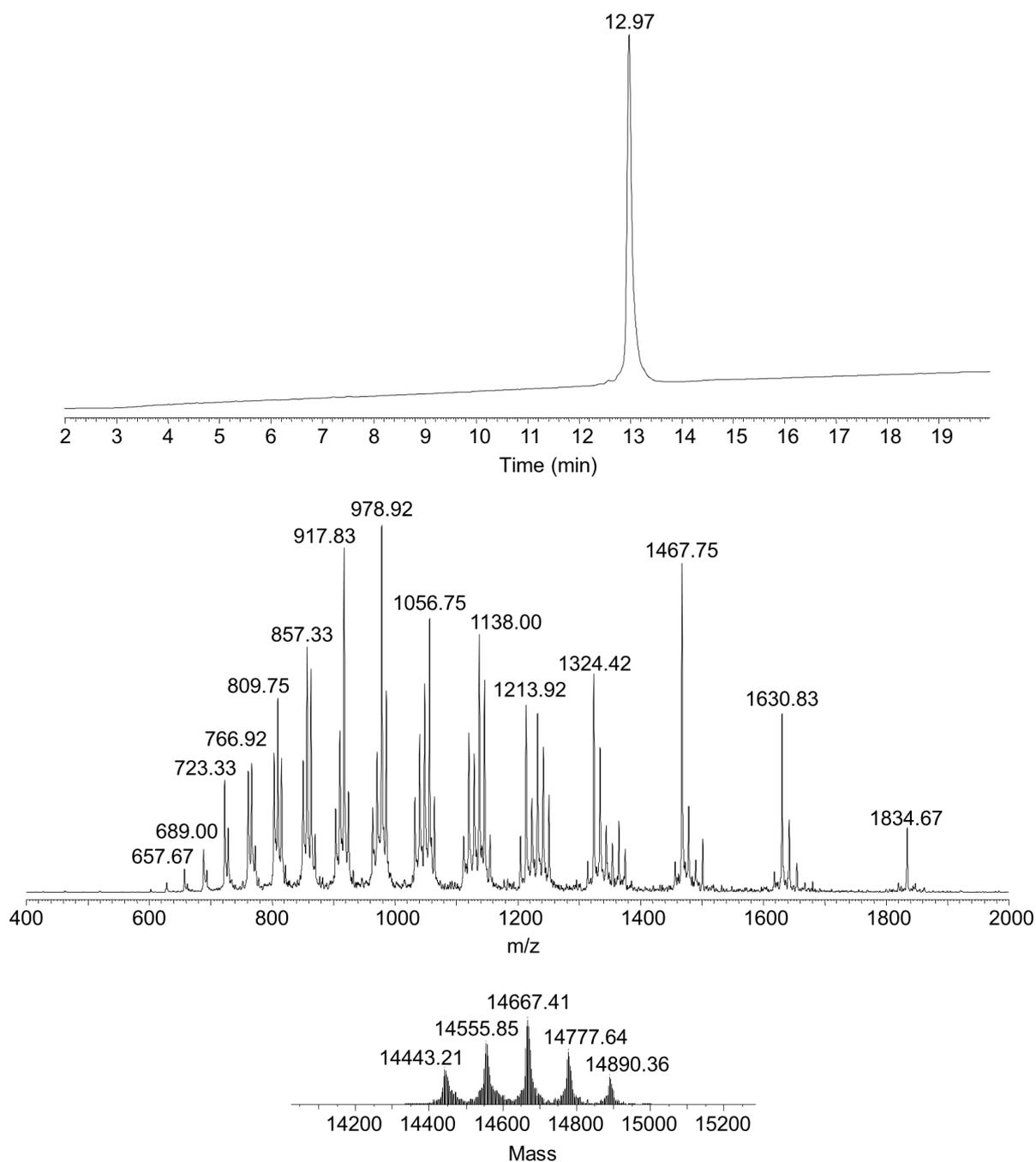


Figure S 70. UPLC-MS analysis of peptide 15-GN_{biot}. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z calcd. for [M] (average mass): 14442.68, found: 14443.21 (14555.85 [M+M_{TFA}], 14667.41 [M+2M_{TFA}], 14777.64 [M+3M_{TFA}], 14890.36 [M+4M_{TFA}]).

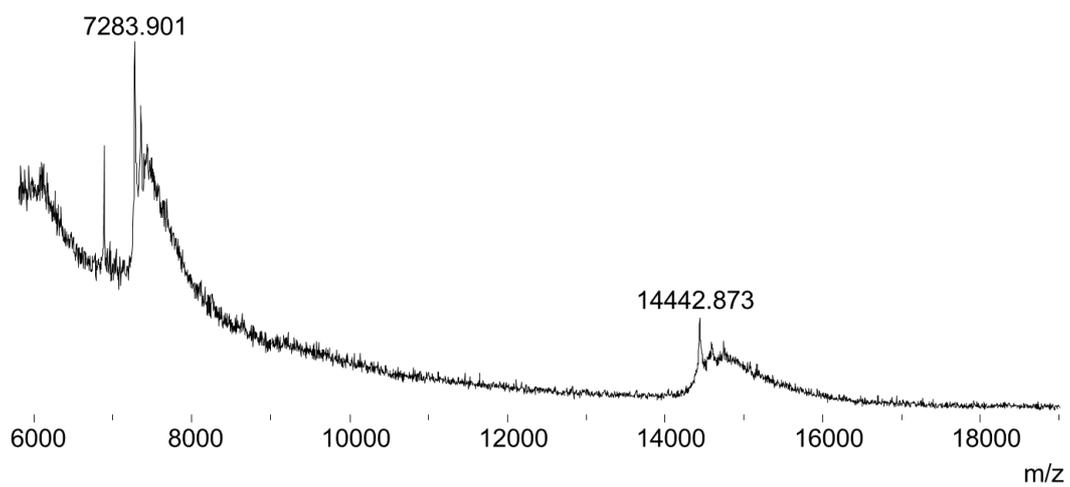


Figure S 71. MALDI-TOF analysis of peptide 15-GN_{biot}. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 14443.68, found: 14442.87.

5. Folding and characterization of granulysin proteins

5.1. Folding and characterization of **15-GN-f**

Folding

The linear polypeptide **15-GN-l** (2.97 mg, 0.177 μmol) was dissolved in PBS buffer (10 mM phosphate, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl pH 7.4) containing 10 % by vol of glycerol, 2 M of Gn·HCl, 1 mM reduced glutathione, 0.2 mM oxidized glutathione (1 mL/mg of peptide). The mixture was let 1 h at 0 °C and then 96 h at 20 °C.

The protein was dialysed twice (respectively 2 h and 24 h) at 20 °C against 500 mL of PBS containing 10 % in vol of glycerol and 10 mM oxidized glutathione and then twice (respectively 2 h and 24 h) at 20 °C against 500 mL of PBS containing 10 % in vol of glycerol.

Finally, the folded protein was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-70% eluent B in 10 min, to give **15-GN-f** as a white solid after lyophilization. The solid was dissolved in 297 μL of water and the concentration of the folded proteins was determined using UV quantification at 280 nm (428.6 μM , 0.127 μmol , 72% yield)

Characterization of 15-GN-f

Folded protein **15-GN-f** was analyzed by UPLC (Figure S 72).

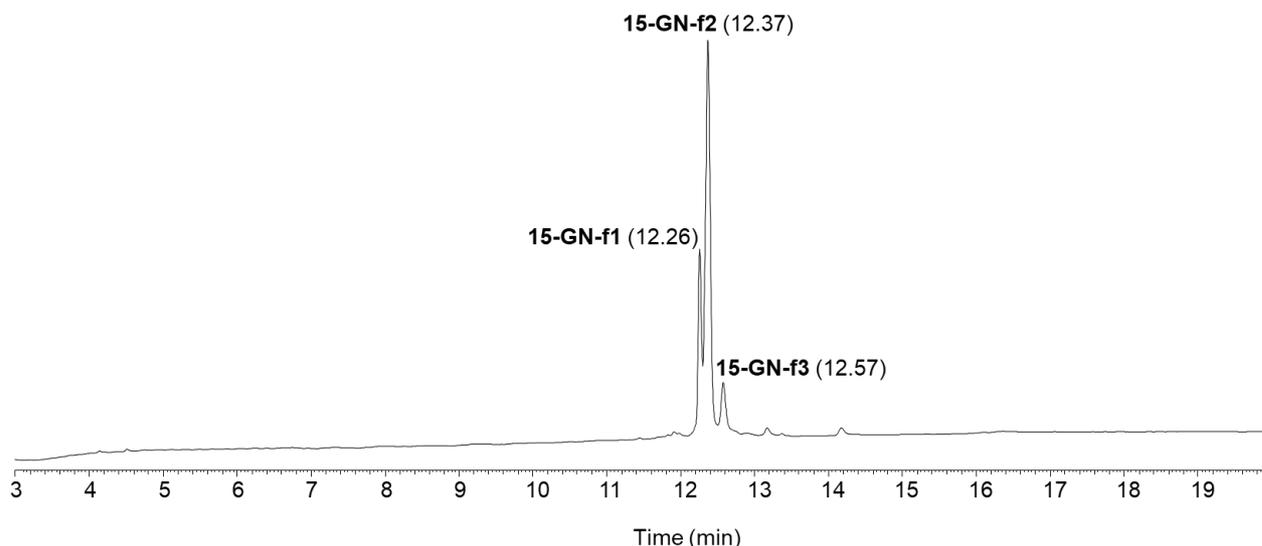


Figure S 72. UPLC analysis of 15-GN-f. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm.

Fractions corresponding to each peak were collected and submitted to MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 73).

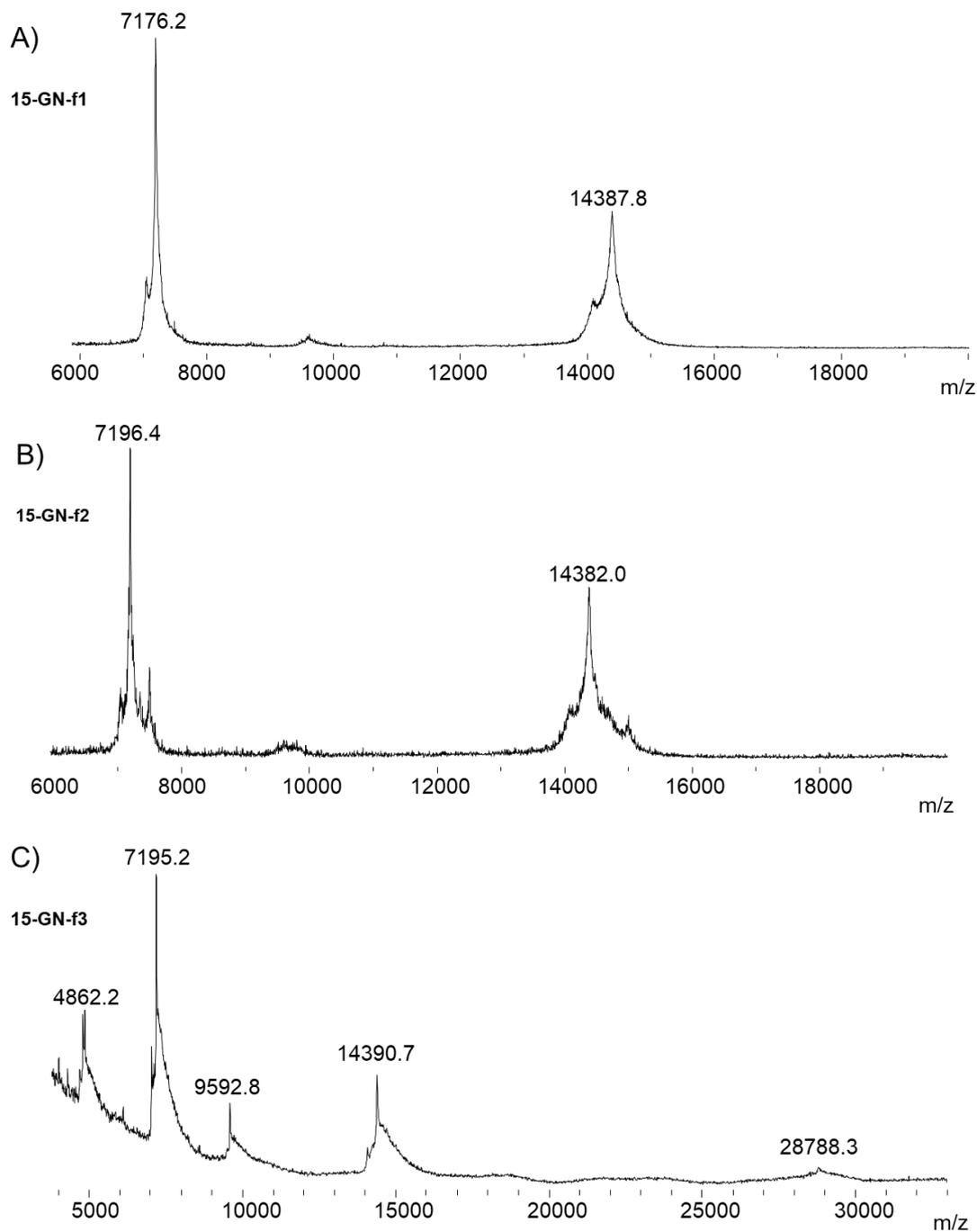


Figure S 73. MALDI-TOF analysis of peptide 15-GN-f1-3. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, A) calcd. for $[M+\text{glutathione}+\text{H}]^+$ (average): 14388.5, found: 14387.8, B) calcd. for $[M+\text{glutathione}+\text{H}]^+$ (average): 14388.5, found: 14382.0, C) calcd. for $[2M+2\text{glutathione}+\text{H}]^+$ (average): 28777.1, found: 28788.3.

Disulfide bridge pattern of 15-GN-f

The disulfide bridge pattern of **15-GN-f1** (rt = 12.26 min, Figure S 72), **15-GN-f2** (rt = 12.37 min, Figure S 72) as deduced from proteomic experiments is shown in Figure S 74. The disulfide bridge pattern shown for the dimer form **15-GN-f3** (rt = 12.57 min, Figure S 72) is hypothetical.

Experimental determination of disulfide bridge patterns was achieved by separating the different peaks observed in Figure S 72 by HPLC, by performing the enzymatic digestion of **15-GN-f1-2** and by identifying the resulting fragments by mass spectrometry using non-reducing conditions. Fragments obtained by digestion with trypsin (Figure S 75) permitted the direct assignment of Cys69-Cys132 and Cys96-Cys107 disulfide bonds while digestion with pepsin (

Figure S 76) was required to establish the formation of Cys43-Cys45 and other disulfide bonds.

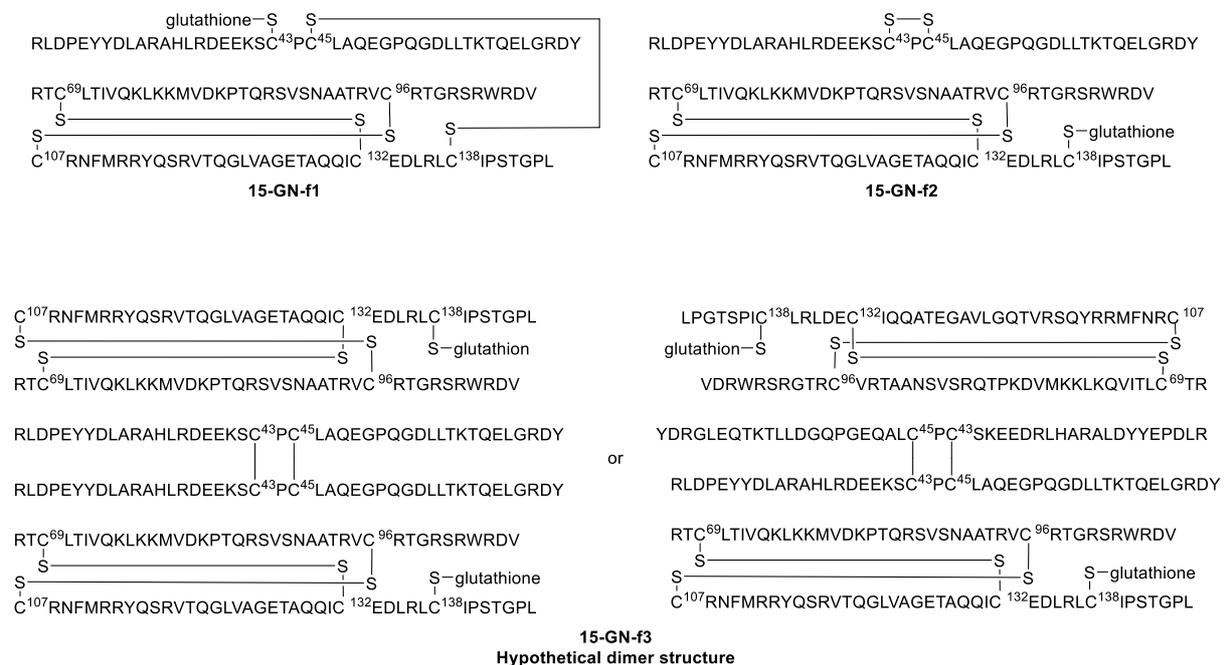
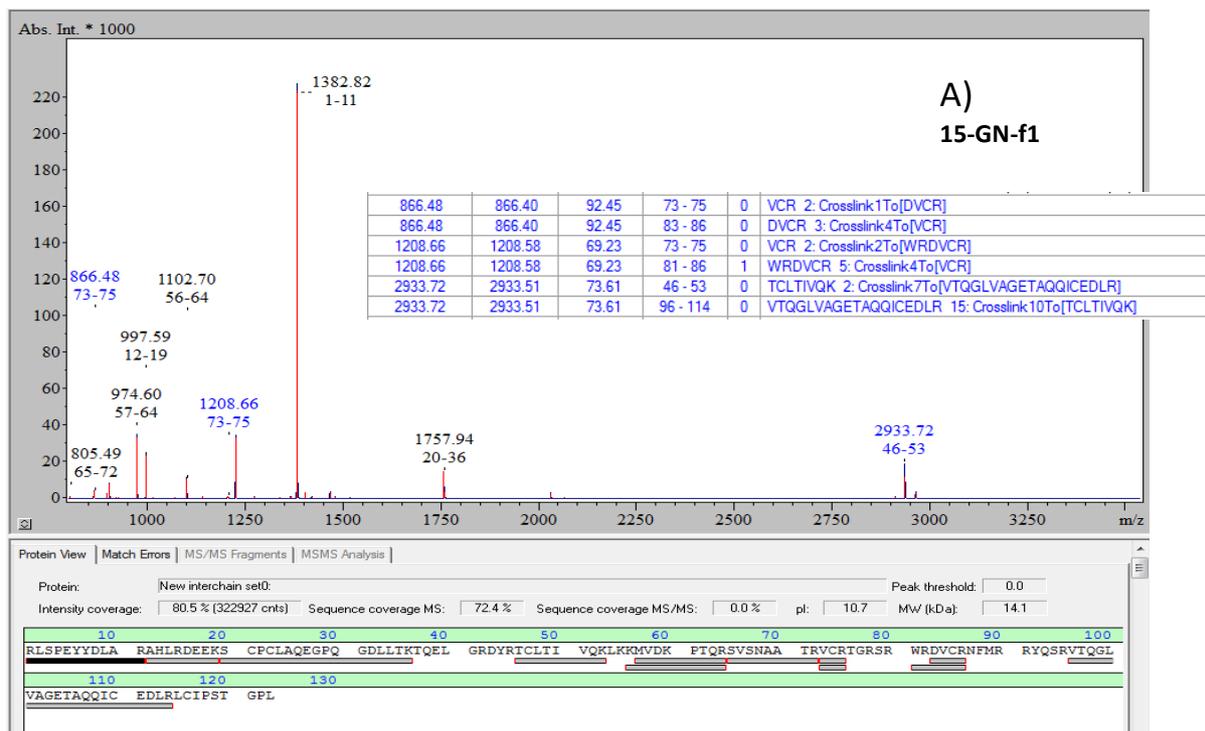


Figure S 74. Disulfide bridge patterns for 15-GN-f1-3.

Trypsin digestion

Prior to use, **15-GN-f1-3** were separated by HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, C18 XBridge BEH 300Å 3.5 μm 2.1×150 mm column, 50 °C, gradient 0-70% B in 30 min, 1 mL min⁻¹, detection at 250 nm).

The fractions corresponding to each peak shown in Figure S 72 were collected, dried under vacuum and the residue was redissolved in a solution of trypsin (5 μL, 50 ng/μL in 20 mM NH₄HCO₃). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 75).



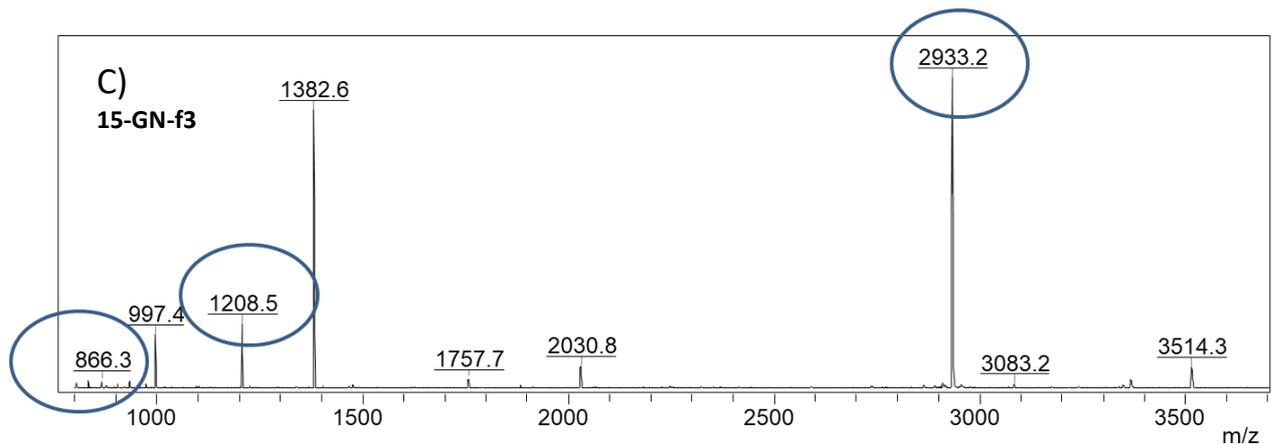
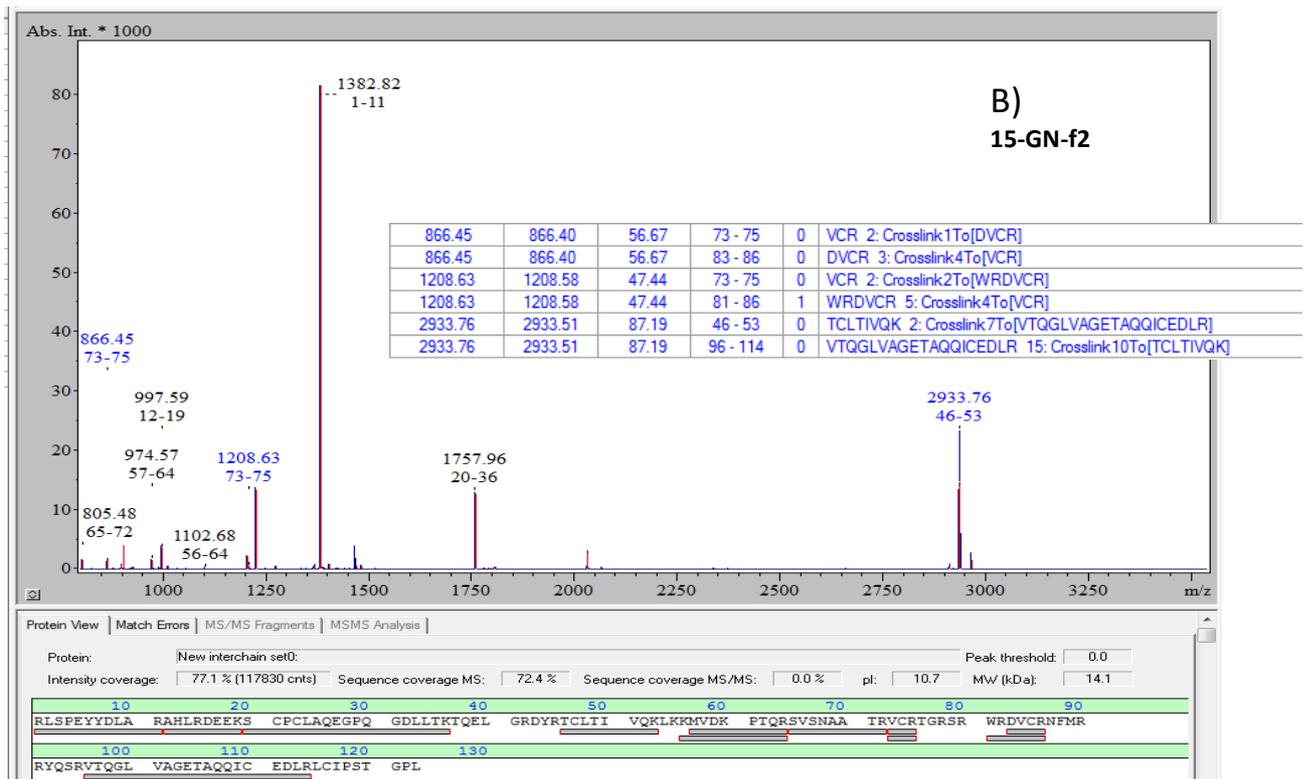
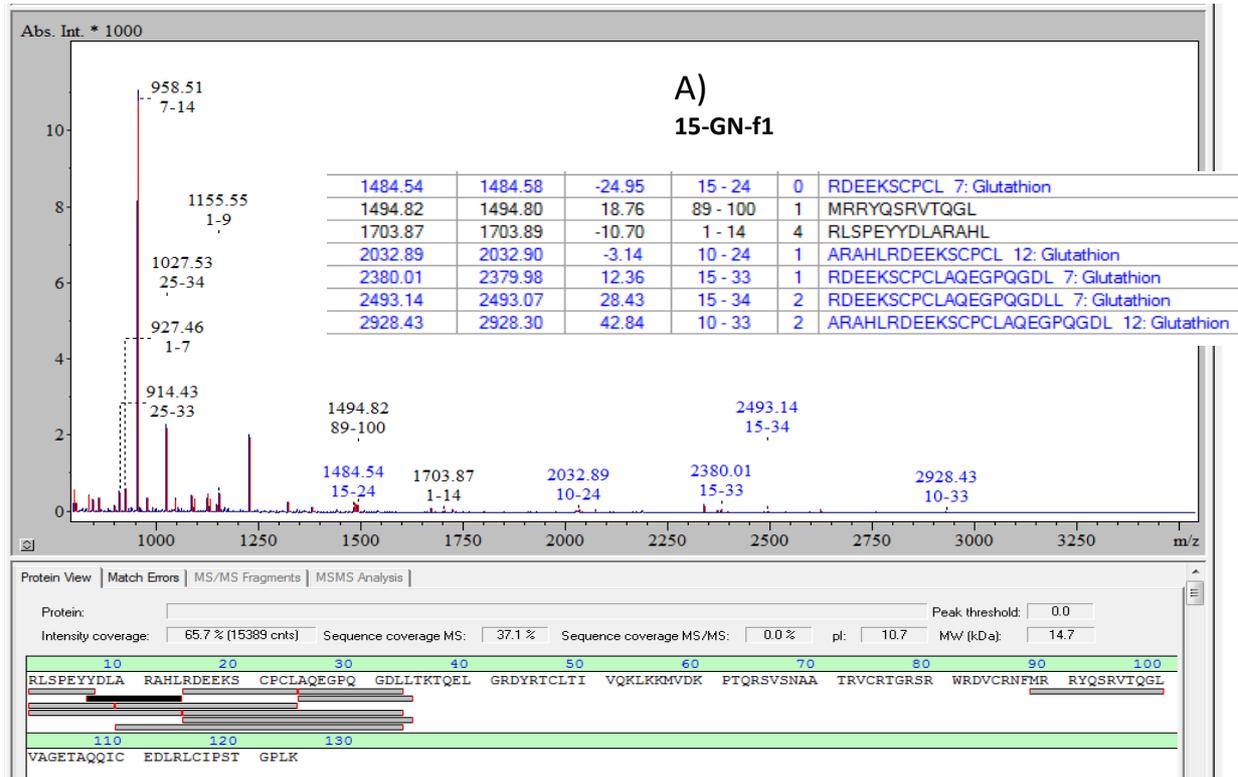


Figure S 75. MALDI-TOF analysis of the tryptic digest: results obtained with 15-GN-f1 (A), 15-GN-f2 (B) and 15-GN-f3 (C). Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. A) VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 866.40, found 866.48; VC⁹⁶R linked to WRDVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1208.58, found 1208.66; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2933.51, found 2933.72. B) VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 866.40, found 866.45; VC⁹⁶R linked to WRDVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1208.58, found 1208.63; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2933.51, found 2933.76. C) VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 866.40, found 866.3; VC⁹⁶R linked to WRDVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1208.58, found 1208.5; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2933.51, found 2933.2.

Pepsin digestion

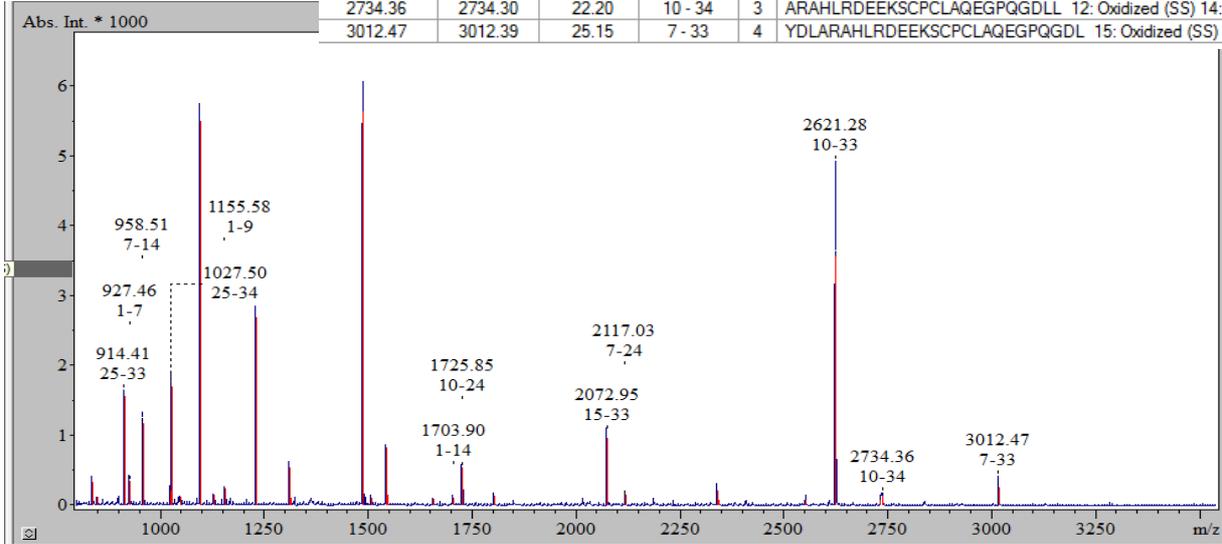
The fractions corresponding to each peak shown in Figure S 72 were collected, dried under vacuum and the residue was redissolved in a solution of pepsin (10 μ L, 200 ng/ μ L in trifluoroacetic acid 1/1000 in water). The digestion was carried out at 37 $^{\circ}$ C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (

Figure S 76).



B)
15-GN-f2

1725.85	1725.82	19.44	10 - 24	1	ARAHLRDEEKSCPCL 12: Oxidized (SS) 14: Oxidized (SS)
2072.95	2072.90	22.51	15 - 33	1	RDEEKSCPCLAQEGPQGDL 7: Oxidized (SS) 9: Oxidized (SS)
2117.03	2116.99	20.29	7 - 24	3	YDLARAHLRDEEKSCPCL 15: Oxidized (SS) 17: Oxidized (SS)
2621.28	2621.22	24.00	10 - 33	2	ARAHLRDEEKSCPCLAQEGPQGDL 12: Oxidized (SS) 14: Oxidized (SS)
2734.36	2734.30	22.20	10 - 34	3	ARAHLRDEEKSCPCLAQEGPQGDL 12: Oxidized (SS) 14: Oxidized (SS)
3012.47	3012.39	25.15	7 - 33	4	YDLARAHLRDEEKSCPCLAQEGPQGDL 15: Oxidized (SS) 17: Oxidized (SS)



Protein View | Match Errors | MS/MS Fragments | MSMS Analysis

Protein: Peak threshold:

Intensity coverage: Sequence coverage MS: Sequence coverage MS/MS: pI: MW (kDa):

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
RLSPEYYDLA	RAHLRDEEKS	CPCLAQEGPQ	GDLLTKIQEL	GRDYRTCLTI	VQKLKMKVDK	PTQRSVSNAA	TRVCRTRGRSR	WRDVCNRFMR	RYQSRVTQGI
110	120	130							
VAGETAQQIC	EDLRLCIPST	GPL							

C)
15-GN-f3

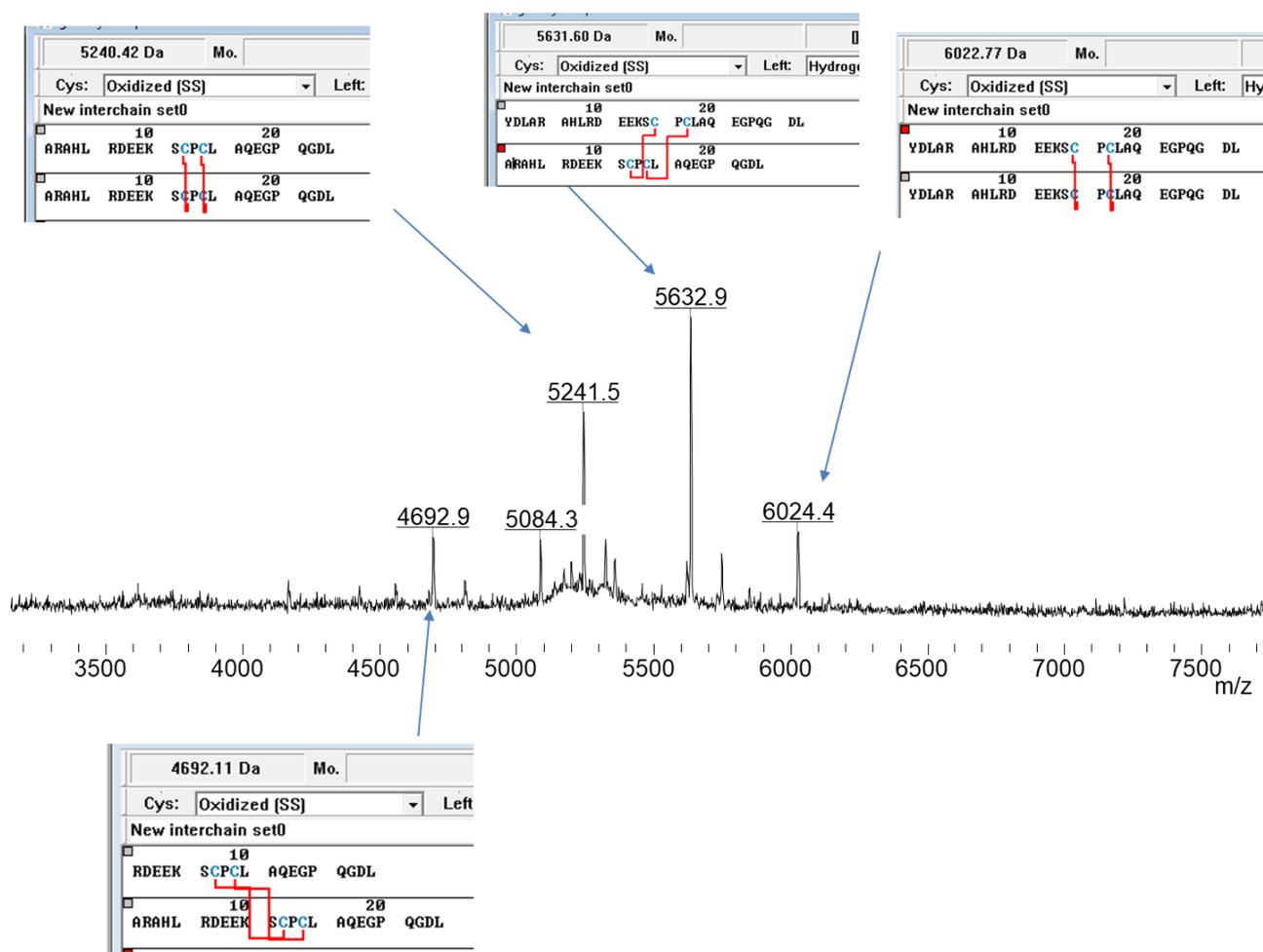


Figure S 76. MALDI-TOF analysis of the pepsin digest: results obtained with 15-GN-f1 (A), 15-GN-f2 (B) and 15-GN-f3 (C). Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. A) RDEEKSC⁴³PC⁴⁵L linked to glutathione by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1484.58, found 1484.54; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵L linked to glutathione by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2032.90, found 2032.89; RDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL linked to glutathione by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2379.98, found 2380.01; RDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL linked to glutathione by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2493.07, found 2493.14; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL linked to glutathione by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2928.30, found 2928.43. B) ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵L oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1725.82, found 1725.85; RDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2072.90, found 2072.95; YDLARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵L oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2116.99, found 2117.03; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2621.22, found 2621.28; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2734.30, found 2734.36; YDLARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 3012.47, found 3012.39. C) RDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL linked to ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 4693.11, found 4692.9; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL linked to ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 5241.42, found 5241.5; YDLARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL linked to ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 5632.60, found 5632.9; YDLARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL linked to YDLARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 6023.77, found 6024.4.

5.2. Folding and characterization of **9-GN-f**

Folding

The linear polypeptide **9-GN** (0.558 mg, 0.054 μmol) was dissolved in PBS containing 10 % by vol of glycerol, 2 M of Gn·HCl, 1 mM reduced glutathione, 0.2 mM oxidized glutathione (1 mL/mg final peptide concentration). The reaction mixture was let 1 h at 0 °C and then 8 days at 20 °C.

The protein was dialyzed twice (respectively 2 h and 24 h) at 20 °C against 200 mL PBS containing 10 % in vol of glycerol. 0.71 mL of the dialyzed solution were recovered and the concentration of the folded protein was determined using UV quantification at 280 nm (60.7 μM , 0.043 μmol , 80%)

Characterization of folded 9-GN

Folded protein **9-GN-f** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 77).

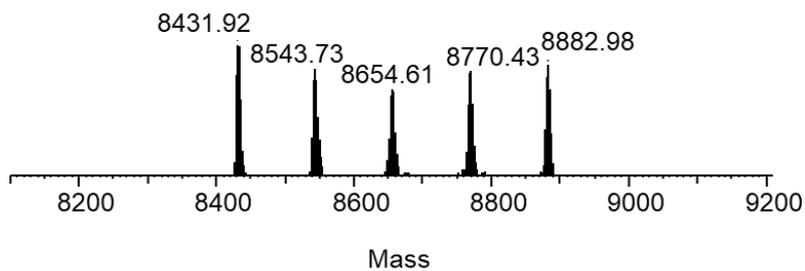
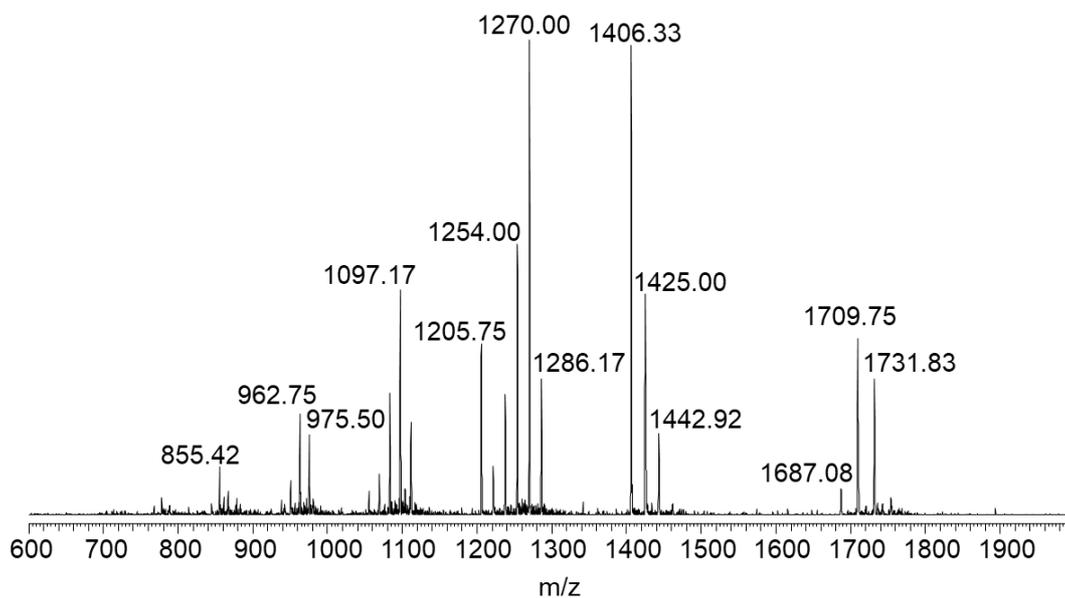
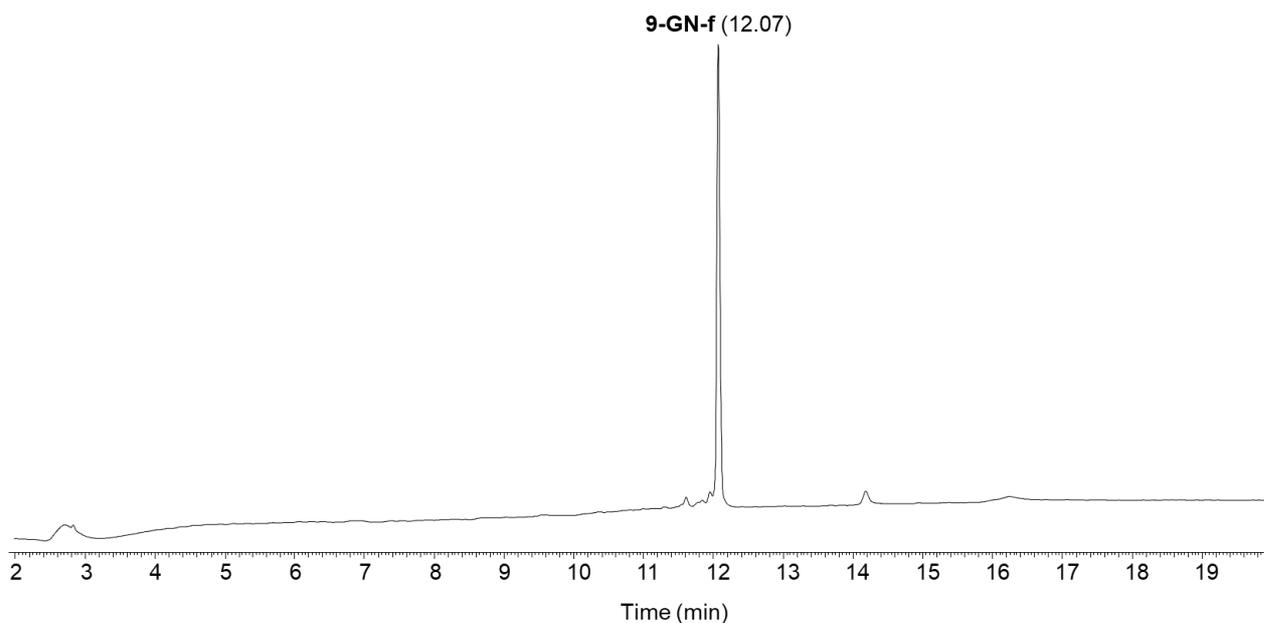


Figure S 77. UPLC-MS analysis of 9-GN-f. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M] (average mass): 8431.79, found: 8431.92 (8543.73 [M+M_{TFA}], 8654.61 [M+2M_{TFA}], 8770.43 [M+3M_{TFA}], 8882.98 [M+4M_{TFA}]).

Disulfide bridge pattern of 9-GN

The disulfide bridge patterns of **9-GN-f** is given in Figure S 78.

Experimental determination of the disulfide bridge pattern was achieved by trypsin digestion of **9-GN-f** and identification of the resulting fragments by mass spectrometry using non-reducing conditions. Fragments obtained by digestion with trypsin permitted the direct assignment of Cys69-Cys132 and Cys96-Cys107 disulfide bonds.

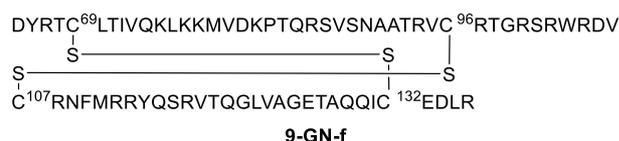


Figure S 78. Disulfide bridge pattern of 9-GN-f.

Trypsin digestion

Prior to use, **9-GN-f** was purified by HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, C18 XBridge BEH 300Å 3.5 μm 2.1×150 mm column, 50 °C, gradient 0-70% B in 30 min, 1 mL min⁻¹, detection at 250 nm).

The HPLC fraction containing the folded protein was collected, dried under vacuum and the residue was redissolved in a solution of trypsin (5 μL, 50 ng/μL in 20 mM NH₄HCO₃). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 79).

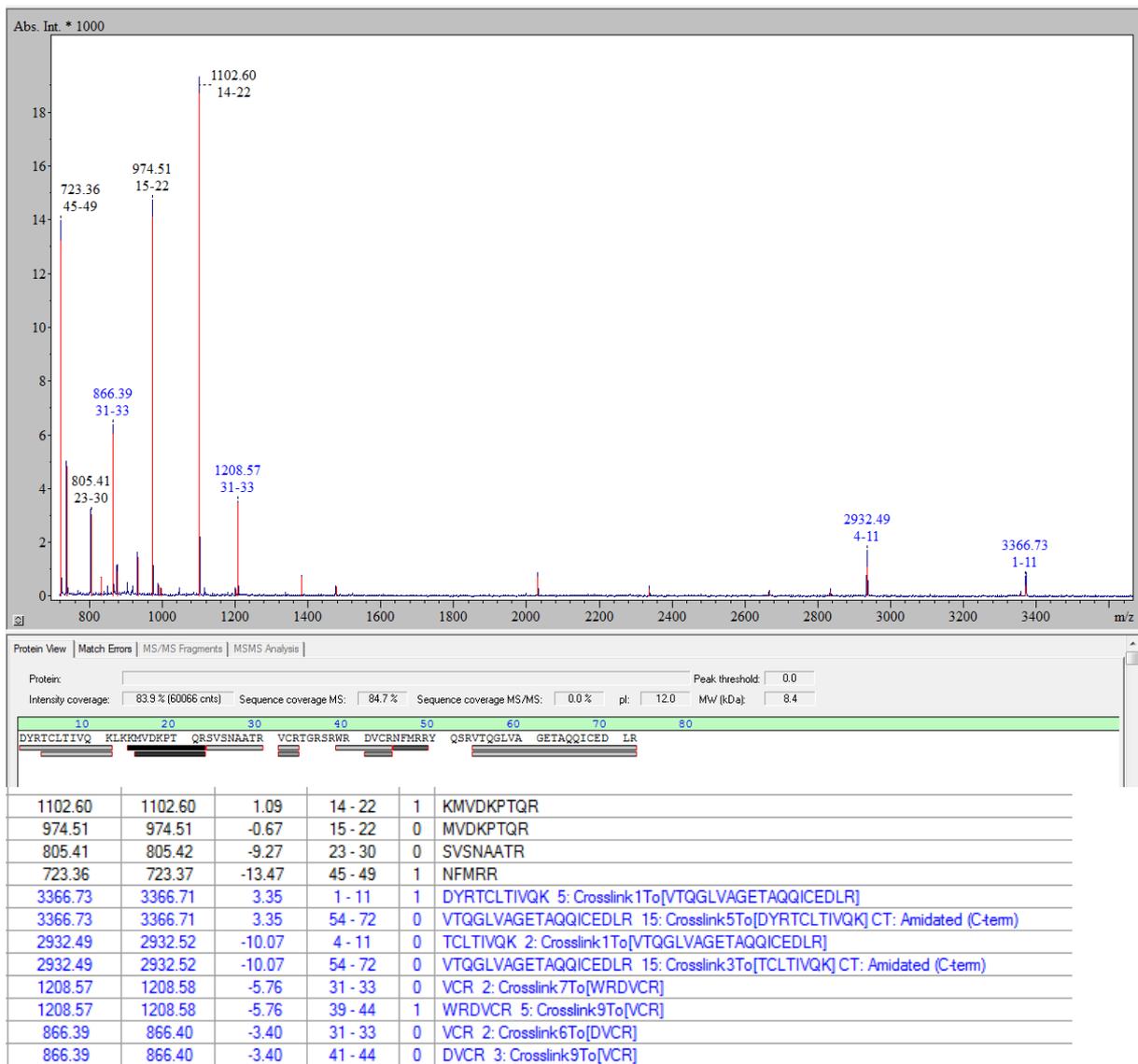


Figure S 79. MALDI-TOF analysis of the tryptic digest of 9-GN-f. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 866.40, found 866.39; VC⁹⁶R linked to WRDVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1208.58, found 1208.57; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2932.52, found 2932.49; DYRTC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 3366.71, found 3366.73.

5.3. Folding and characterization of **15-GN_{Y66C}-f**

Folding

The linear polypeptide **15-GN_{Y66C}** (0.492 mg, 0.295 μmol) was dissolved in PBS containing 10 % by vol of glycerol, 2 M of Gn·HCl, 1 mM reduced glutathione, 0.2 mM oxidized glutathione (1 mL/mg final peptide concentration). The reaction mixture was let 1 h at 0 °C and then 46 h at 20 °C.

The folded protein was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B=acetonitrile containing 0.1% TFA, 50°C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0-70% eluent B in 10 min, to give **15-GN_{Y66C}-f** as a white solid after lyophilization. The solid was dissolved in 500 μL of water and the concentration of the folded proteins was determined using UV quantification at 280 nm (30.5 μM , 0.127 μmol , 43%)

Characterization of folded 15-GN_{Y66C}

Folded protein **15-GN_{Y66C}-f** was analyzed by UPLC-MS (Figure S 80).

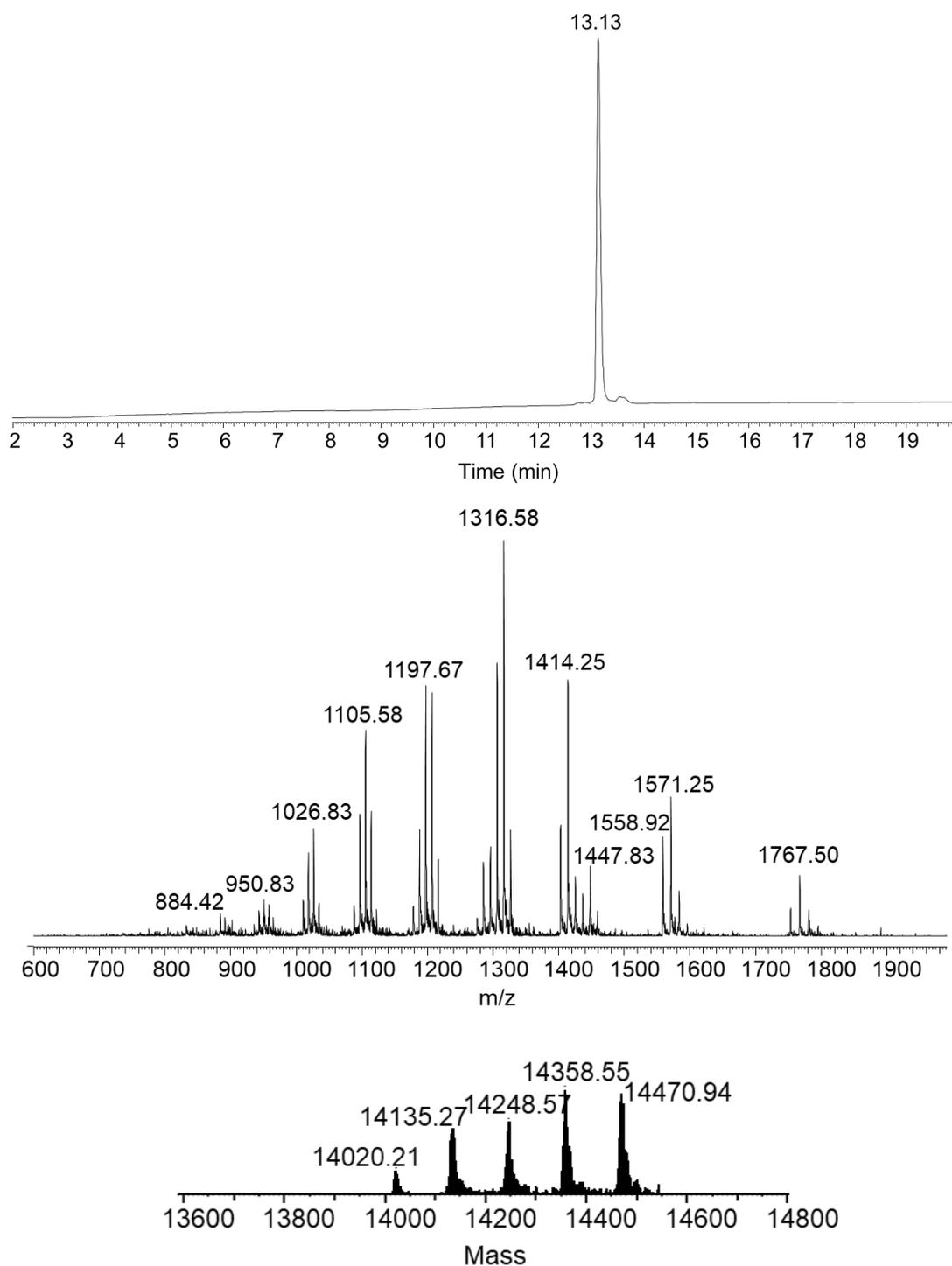


Figure S 80. UPLC-MS analysis of 15-GN_{Y66C}-f. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M] (average mass): 14020.18, found: 14020.21 (14135.27 [M+M_{TFA}], 14248.57 [M+2M_{TFA}], 14358.55 [M+3M_{TFA}], 14470.94 [M+4M_{TFA}]).

Disulfide bridge pattern of 15-GN_{Y66C}

The disulfide bridge patterns of **15-GN-f** is given in Figure S 81.

Experimental determination of the disulfide bridge pattern was achieved by enzymatic digestion of **15-GN_{Y66C-f}** and identification of the resulting fragments by mass spectrometry using non-reducing conditions. Fragments obtained by digestion with trypsin permitted the direct assignment of Cys69-Cys132 and Cys96-Cys107 disulfide bonds, while digestion with pepsin was required to establish the formation of Cys43-Cys45 disulfide bond.

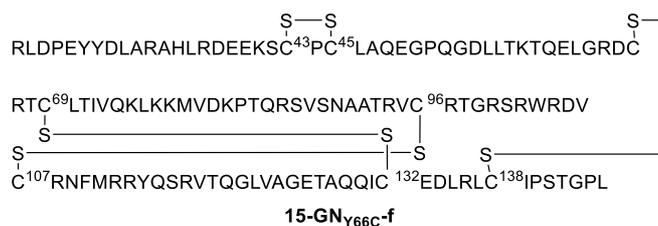
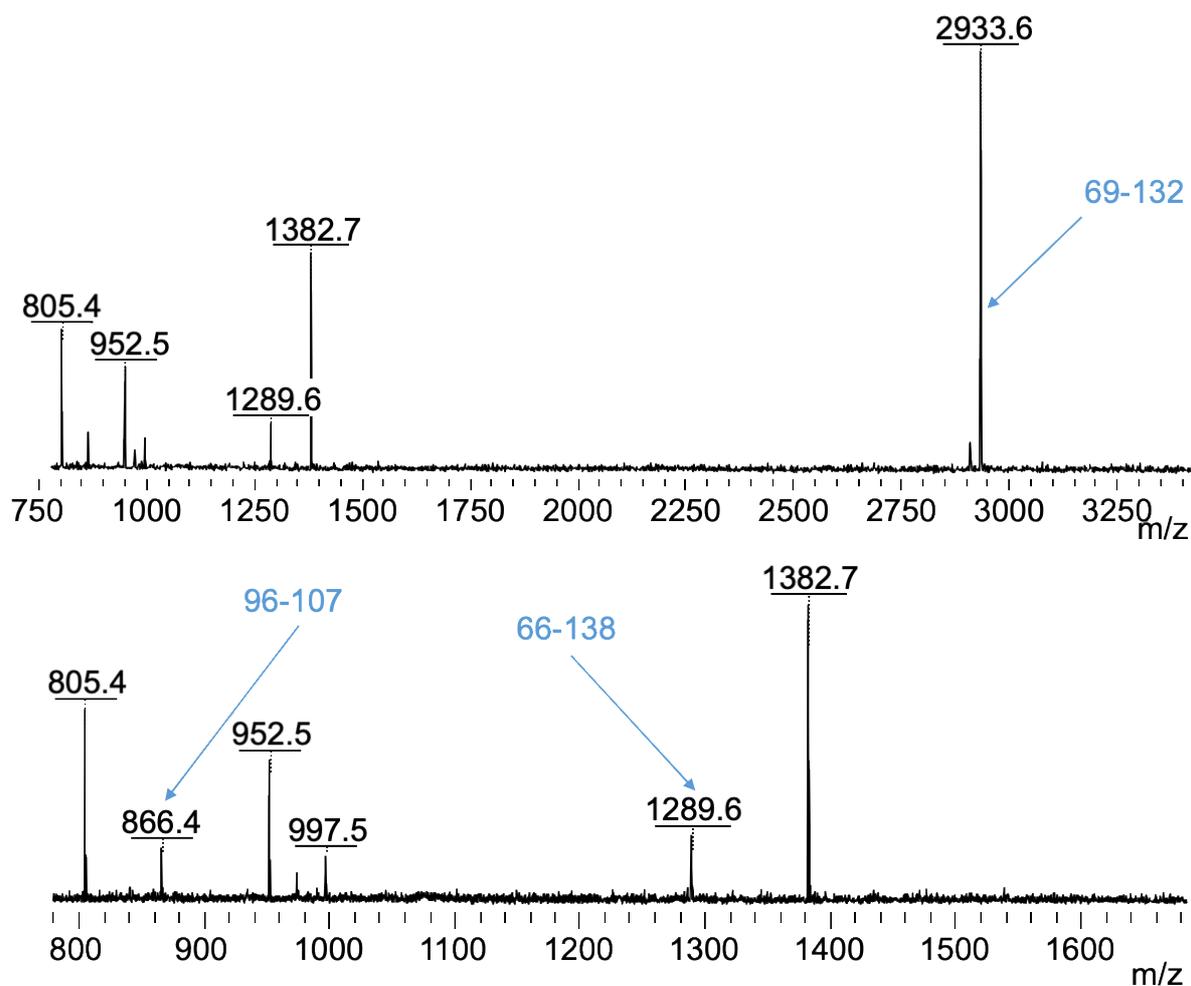


Figure S 81. Disulfide bridge pattern of 15-GN_{Y66C-f}.

Trypsin digestion

Prior to use, **15-GN_{Y66C-f}** was purified by HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, C18 XBridge BEH 300Å 3.5 μm 2.1×150 mm column, 50 °C, gradient 0-70% B in 15 min, 1 mL min⁻¹, detection at 250 nm).

The HPLC fraction containing the folded structure was collected, dried under vacuum and the residue was redissolved in a solution of trypsin (5 μL, 50 ng/μL in 20 mM NH₄HCO₃). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 82).

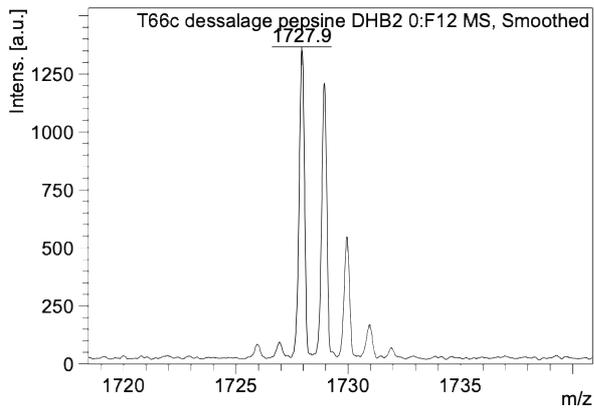
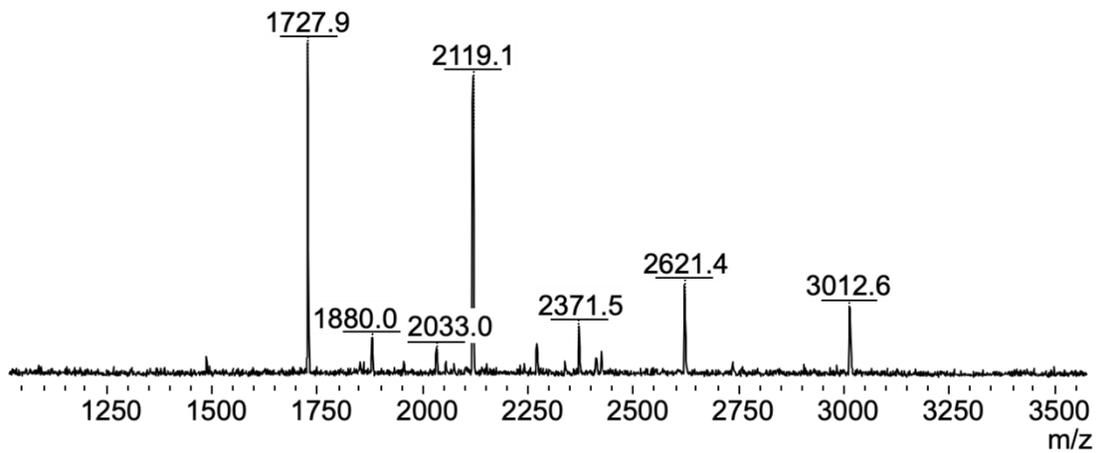


- Calculated for sequence VTQGLVAGETQQIC₁₃₂EDLR linked to TC₆₉LTIVQK via disulfide bridge [M+H]⁺ (monoisotopic mass) 2933.50 observed 2933.6
- Calculated for sequence LC₁₃₈IPSTGPL linked to RDC₆₆ via disulfide bridge [M+H]⁺ (monoisotopic mass) 1289.63 observed 1289.6
- Calculated for sequence DVC₁₀₇R linked to via disulfide bridge [M+H]⁺ (monoisotopic mass) 866,40 observed 866.4

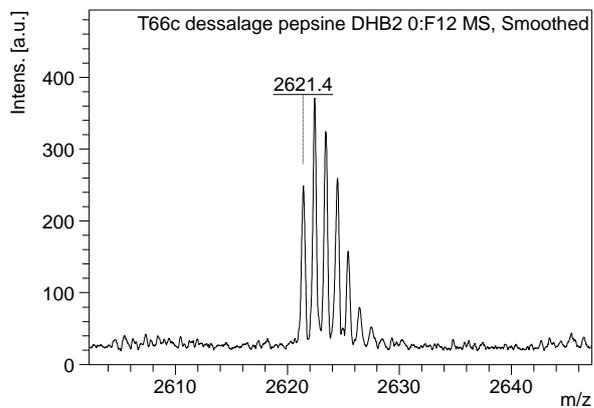
Figure S 82. MALDI-TOF analysis of the tryptic digest of 15-GN_{V66C}-f. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode.

Pepsin digestion

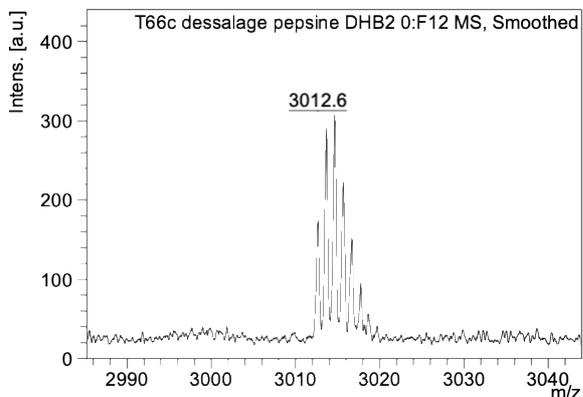
15-GN_{Y66C}.f HPLC fraction was dried under vacuum and redissolved in a solution of pepsin (10 μ L, 200 ng/ μ L in trifluoroacetic acid 1/1000 in water). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 83)



- Calculated for sequence
AR_AHLRDEEKSC₂₁PC₂₃L with
 intramolecular disulfide bridge [M+H]⁺
 (monoisotopic mass) 1727.83 observed
 1727.9



- Calculated for sequence
AR_AHLRDEEKSC₂₁PC₂₃LAQEGPQGDL
 with intramolecular disulfide bridge [M+H]⁺
 (monoisotopic mass) 2621.23 observed
 2621.4



- Calculated for sequence
YDLAR_AHLRDEEKS
C₂₁PC₂₃LAQEGPQGDL with intramolecular
 disulfide bridge [M+H]⁺ (monoisotopic
 mass) 3012.4 observed 3012.6

Figure S 83. MALDI-TOF analysis of the pepsin digest of 15-GN_{v66c-f}. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode.

5.4. Folding and characterization of 15-GN_{C138A}-f

Folding

The linear polypeptide **15-GN_{C138A}** (583 μ g, 35.1 nmol) was dissolved in PBS containing 10 % by vol of glycerol, 2 M of Gn·HCl, 1 mM reduced glutathione, 0.2 mM oxidized glutathione (1 mL/mg final peptide concentration). The reaction mixture was let 1 h at 0 °C and then 137 h at 20 °C.

The protein was dialysed twice (respectively 1 h and 24 h) at 20 °C PBS containing 10 % in vol of glycerol and 10 mM oxidized glutathione and then twice (respectively 2 h and 38 h) at 20 °C against PBS containing 10 % in vol of glycerol. 550 μ L of the dialyzed solution were recovered and the concentration of the folded proteins was determined using UV quantification at 280 nm (35.1 μ M, 19.3 nmol, 55%)

Characterization of folded 15-GN_{C138A}

The folded protein **15-GN_{C138A}-f** was analyzed by UPLC (Figure S 84).

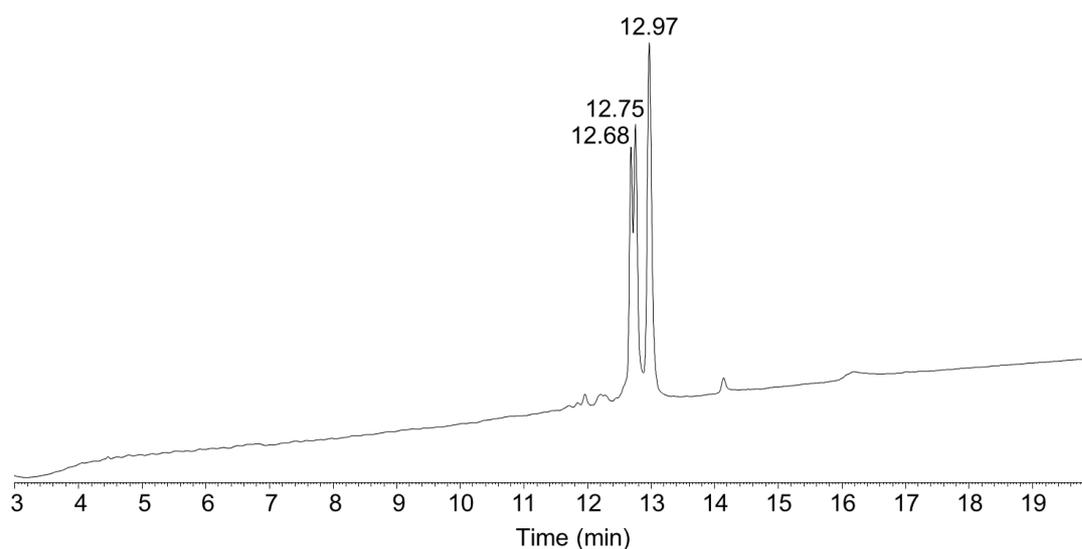


Figure S 84. UPLC analysis of 15-GN_{C138A}-f. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm.

Fractions corresponding to each peak were collected and submitted to MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 85).

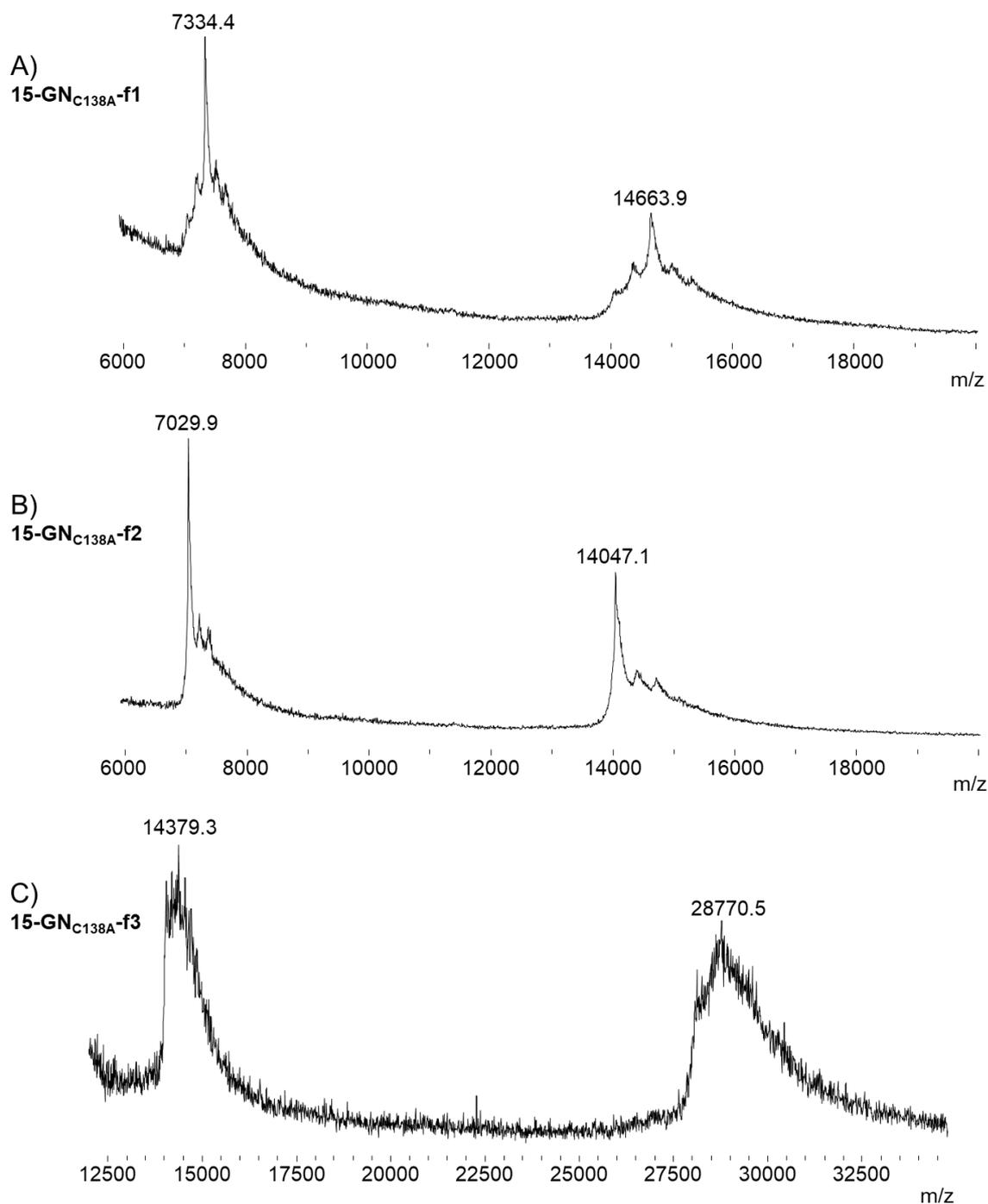


Figure S 85. MALDI-TOF analysis of peptide 15-GN_{C138A}-f1-3. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, A) calcd. for $[M+\text{glutathione}+\text{H}]^+$ (average): 14651.61, found: 14663.9, B) calcd. for $[M+\text{H}]^+$ (average): 14051.15, found: 14047.1, C) calcd. for $[2M+2\text{glutathione}+\text{H}]^+$ (average): 28713.76, found: 28757.6.

Disulfide bridge pattern of 15-GN_{C138A}

The disulfide bridge pattern of **15-GN_{C138A}-f1** (rt = 12.68 min, Figure S 84), **15-GN_{C138A}-f2** (rt = 12.75 min, Figure S 84) and **15-GN_{C138A}-f3** (rt = 12.97 min, Figure S 84) as deduced from proteomic experiments is given in Figure S 86.

Experimental determination of disulfide bridge patterns was achieved by enzymatic digestion of **15-GN_{C138A}-f1**, **15-GN_{C138A}-f2** and **15-GN_{C138A}-f3** and identification of the resulting fragments by mass spectrometry using non-reducing conditions. Fragments obtained by digestion with trypsin permitted the direct assignment of Cys69-Cys132 and Cys96-Cys107 disulfide bonds whereas further digestion with the pepsin was required to establish the formation of Cys43-Cys45 and other disulfide bonds.

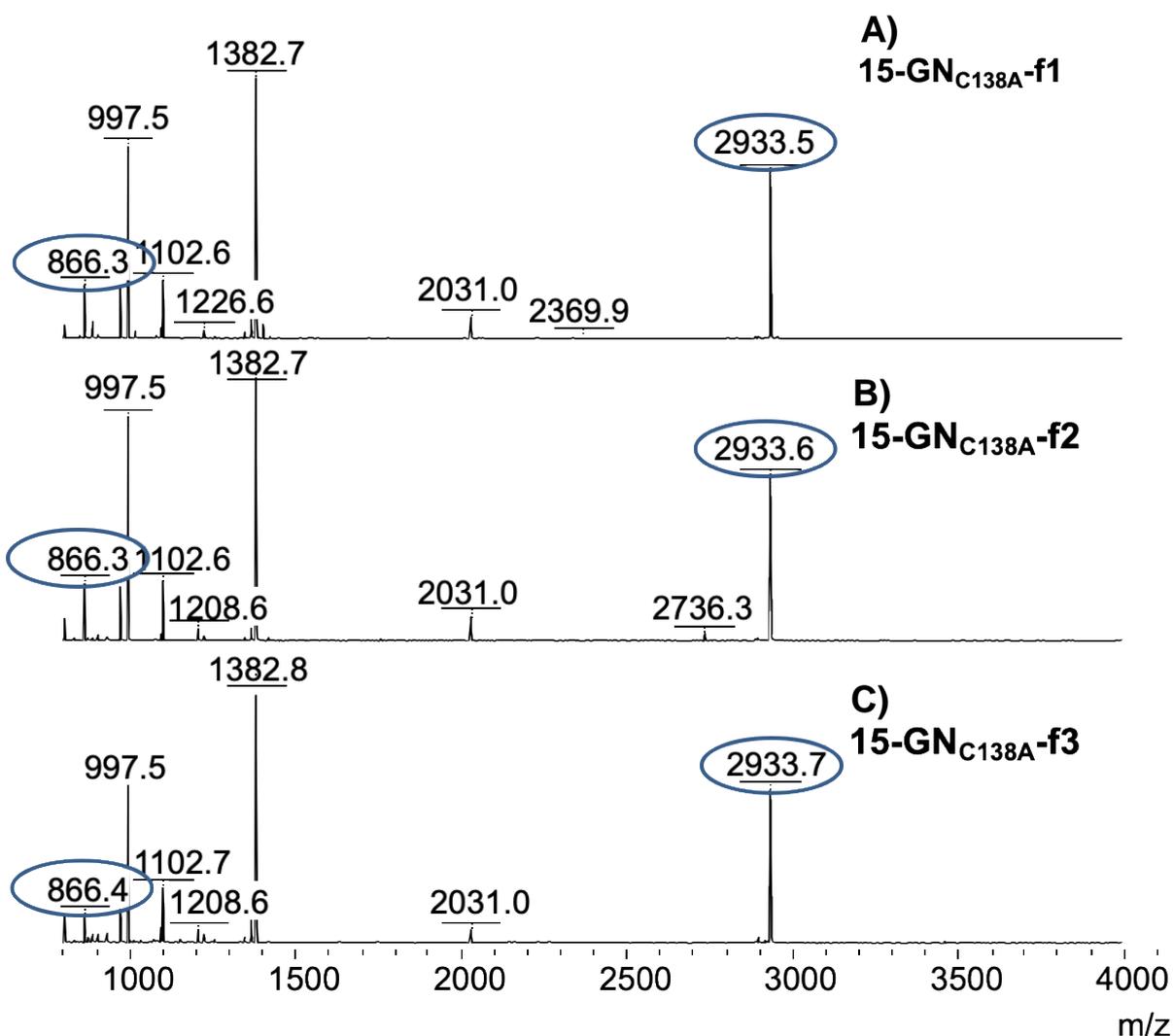


Figure S 86. Disulfide bridge patterns of 15-GN_{C138A}-f1, 15-GN_{C138A}-f2 and 15-GN_{C138A}-f3.

Trypsin digestion

Prior to use, **15-GN_{C138A}-f1**, **15-GN_{C138A}-f2** and **15-GN_{C138A}-f3** were separated by HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, C18 XBridge BEH 300Å 3.5 µm 2.1×150 mm column, 50 °C, gradient 0-70% B in 30 min, 1 mL min⁻¹, detection at 250 nm).

For each protein, the HPLC fractions corresponding to each form were collected, dried under vacuum and redissolved in a solution of trypsin (5 µL, 50 ng/µL in 20 mM NH₄HCO₃). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 87).

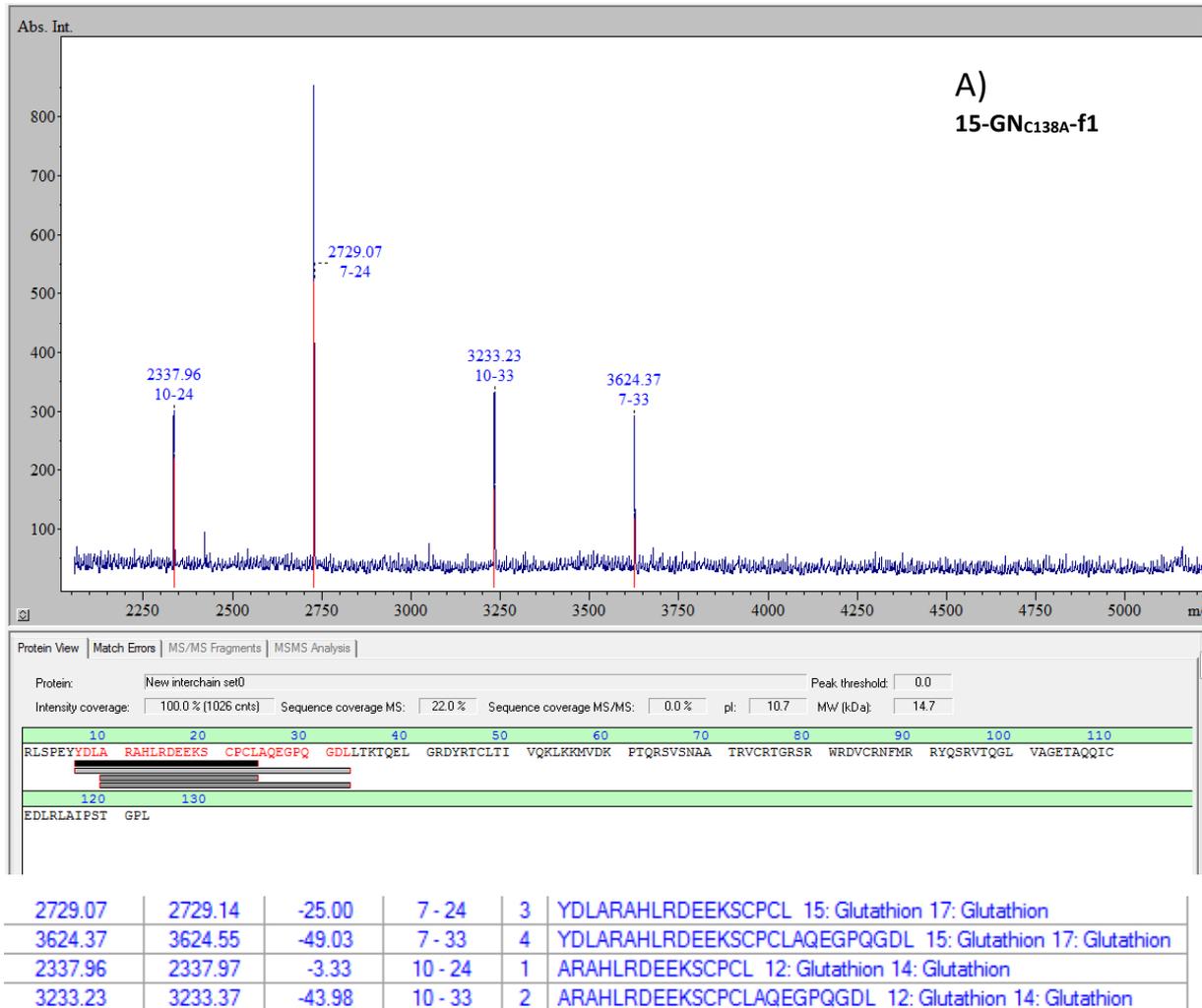


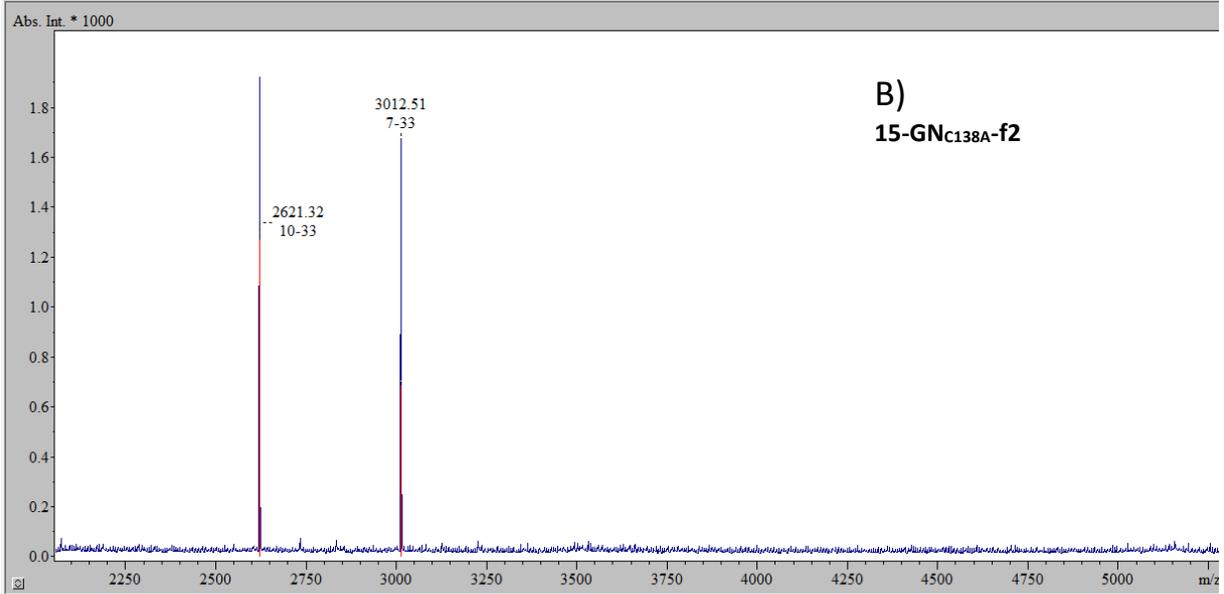
866.30	866.40	-109.88	73 - 75	0	VCR 2: Crosslink1To[DVCR]
866.30	866.40	-109.88	83 - 86	0	DVCR 3: Crosslink4To[VCR]
2933.54	2933.51	12.87	46 - 53	0	TCLTIVQK 2: Crosslink7To[VTQGLVAGETAQQICEDLR]
2933.54	2933.51	12.87	96 - 114	0	VTQGLVAGETAQQICEDLR 15: Crosslink10To[TCLTIVQK]

Figure S 87. MALDI-TOF analysis of the tryptic digest of 15-GN_{APA}-f1-3. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. A) VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 866.40, found 866.3; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2933.51, found 2933.5. B) VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 866.40, found 866.3; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2933.51, found 2933.6. C) VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 866.40, found 866.4; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2933.51, found 2933.7.

Pepsin digestion

Fractions corresponding to **15-GN_{C138A}-f1**, **15-GN_{C138A}-f2** and **15-GN_{C138A}-f3** were dried under vacuum and redissolved in a solution of pepsin (10 µL, 200 ng/µL in trifluoroacetic acid 1/1000 in water). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 88).





Protein View | Match Errors | MS/MS Fragments | MS/MS Analysis

Protein: Peak threshold:

Intensity coverage: Sequence coverage MS: Sequence coverage MS/MS: pI: MW (kDa):

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
RLSPEYYDLA	RAHLRDEEKS	CPCLAQEGPQ	GDLTKIQEL	GRDYRTCLTI	VQKLKQVDK	PTQRSVSNAA	TRVCRTGRSR	WRDVCRNFMR	RYQSRVTQGL	VAGETAQQIC	EDLRLAIPST
RAHLRDEEKS CPCLAQEGPQ											
130											
GPL											

3012.51	3012.39	37.87	7 - 33	4	YDLARAHLRDEEKSCPCLAQEGPQGD L 15: Oxidized (SS) 17: Oxidized (SS)
2621.32	2621.22	37.58	10 - 33	2	ARAHLRDEEKSCPCLAQEGPQGD L 12: Oxidized (SS) 14: Oxidized (SS)

C)
15-GN_{C138A}-f3

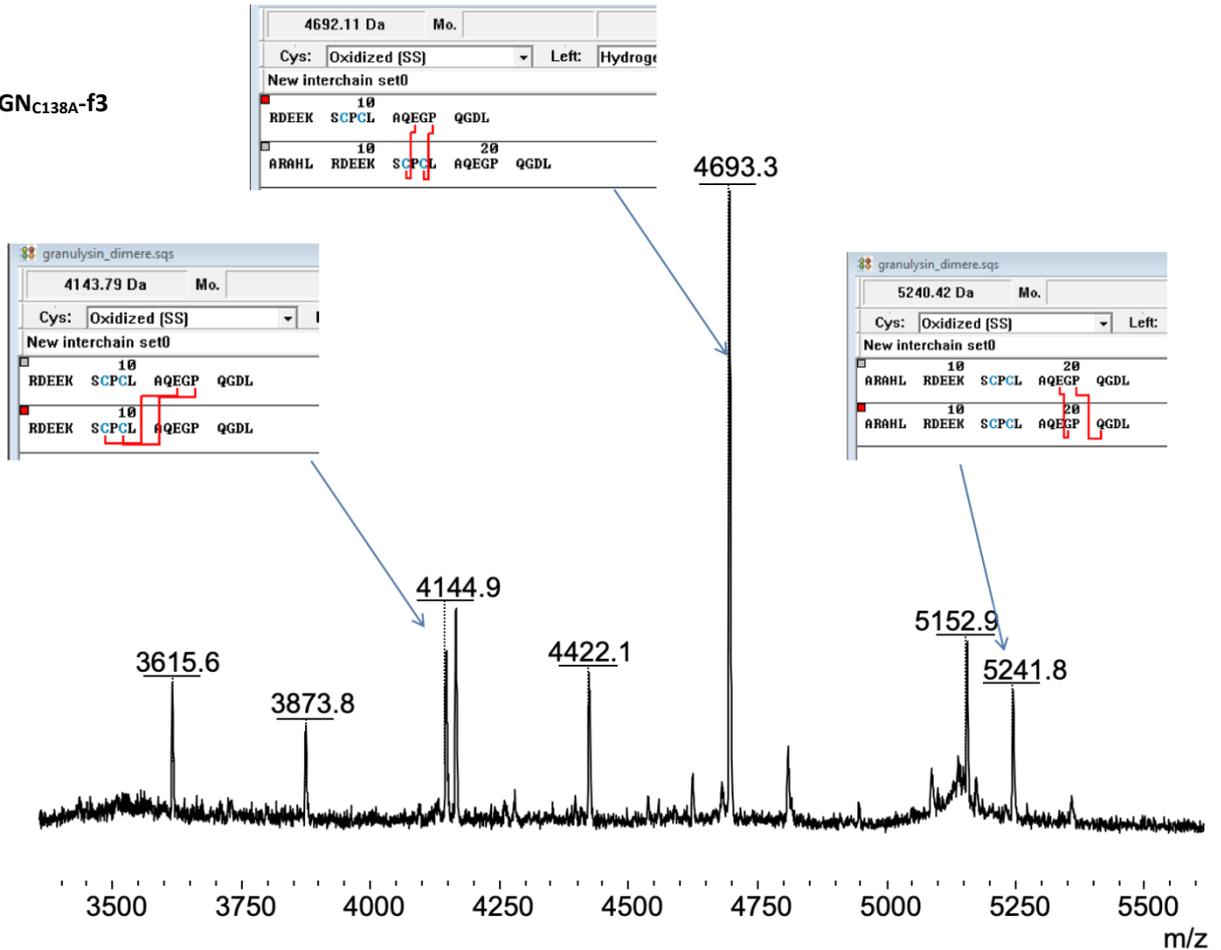


Figure S 88. MALDI-TOF analysis of the pepsin digest of 15-GN_{C138A}-f1, 15-GN_{C138A}-f2 and 15-GN_{C138A}-f3. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. A) YDLARAHRLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵L linked to two glutathione by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2729.14, found: 2729.07; YDLARAHRLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L linked to two glutathione by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 3624.55, found 3624.37; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵L linked to two glutathione by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2337.97, found: 2337.96; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L linked to two glutathione by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 3233.37, found: 3233.23. B) ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2621.22, found 2621.32; YDLARAHRLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 3012.39, found 3012.51. C) RDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L linked to RDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 4144.79, found 4144.9; RDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L linked to ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 4693.11, found 4693.3; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L linked to ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGD L by two disulfide bridges, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 5241.41, found 5241.8.

5.5. Folding and characterization of **15-GN_{APA}-f**

Folding

The linear polypeptide **15-GN_{APA}** (0.495 mg, 29.7 nmol) was dissolved in PBS containing 10 % by vol of glycerol, 2 M of Gn·HCl, 1 mM reduced glutathione, 0.2 mM oxidized glutathione (1 mL/mg final peptide concentration). The reaction mixture was let 1 h at 0 °C and then 234 h at 20 °C.

The protein was dialysed twice (respectively 2 h and 26 h) at 20 °C against 200 mL of PBS containing 10 % in vol of glycerol. 574 µL of the dialyzed solution were recovered and the concentration of the folded protein was determined using UV quantification at 280 nm (40.4 µM, 23.2 nmol, 78%)

Characterization of folded 15-GN_{APA}

Folded protein **15-GN_{APA}-f** was analyzed by LC (Figure S 89).

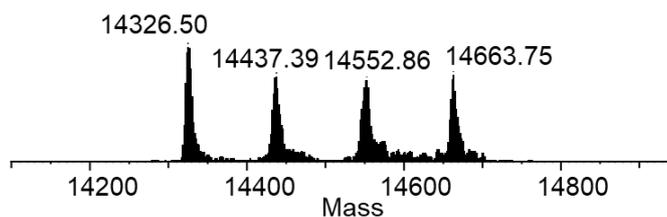
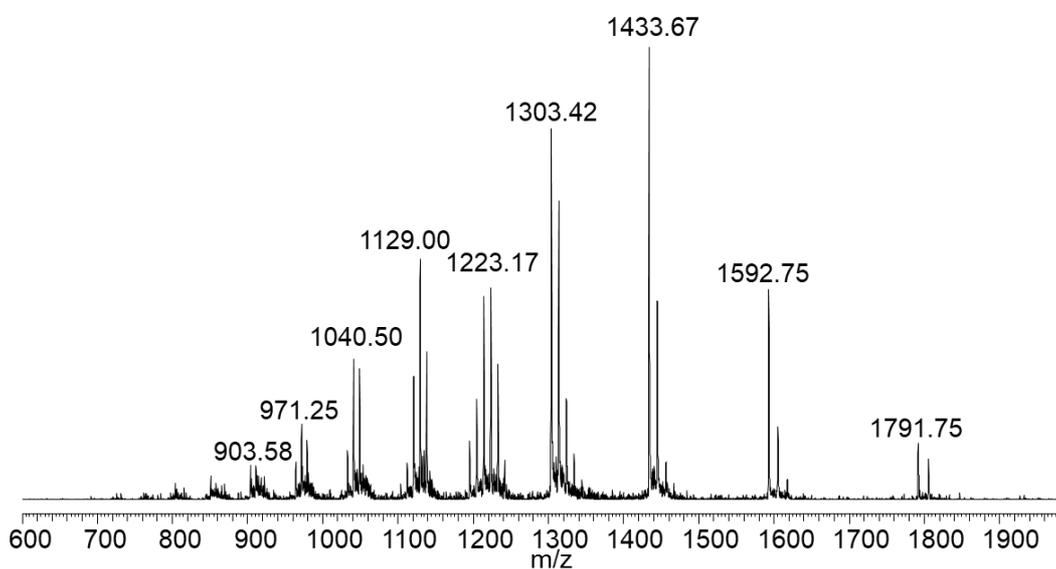
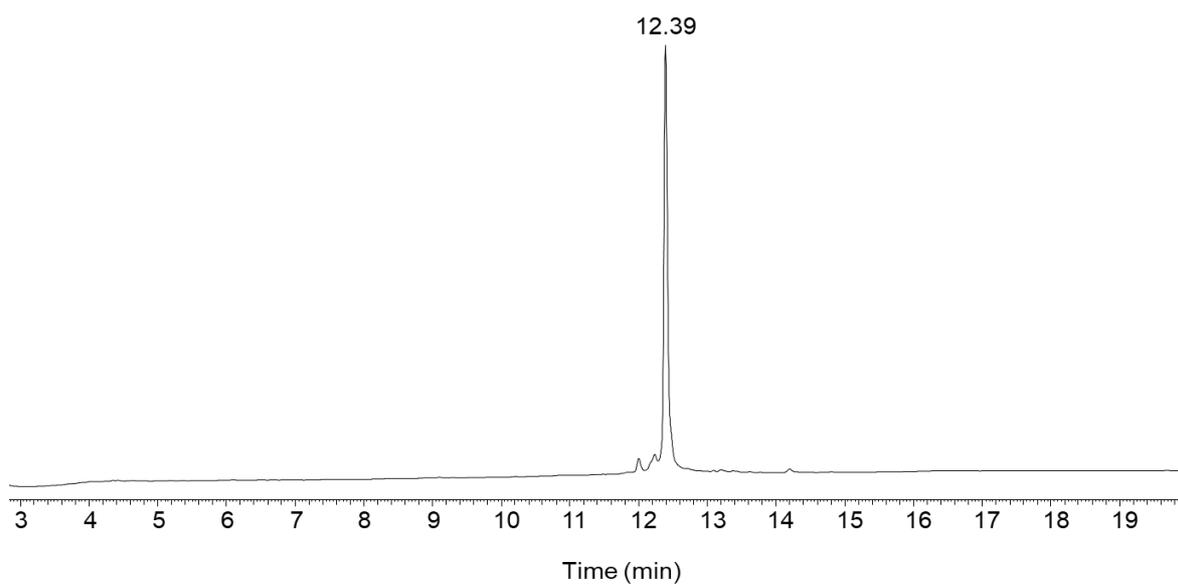


Figure S 89. UPLC-MS analysis of 15-GN_{APA}-f. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M+glutathione] (average mass): 14326.33, found: 14326.50 (14437.39 [M+glutathione+M_{TFA}], 14552.86 [M+glutathione +2M_{TFA}], 14663.75 [M+glutathione +3M_{TFA}])

Disulfide bridge pattern of 15-GN_{APA}

The disulfide bridge patterns of **15-GN_{APA}-f** is given in Figure S 90.

Experimental determination of the disulfide bridge pattern was achieved by trypsin digestion of **15-GN_{APA}-f** and identification of the resulting fragments by mass spectrometry using non-reducing conditions. Fragments obtained by digestion with trypsin permitted the direct assignment of Cys69-Cys132 and Cys96-Cys107 disulfide bonds.

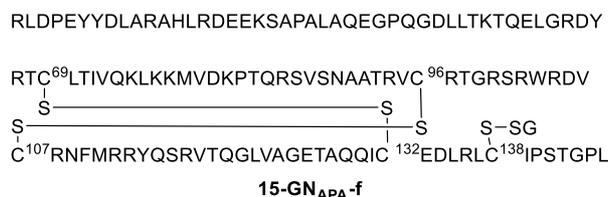


Figure S 90. Disulfide bridge pattern of 15-GN_{APA}-f

Trypsin digestion

Prior to use, **15-GN_{APA}-f** was purified by HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, C18 XBridge BEH 300Å 3.5 μm 2.1×150 mm column, 50 °C, gradient 0-70% B in 30 min, 1 mL min⁻¹, detection at 250 nm).

The HPLC fraction containing the folded protein was collected, dried under vacuum and the residue was redissolved in a solution of trypsin (5 μL, 50 ng/μL in 20 mM NH₄HCO₃). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 91).

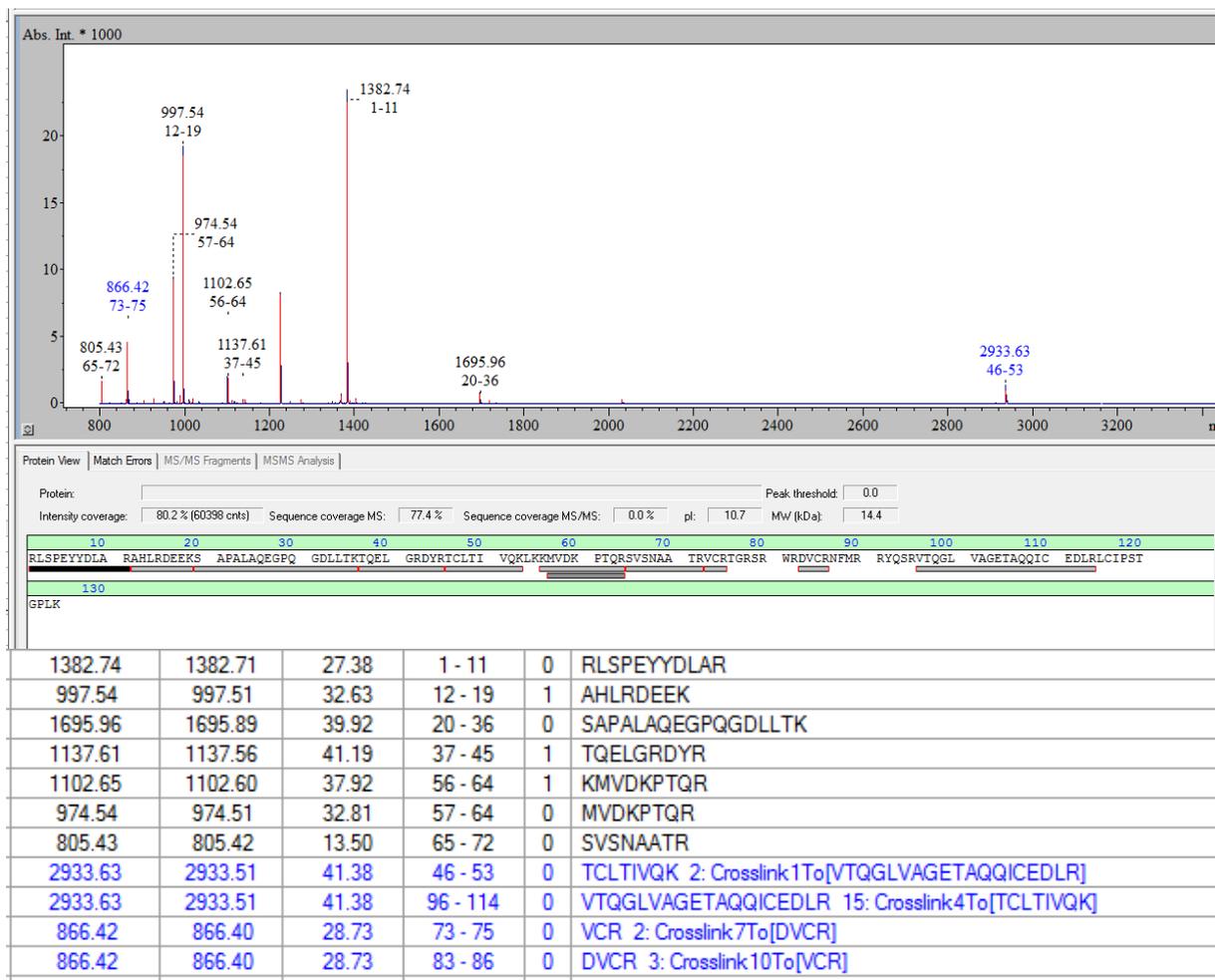


Figure S 91. MALDI-TOF analysis of the tryptic digest of 15-GN^{APA}-f. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 866.40, found 866.42; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 2933.51, found 2933.63.

5.6. Folding and characterization of 15-GN_{biot}-f

Folding

The linear polypeptide **15-GN_{biot}** (1.13 mg, 0.066 μ mol) was dissolved in PBS containing 10 % by vol of glycerol, 2 M of Gn·HCl, 1 mM reduced glutathione, 0.2 mM oxidized glutathione (1 mL/mg final peptide concentration). The reaction mixture was let 1 h at 0 °C and then 96 h at 20 °C.

The protein was dialysed twice (respectively 1 h and 24 h) at 20 °C against 500 mL of PBS containing 10 % in vol of glycerol and 10 mM oxidized glutathione and then twice (respectively 2 h and 48 h) at 20 °C against 500 mL of 10 mM PBS, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl buffer pH 7.4 PBS containing 10 % in vol of glycerol.

1.54 mL of the dialyzed solution were recovered and the concentration of the folded protein was determined using UV quantification at 280 nm (34.6 μ M, 0.053 μ mol, 80%)

Characterization of folded 15-GN_{biot}

15-GN_{biot}-f protein was analyzed by UPLC-MS (Figure S 92).

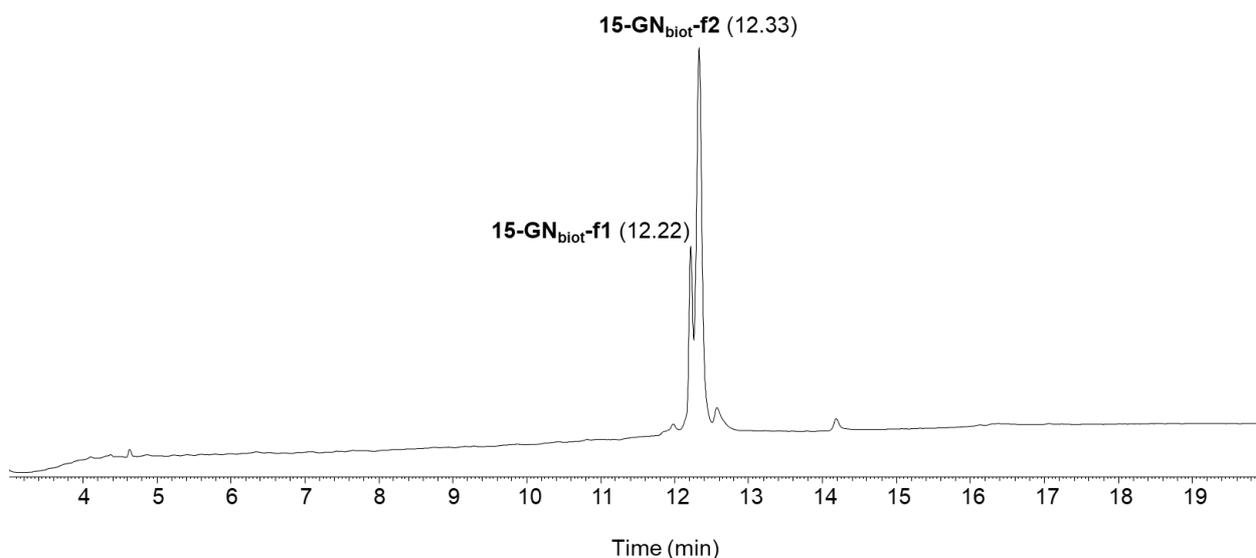


Figure S 92. UPLC-MS analysis of 15-GN_{biot}-f protein. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm.

Fractions corresponding to each peak were collected and submitted to MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 93).

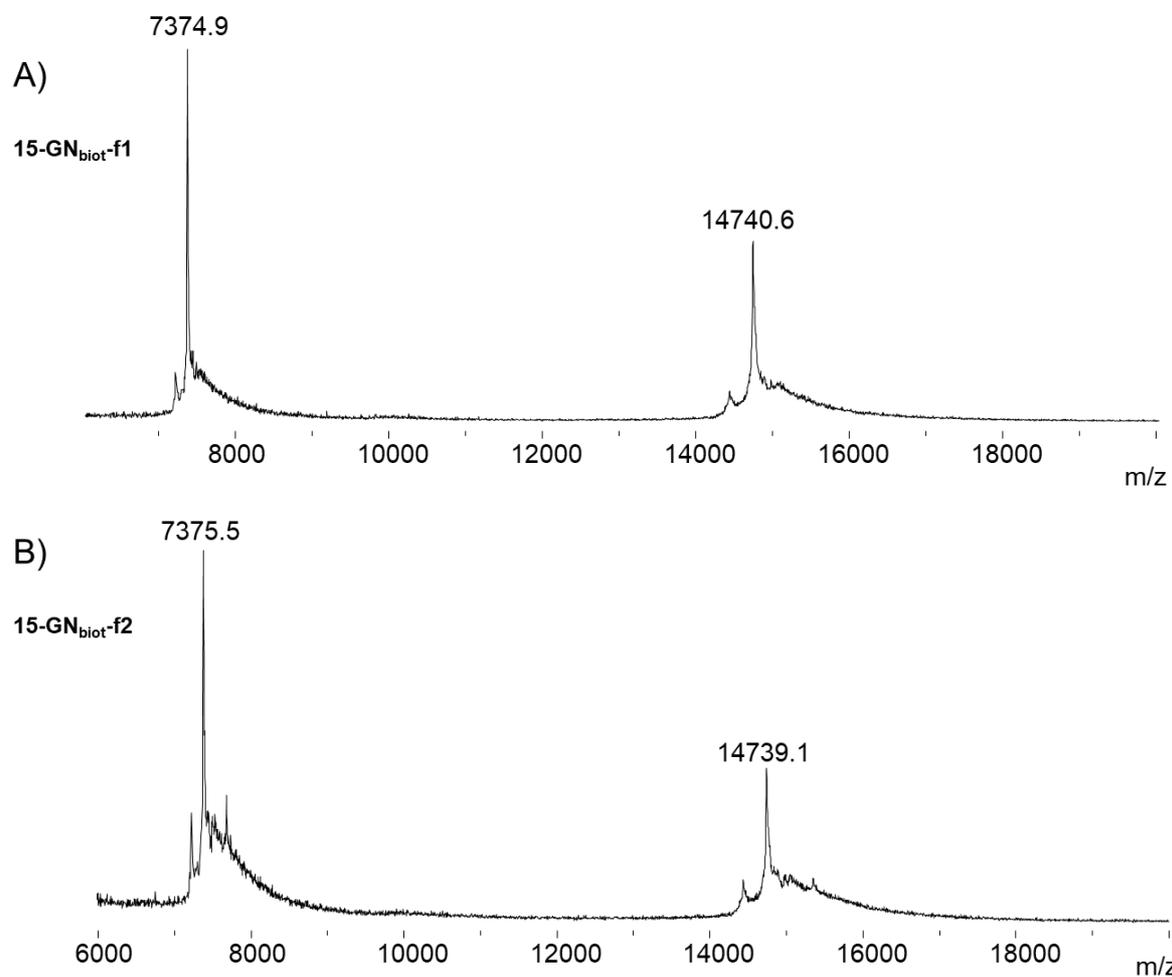


Figure S 93. MALDI-TOF analysis of peptide 15-GN_{biot}-f1-2. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, A) calcd. for [M+glutathione+H]⁺ (average): 14745.00, found: 14740.6, B) calcd. for [M+glutathione+H]⁺ (average): 14745.00, found: 14739.1.

Disulfide bridge pattern of 15-GN_{biot}

The characterization of the disulfide bridge pattern of **15-GN_{biot}-f1** (rt = 12.22 min, Figure S 92) and **15-GN_{biot}-f2** (rt = 12.33 min, Figure S 92) is given in Figure S 94.

Experimental determination of disulfide bridge patterns was achieved by enzymatic digestion of **15-GN_{biot}-f1** and **15-GN_{biot}-f2** and identification of the resulting fragments by mass spectrometry using non-reducing conditions. Fragments obtained by digestion with trypsin permitted the direct assignment of Cys69-Cys132 and Cys96-Cys107 disulfide bonds (Figure S 95) while digestion with pepsin was required to establish the formation of Cys43-Cys45 and other disulfide bonds (Figure S 96).

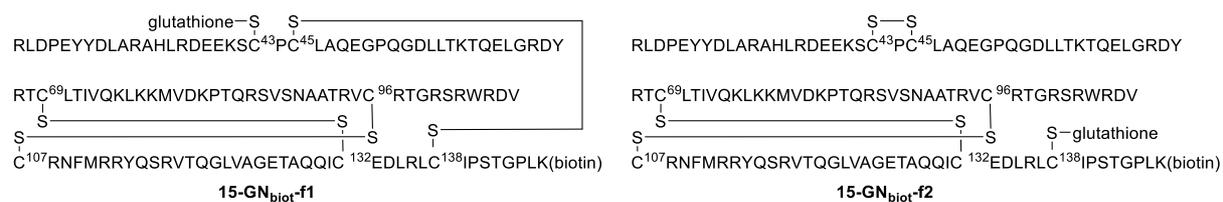
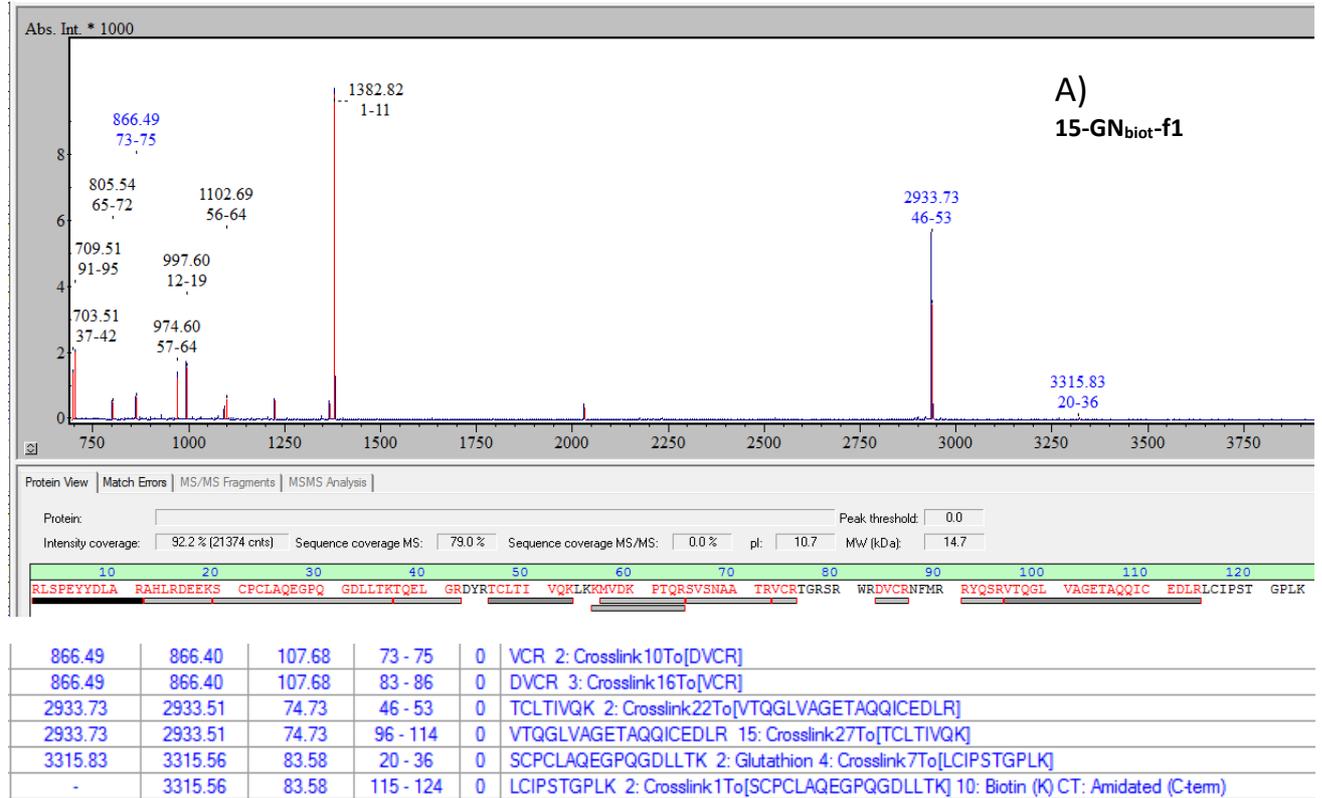


Figure S 94. Disulfide bridge patterns of 15-GN_{biot}-f1 and 15-GN_{biot}-f2.

Trypsin digestion

Prior to use, **15-GN_{biot}-f1** and **15-GN_{biot}-f2** were separated by HPLC (eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN, C18 XBridge BEH 300Å 3.5 µm 2.1×150 mm column, 50 °C, gradient 0-70% B in 30 min, 1 mL min⁻¹, detection at 250 nm).

For each protein, the HPLC fractions corresponding to each form were collected, dried under vacuum and the residue was redissolved in a solution of trypsin (5 µL, 50 ng/µL in 20 mM NH₄HCO₃). The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 95Erreur ! Source du renvoi introuvable.).



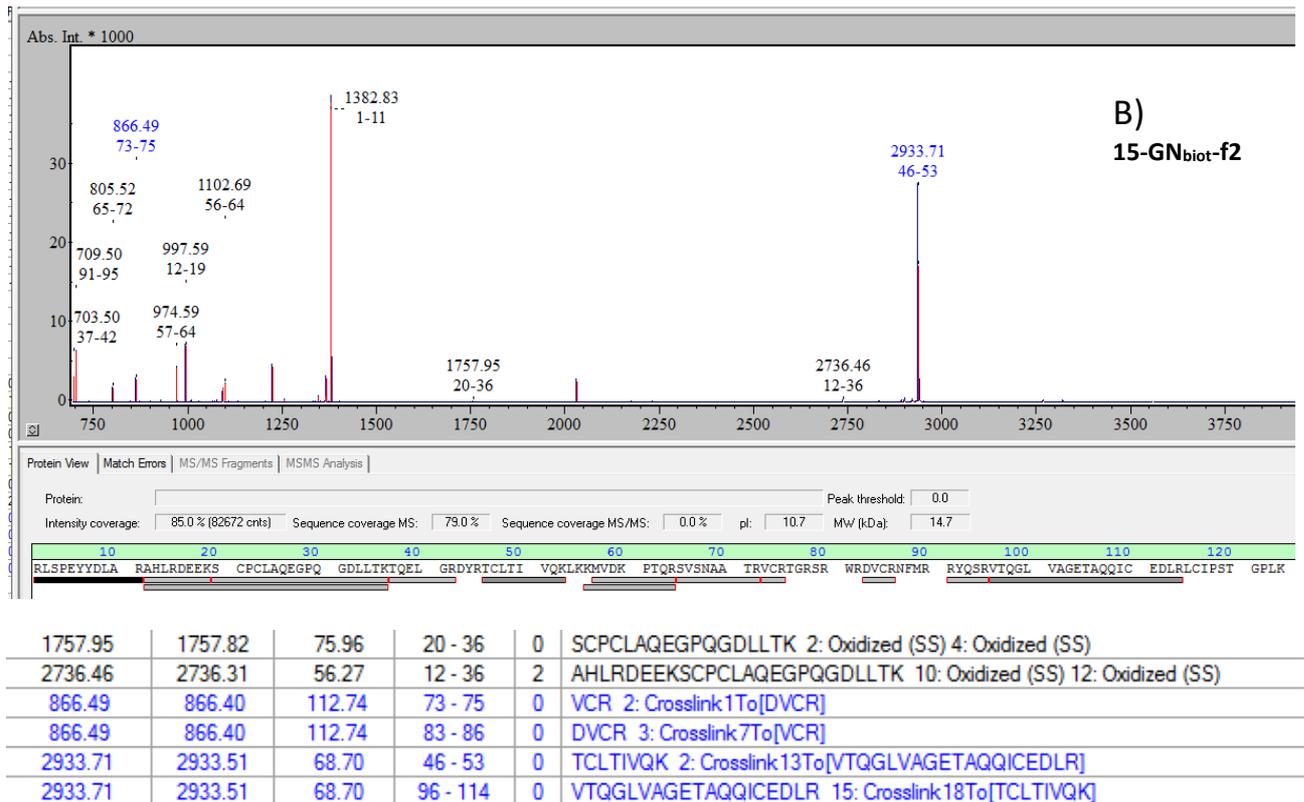
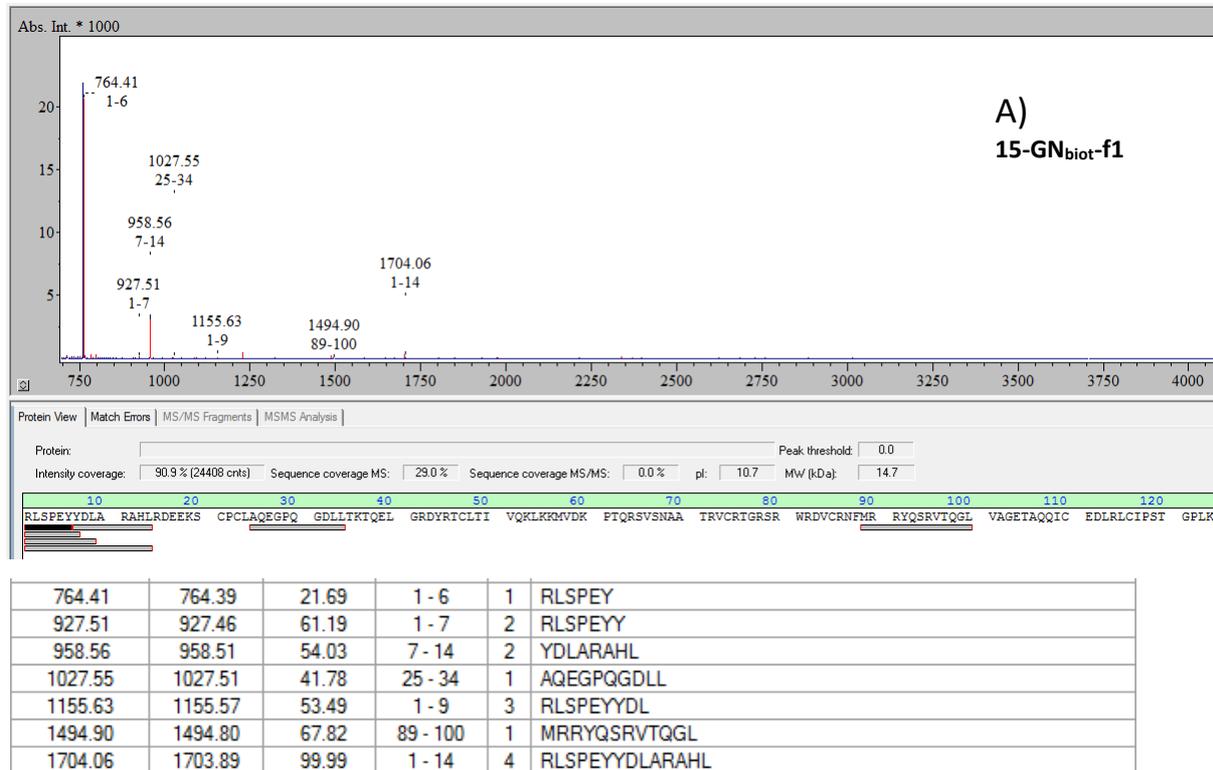


Figure S 95. MALDI-TOF analysis of the tryptic digest: results obtained with 15-GN_{biot}-f1 (A) and 15-GN_{biot}-f2 (B). Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. A) VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 866.40, found 866.49; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 2933.51, found 2933.73; SC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDLLTK linked to glutathione by disulfide bridge and to LC¹³⁸IPSTGPLK by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 3315.56, found 3315.83 B) VC⁹⁶R linked to DVC¹⁰⁷R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 866.40, found 866.49; TC⁶⁹LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC¹³²EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 2933.51, found 2933.71; SC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDLLTK oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 1757.82, found 1757.95; AHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDLLTK oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 2736.31, found 2736.46.

Pepsin digestion

Separated **15-GN_{biot}-f1** and **15-GN_{biot}-f2** fractions were dried under vacuum and dissolved in 10 µL solution of pepsin (200 ng/µL in trifluoroacetic acid 1/1000 in water). The digestion was carried out at 37 °C. The digestion was carried out at 37 °C and the progress of the enzymatic reaction was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry (Figure S 96).



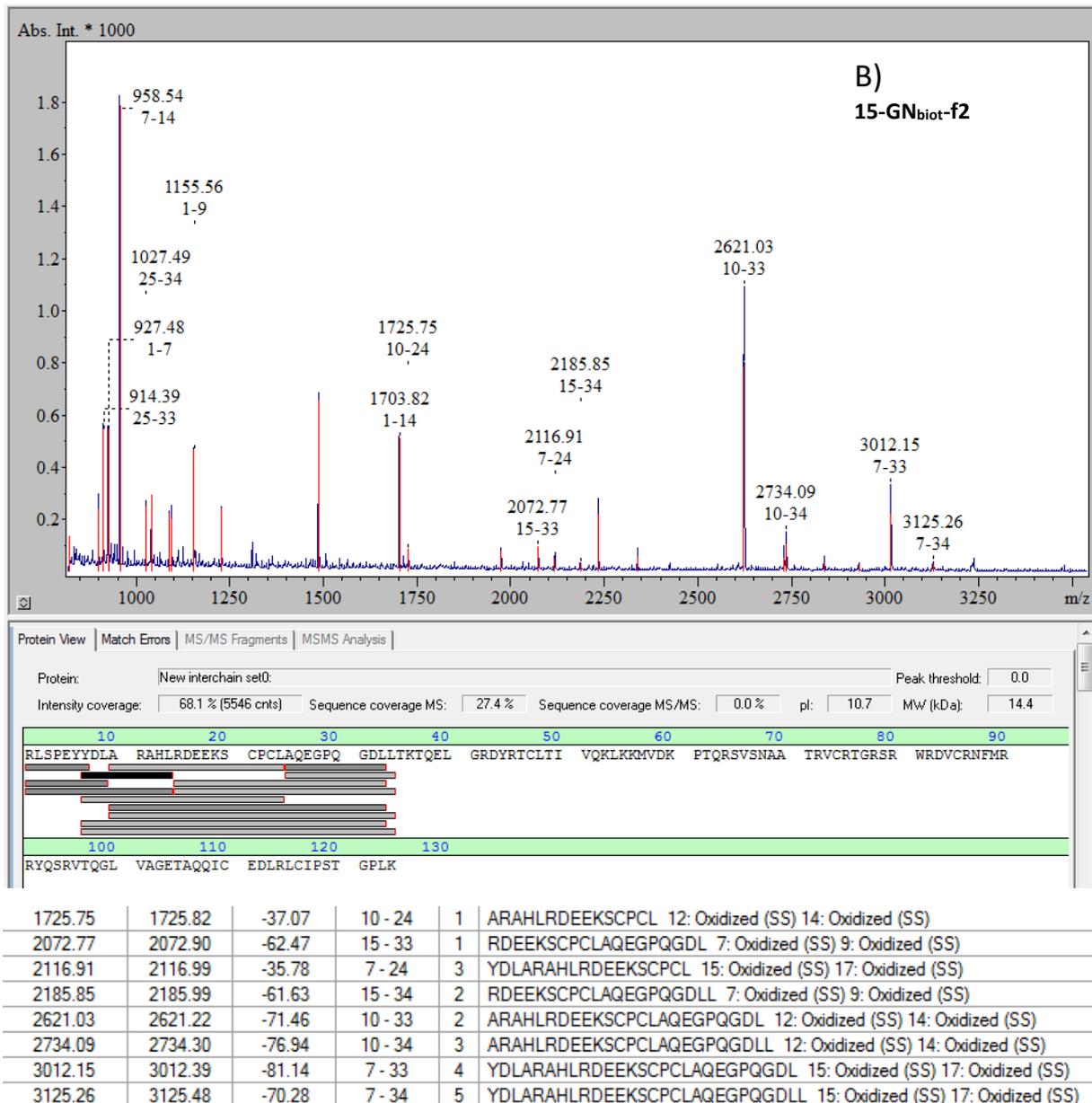


Figure S 96. MALDI-TOF analysis of the pepsin digest results obtained with 15-GN_{biot}-f1 (A) and 15-GN_{biot}-f2 (B). Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. A) None of the found peptides was useful for disulfide bridge pattern determination. B) ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵L oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 1725.82, found 1725.75; RDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2072.90, found 2072.77; YDLARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵L oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2116.99, found 2116.91; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2621.22, found 2621.03; ARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 2734.30, found 2734.09; YDLARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 3012.39, found 3012.15; YDLARAHLRDEEKSC⁴³PC⁴⁵LAQEGPQGDL oxidized, calcd. (monoisotopic) [M+H⁺] 3125.48, found 3125.26.

6. Structural characterization using circular dichroism

N-ter_{15-GN}, **C-ter_{15-GN}**, **9-GN**, **15-GN**, or **15-GN_{biot}** were solubilized in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2). The concentration of **N-ter_{15-GN}**, **9-GN**, **15-GN**, and **15-GN_{biot}** was determined by measuring the absorbance at 280 nm using Nanodrop[®] apparatus. The concentration of **C-ter_{15-GN}** peptide solution was also determined by UV spectroscopy by measuring the absorbance at 205 nm.⁸

The stock solutions of **N-ter_{15-GN}**, **9-GN**, **15-GN** and **15-GN_{biot}** proteins were diluted with 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) to a final concentration of ~13-17 μ M for CD analysis. The concentration of the **C-ter_{15-GN}** peptide in the same buffer was ~83-89 μ M.

The circular dichroism spectra were recorded on a CD6 spectropolarimeter (Jobin-Yvon) at 25 °C over the range 185-260 nm using 0.1 cm path-length cell and by averaging 40 scans. A 2 nm bandwidth, 1 nm data pitch were used for spectral acquisition and 3 s integration time. Three independent measurements were performed for each product.

The results are presented as $[\Theta]_{MRW}$ (mean of \pm 95% confidence limits) against the wavelength between 185 and 260 nm.⁹

The α -helical content of the proteins (mean of \pm 95% confidence limits) was estimated using the empirical equation of Greenfield and Fasman.¹⁰

The experimental CD data were also deconvoluted using Dichroweb online server¹¹ (CDSSTR algorithm^{12,13}). Spectra deconvolution for 15-GN-f is given in Figure S 97.

⁸ Anthis, N. J.; Clore, G. M. Sequence-Specific Determination of Protein and Peptide Concentrations by Absorbance at 205 nm. *Prot. Sci.* **2013**, *22*, 851-858.

⁹ Hartland, G. V. Statistical Analysis of Physical Chemistry Data: Errors Are Not Mistakes. *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124*, 2109-2112.

¹⁰ Greenfield, N.; Fasman, G. D. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108-4116.

¹¹ Whitmore, L.; Wallace, B. A. Dichroweb, an Online Server for Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopic Data. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W668-673.

¹² Sreerama, N.; Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 252-260.

¹³ Lees, J. G.; Miles, A. J.; Wien, F.; Wallace, B. A. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 1955-1962.

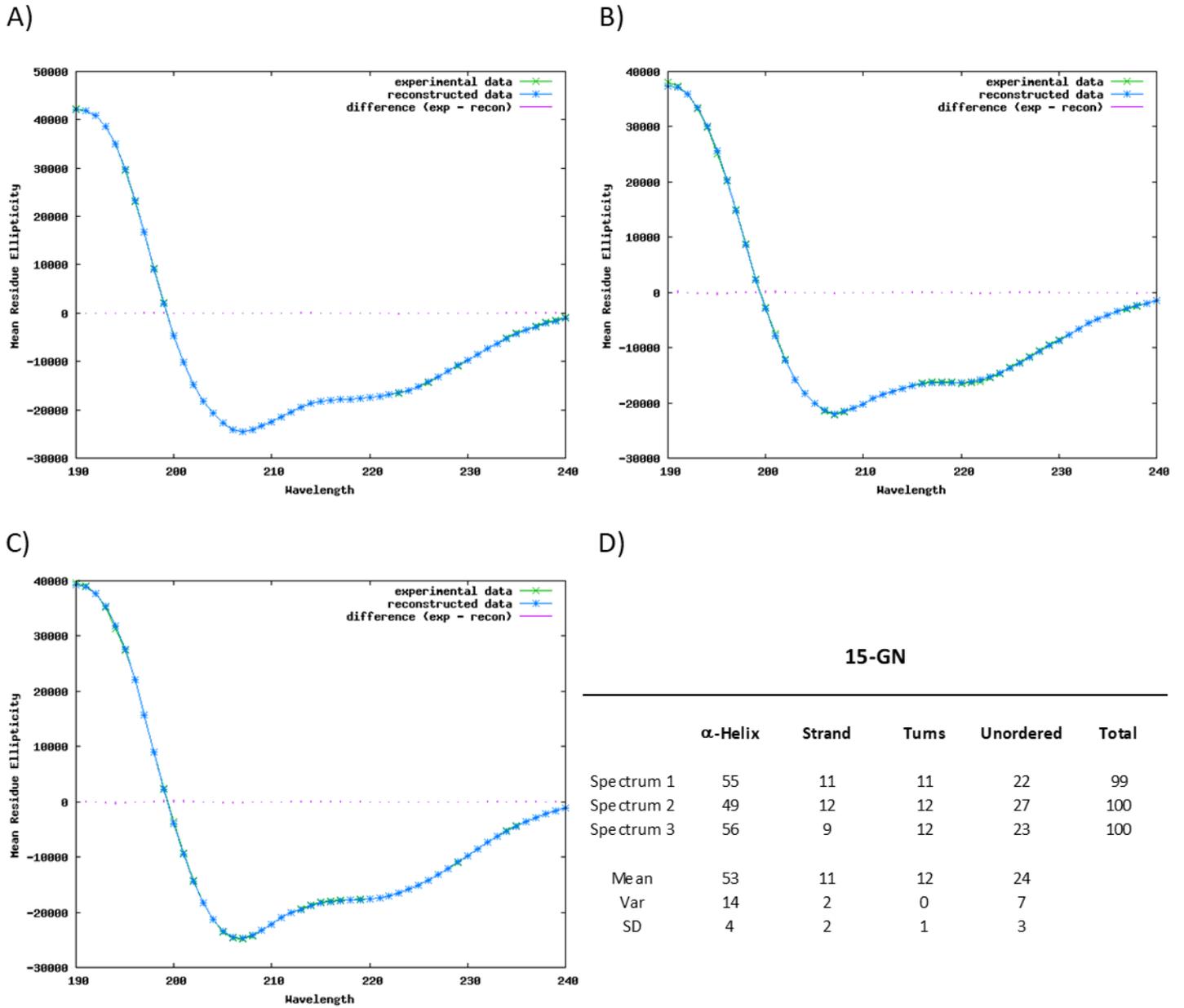


Figure S 97 Dichroism deconvolution using CDSSTR algorithm and SP175 protein data set for a set of 3 spectra recorded for 15-GN-f. A) Deconvolution of experimental spectrum 1. B) Deconvolution of experimental spectrum 2. C) Deconvolution of experimental spectrum 3. D) Results of deconvolution

7. Biological characterization

7.1. Chemotaxis assays

Monocyte migration assays (5×10^4 cells/well in 50 μL of RPMI 1640 medium, with or without 10% FBS) were performed in a 48-well Boyden microchamber (Neuroprobe) through a standard 5- μm pore filter (Neuroprobe), at 37°C for 1 hour. Migration was evaluated in response to synthetic granulysin (0.1 to 100 nM in RPMI 1640 medium containing or not 10% FCS), CCL2 used as positive control (200 ng/mL; R&D Systems), and medium alone used as negative control. Migrated cells were counted after staining onto the lower side of the filter in three randomly selected high-power fields (magnification $\times 100$). Each assay was performed at $n=9$ replicates. Results are expressed as the difference between mean numbers of cells per high power fields minus the negative control (medium alone).

7.2. Antibacterial activity measurement

Bactericidal activity of commercial recombinant 15-GN (R&D systems) and **15-GN-f** was assayed following the latest recommendation of the French Microbiology Society's antibiogram committee.¹⁴

Briefly, freshly isolated *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain was grown onto Mueller-Hiton agar. Inoculum at OD 0.9 (600 nm) was diluted to 1/500 with to reach 10^6 CFU/mL. Bacteria suspension was distributed in 96-well plate (50 μL /well) and granulysin solution in PBS was added (50 μL) to reach the desired final GN concentrations (0, 5, 10 20 and 40 μM). Bacteria were incubated at 37 °C and the optical density is measured at 600 nm after 4 and 22 hours.

7.3. Macrophage immunomodulation assays

GM-CSF-differentiated (M1) and M-CSF-differentiated (M2) macrophages were prepared from primary monocytes isolated from buffy coats of healthy human donors. Monocytes were differentiated in 24-well plate for 7 days in 500 μL of RPMI 1640 medium supplemented with glutamine, 10% fetal bovine serum, 100 mg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin. Recombinant human GM-CSF (20 ng/ml, R&D systems) or recombinant human M-CSF (10 ng/ml, R&D systems) was added to promote differentiation. Cells were supplied with fresh medium and cytokines on day 3 or 4. On day 7 macrophages were stimulated with 10 nM of GN analogs with or without 10 nM of LPS. Supernatants were collected 24 hours after stimulation, frozen for storage less than 60 days, thawed overnight at 4 °C and analyzed for IL-8 and IP-10 by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D systems).

¹⁴ CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie Ed ; 2020.

8. Flow cytometry

THP-1 cells, U-937 cells, purified human monocytes, and CD14⁻ immune cells were harvested by centrifugation (300 x G for 5 min at 4°C) and washed one time in 1 mL of ice cooled PBS. Cells were next fixed in 200 µL fresh 1% paraformaldehyde (16% stock solution, Thermo scientific, ref: 28908) for 20 min at 4°C into a 1.5 mL low-binding polypropylene tube (Protein LoBind[®] Tubes, Eppendorf). Cells were extensively washed one time in 1mL of ice cooled PBS (300 x G, 5 min, 4°C). Cells pellets were suspended in 200 µL of a 500 nM preformed **15-GN_{biot}-f**/Streptavidin AlexaFluor488 complex diluted in PBS (30 min at 20°C in a 1:1 ratio). Cells were incubated for 30-45 min at 4°C, shaken every 10 min and then quickly washed once in 1mL of ice cooled PBS, resuspended in 200-300 µL of PBS and distributed in FACS tubes. Cells were analyzed on a LSR Fortessa cytometer. CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes and B lymphocytes were discriminated from CD14⁻ immune cell fraction by addition of anti-CD3, anti-CD4, antiCD8 and anti-CD19.

For competition experiment, after paraformaldehyde fixation and the associated wash, cells pellets were suspended in 200 µL of a 500 nM preformed **15-GN_{biot}-f**/Streptavidin AlexaFluor488 complex diluted in PBS (30 min at 20°C in a 1:1 ratio) and also containing 50 µM of **15-GN-f**. Cells were incubated for 30-45 min at 4°C, shaken every 10 min and then quickly washed once in 1mL of ice cooled PBS, resuspended in 200-300 µL of PBS and distributed in FACS tubes. Cells were analyzed on a LSR Fortessa cytometer. CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes and B lymphocytes were discriminated from CD14⁻ immune cell fraction by addition of anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD19.

9. Confocal microscopy

15-GN labelling observation on suspended cells

One to two millions of THP-1 cells, U-937 cells or primary monocytes were harvested by centrifugation (115 x G for 5 min at 4°C) and washed three times in 1 mL of ice cooled PBS. Cells were next fixed in 200 µL fresh 1% paraformaldehyde (16% stock solution, Thermo scientific, ref: 28908) in PBS for 20 min at 4°C into a 1.5 mL low-binding polypropylene tube (Protein LoBind® Tubes, Eppendorf). Cells were extensively washed 3 times in ice cooled PBS (115 x G, 5 min, 4°C). Cells pellets were suspended in 200 µL of a 500 nM preformed **15-GN_{biot-f}**/Streptavidin AlexaFluor488 complex diluted in PBS (30 min at 20°C in a 1:1 ratio). Cells were shaken for 30-45 min at 4°C on an orbital rocker (25 rpm). They were next incubated with an additional 200µL of PBS containing 4µL of a Concanavalin A Alexa594 solution at 5 mg/mL in 0.1 M NaHCO₃ (100 µg/mL final concentration) (Invitrogen, ref: C11253) for 30 min. Cells were quickly washed twice in ice cooled PBS. Final cell pellets were mixed into 80 µL of Mowiol solution supplemented with 3 nM DAPI (Merck, ref: MBD0015). Drops of cell suspension were placed between glass slides and coverslip (0.17 µm), stabilized overnight and sealed with nail polish before observation.

15-GN labelling observation on PMA differentiated cells

Ten million of THP-1 or U-937 cells were harvested by centrifugation (115 x G for 5 min at 4°C) and suspended in 10 mL of RPMI. 200 µL of cell suspension were seeded on 12-mm glass coverslips in a 24-well plate. 200 µL of 200 ng/mL PMA solution in RPMI was the added and cell were incubated at 37 °C for 72 h. Differentiated THP-1 cells were washed three times in PBS and fixed in 250 µL of 1% paraformaldehyde (16% stock solution, Thermo scientific, #28908) in PBS for 20 min at 4°C. After three washes with 1 mL of PBS, the cells were pretreated with a 250 µL of a blocking 1% casein in PBS solution for 30 min at 4 °C. Cells were next incubated with 250 µL of a 500 nM preformed **15-GN_{biot-f}**/Streptavidin AlexaFluor488 complex diluted in PBS (30 min at 20°C in a 1:1 ratio) for 30-45 min at 4°C on an plate shaker. Cells were quickly washed three times in ice cooled PBS. The coverslip is recovered and placed on a 14 µL drop of a Mowiol solution supplemented with 3 nM DAPI (Merck, #MBD0015), stabilized overnight and sealed with nail polish before observation.

15-GN and immune labelling observation on suspended cells

One to two million of THP-1 cells, U-937 cells or primary monocytes were harvested by centrifugation (115 x G for 5 min at 4°C) and washed three times in 1 mL of PBS. Cells were next fixed in 200 µL fresh 1% paraformaldehyde (16% stock solution, Thermo scientific, ref: 28908) in PBS for 20 min at 4°C into a 1.5 mL low-binding polypropylene tube (Protein LoBind® Tubes, Eppendorf). Cells were extensively washed 3 times in PBS (115 x G, 5 min, 4°C). Cells pellets were suspended in 200 µL. of a blocking 1% casein in PBS solution for 30 min at 4 °C. They were next incubated with 200 µL of 1/500 primary antibody solution (Anti-TLR4, Invitrogen Anti-CD284, ref 14-9917-82; anti-PDIA1 Abcam anti-P4HB [EPR9499], ref ab137110) in 1% casein in PBS at 4 °C for 3 hours. Cells were then washed three times with ice cold PBS and incubated with 200 µL of 1/1000 fluorescent secondary antibody solution (Life Technology AlexaFluor594 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) 2 mg/mL, ref: A11020, batch: 1750279; Life Technology AlexaFluor594 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) 2 mg/mL, ref: A11072, batch: 1736979) in 1% casein in PBS at 4 °C for 1 hour. Preformed **15-GN_{biot-f}**/Streptavidin AlexaFluor488 complex (1:1 ratio) was then added to reach 500 nM final concentration and cells were further incubated for 30 min at 4 °C. Cells were quickly washed three times in ice cold PBS. Final cell

pellets were mixed with 80 μL of a Mowiol solution supplemented with 3 nM DAPI (Merck, #MBD0015). Drops of cell suspension were placed between glass slides and coverslip (0.17 μm), stabilized overnight and sealed with nail polish before observation.

Image acquisition

Images were acquired using Yokogawa Spinning disk CSUW1 confocal scanner unit on a Nikon L2 5E8A using Roper Live SR module, sCMOS Prime95b detectors (3 channels: 405/488/561 nm) and 60x oil immersion lens. Live SR processing was conducted using Metamorph software. The Imaris software (Oxford Instruments) was used to produce a 3D views and extended orthogonal XZ and YZ views.

Colocalization calculation

Colocalizations were estimated using the built-in spot detection algorithm of Imaris software. Based on multiple measurements, spots were modelled as 0,4 μm XY diameter and 0.8 μm Z diameter. Quality detection on 488 and 561 channels were respectively placed at 6 and 4. Spots were considered colocalized under 0.4 μm of distance. Example of spot modelling is given in Figure S 98 for THP-1 cells treated with anti-TLR4/anti-mouse AlexaFluor594 and **15-GN_{biot}-f**/Streptavidin AlexaFluor488.

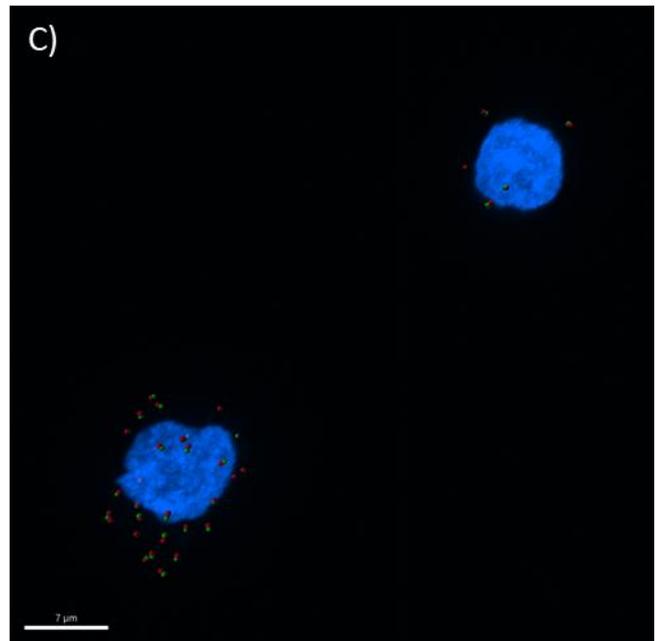
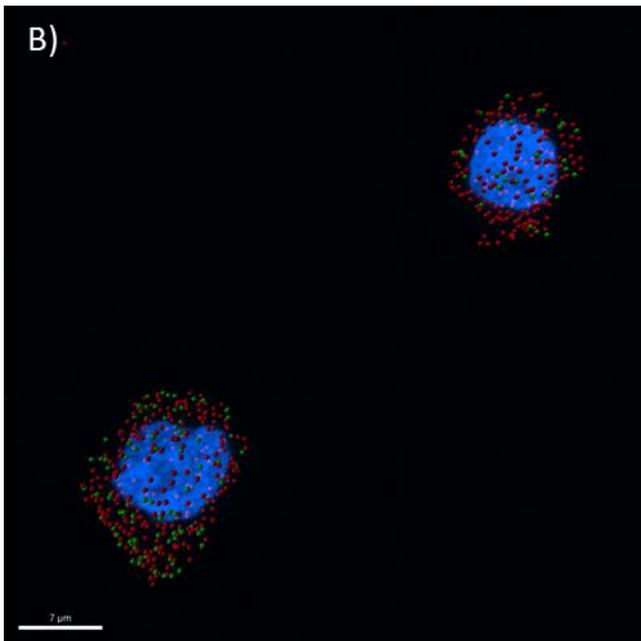
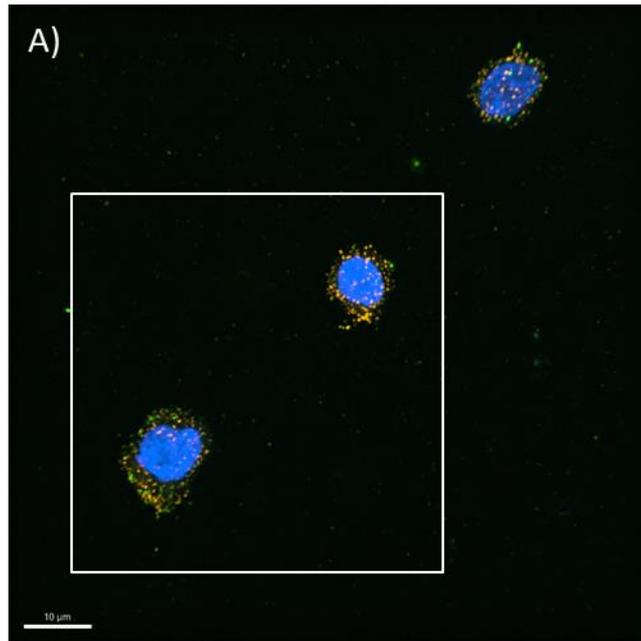


Figure S 98 Spot modeling and colocalization between 15-GNbiot-f and TLR4. A) Original 3D reconstruction. White square defines the contours of B and C images. B) Spot modelling for 488 and 561 nm channels. C) Colocalized spots.

10. Pull down assays

50 μL of GE Healthcare Streptavidin Mag Sepharose bead suspension (ref: 28-9857-99, batch: 10272372) were washed three times with PBS. Beads were then incubated with 500 μL of a 770 nM **15-GN_{biot-f}** solution in PBS at room temperature for 30 min and washed three times with 800 μL of PBS.

THP-1 or U-937 lysate was prepared from 8 million of cells. Cells were harvested by centrifugation (115 x G for 5 min at 4°C) and washed three times in 10 mL of ice cooled PBS. Cell pellet was resuspended into 500 μL of ice cooled PBS containing protease inhibitors (Sigma, protease inhibitor cocktail, ref: P8340, batch, 077M4042V). Cells were lysed by 10 suction/discharge cycles in a 2 mL syringe fitted with a 27^{3/4} G needle. The resulting lysate was centrifugated (600 x G for 5 min at 4°C) and supernatant containing membrane and vesicles was added on GN-preloaded beads for 30 min at 4 °C.

Beads were then washed three times with 1 mL ice cooled PBS and eluted as follow,

- With 50 μL of glycine 200 mM in water, pH 5.
- With 50 μL of glycine 200 mM in water, pH 4
- With 50 μL of glycine 200 mM in water, pH 3
- With 100 μL of ice cooled PBS
- With 50 μL of TCEP 20 mM in PBS, pH 7.2
- With a mixture of 50 μL water, 17.5 μL of SDS Sample buffer 4X (Invitrogen NuPAGE™, ref: NP0007, batch: 2165457) and 6.75 μL of a mixture of 2.45 M DTT and 2.45 M mercaptoethanol in water and heated at 100 °C for 10 min.

11. SEA/thioester exchange catalysis

11.1. Synthesis of diselenide **6**

Diselenide catalyst **6** was prepared as described below in Figure S 99.

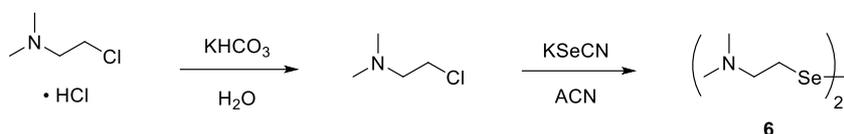


Figure S 99. Synthesis scheme for the preparation of diselenide catalyst **6**.

To a solution of potassium bicarbonate (11.5 g, 0.083 mol) in water (30 mL), was added 2-chloroethyl-*N,N*-dimethylamine hydrochloride (6.0 g, 0.042 mol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 10 min. The resulting crude mixture was extracted 3 times with 30 mL of Et_2O , dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure. 1g of the resulting pale yellow oil (9.3 mmol) was diluted in 90 mL of acetonitrile and potassium selenocyanate (1.47 g, 10.2 mmol) was added portionwise. The resulting solution was stirred at room temperature for 16 h. Et_2O (100 mL) was added to the reaction mixture which was then filtered through a pad of celite. The filtrate was evaporated in vacuo and then redissolved in 120 mL of absolute ethanol. Aqueous sodium hydroxide (60 mL, 1 M) was added slowly under stirring and the reaction mixture stirred 3 h at room temperature. The resulting mixture was concentrated in vacuo to remove the maximum of ethanol and extracted 3 times with 30 mL of Et_2O . The organic layers were combined, dried over MgSO_4 and concentrated under reduced pressure to afford the tittle compound (**6**) as a yellow oil (1.24 g, 4.09 mmol, 88%). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 3.10 – 2.96 (m, 4H), 2.68 – 2.55 (m, 4H), 2.25 (s, 12H). (see Figure S 100) $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 60.32, 45.20, 28.20. (see Figure S 101) **MALDI-TOF** Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for $[\text{M}+\text{H}]^+$ (exact): 305.00, found: 304.92.

Characterization of 6

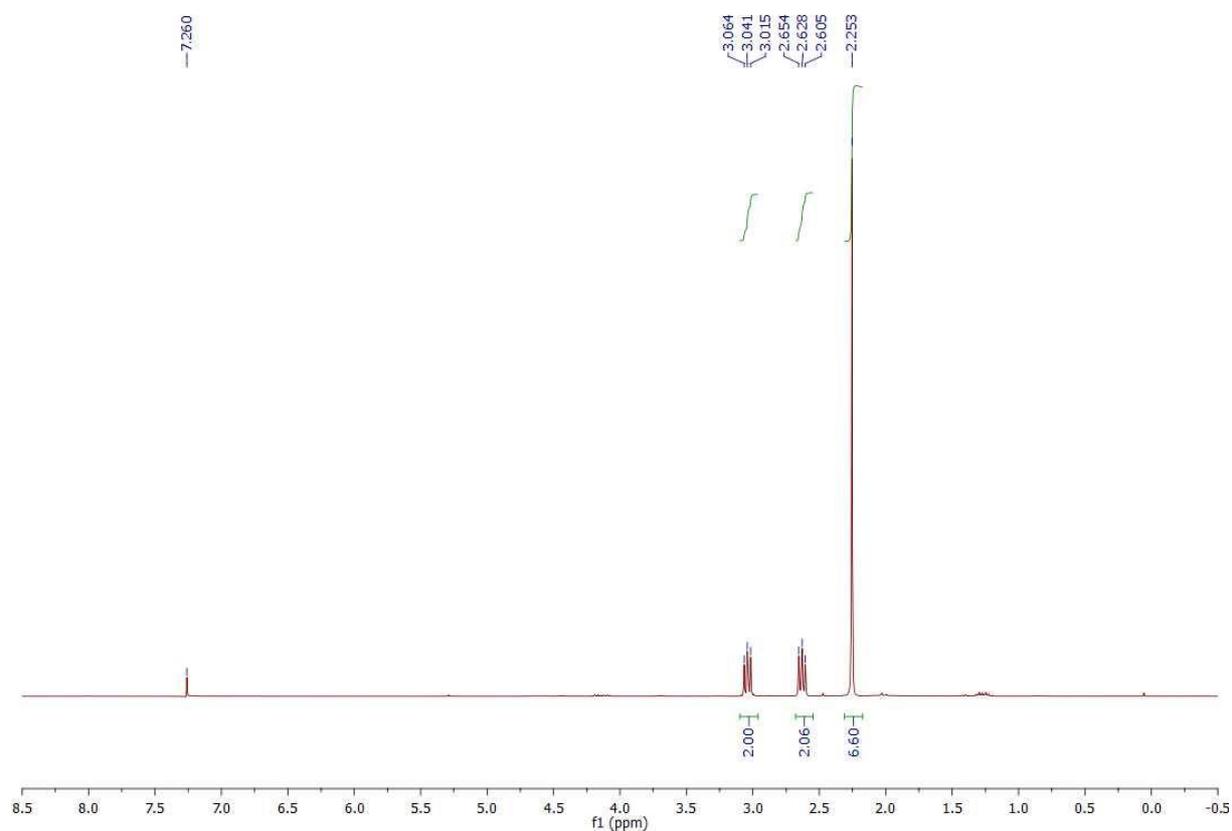


Figure S 100. ¹H NMR (300 MHz) spectrum of compound 14 (CDCl₃, 293 K)

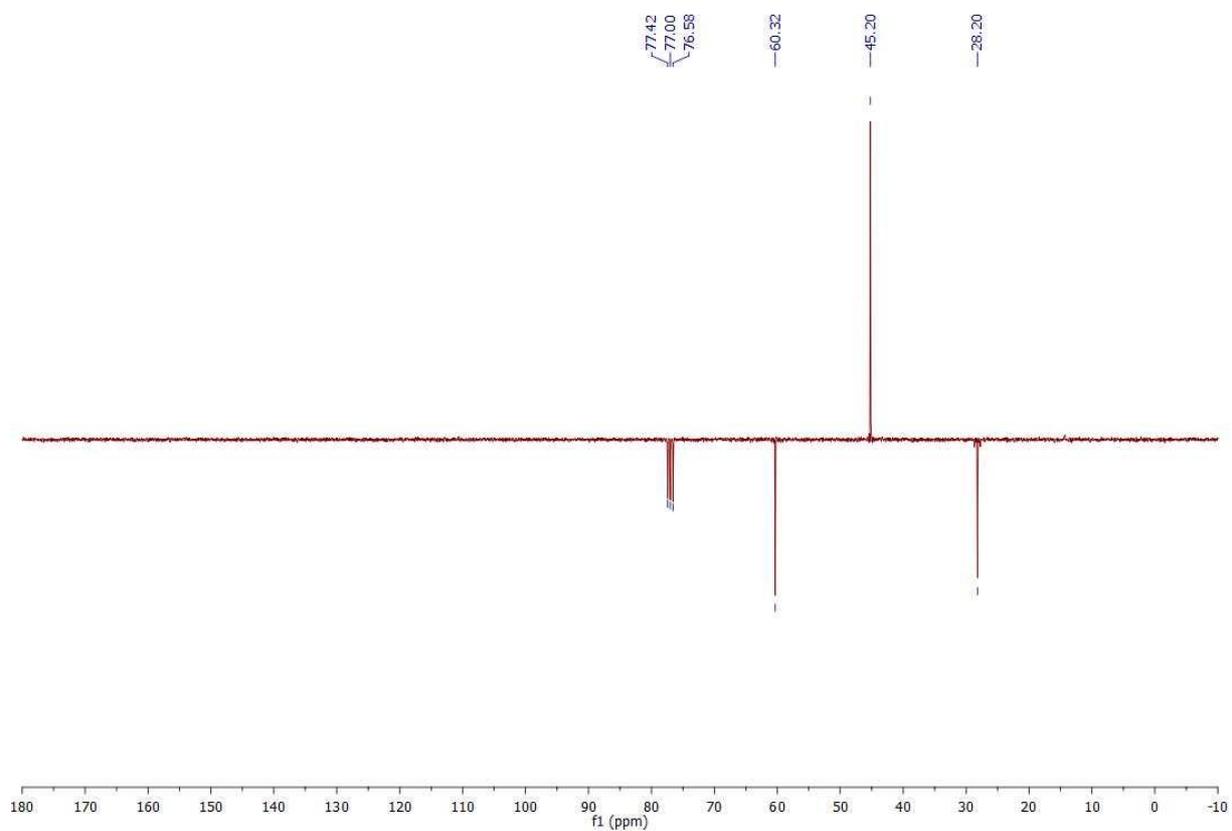


Figure S 101. ¹³C JMOD NMR (75 MHz) spectrum of compound 6 (CDCl₃, 293 K).

11.2. Synthesis of diselenide **7**

Bis(2-dimethylaminoethyl)diselenide **7** (600 mg, 1.99 mmol) was dissolved in 40 mL of diethyl ether/acetone 1/1 (v/v). A methyl iodide solution (396 μ L, 6.41 mmol) was slowly added and the reaction mixture was stirred 2 h at room temperature. The crude precipitate was collected by filtration and washed 3 times with 10 mL of cold diethyl ether/acetone 1/1 (v/v). The crude solid diselenide **7** was dried overnight under vacuum and then recrystallized from methanol to provide diselenide **7** as yellow crystals (462 mg, 0.788 mmol, 40 %). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ (ppm) 3.71 – 3.66 (m, 4H), 3.30 – 3.25 (m, 4H), 3.12 (s, 18H) (see Figure S 102). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, D_2O) δ (ppm) 67.63, 52.85, 19.62 (see Figure S 103).

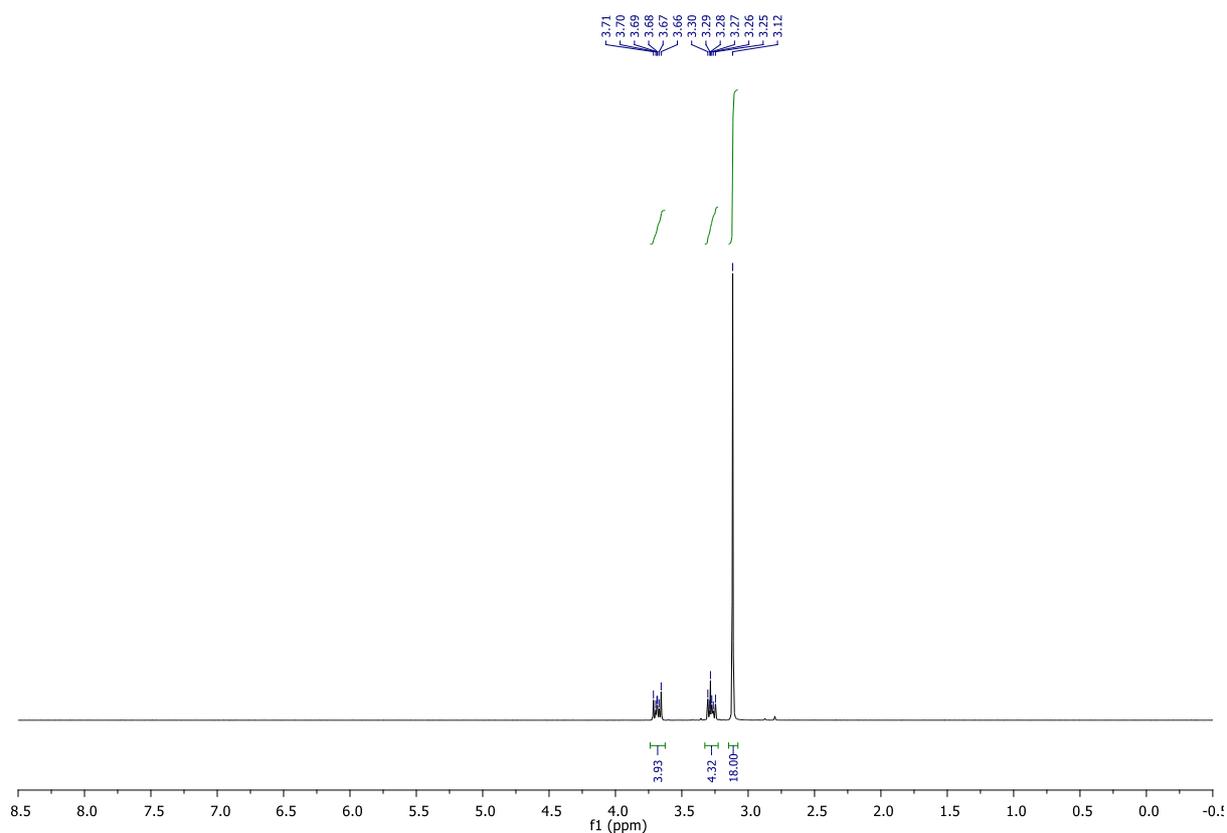


Figure S 102. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz) spectrum of compound **7** (D_2O , 293 K).

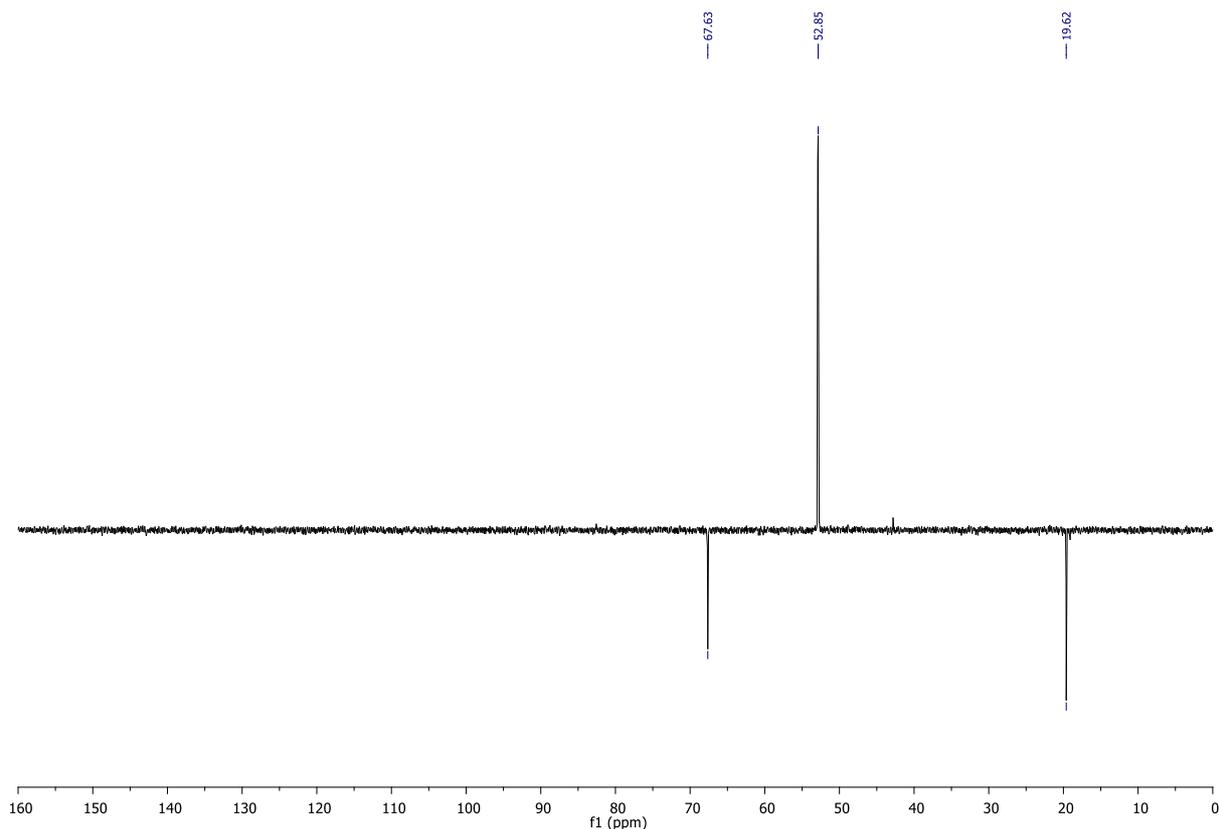


Figure S 103. ^{13}C JMOD NMR (75 MHz) spectrum of compound **7** (D_2O , 293 K).

11.3. Kinetic studies and modeling

Generalities

Kintek Global Kinetic Explorer Software (version 10.0.200514) was used for kinetic modelization. The model reaction used for numerical fitting corresponds to a second-order reaction in the form of $\text{A} + \text{B} \rightarrow \text{C}$.

The standard deviation for each trace was first estimated upon fitting the experimental dataset with an analytical function (3-exponential) so as to determine an average sigma value further used for numerical data fitting. The subsequent numerical fit allowed determining the apparent second order rate constant k_{app} for each experiment. Fitting to a given model was achieved by nonlinear regression analysis based upon an iterative search to find a set of reaction parameters that gives a minimum χ^2 . The process was completed by careful visual examination of the fits.

Rate constants of uncatalyzed and catalyzed SEA peptide / MPA exchange reactions

Experimental procedure

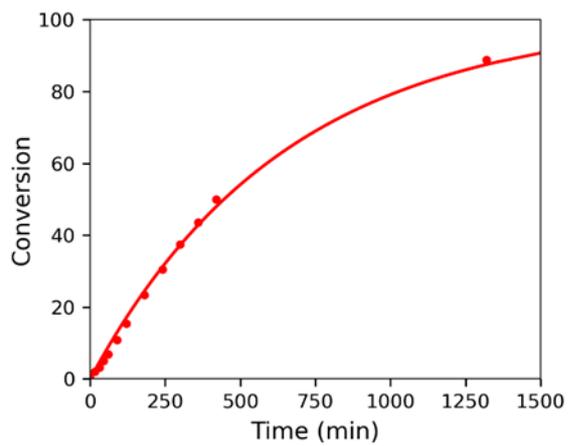
The general procedure for studying the effect of the catalyst and catalyst concentration on the rate of thiol-thioester exchange is illustrated with the following conditions: 1 mM SEA-peptide, 6 M $\text{Gn}\cdot\text{HCl}$, 100 mM diselenide precatalyst **17**, 100 mM TCEP, 3-mercaptopropionic acid (5% v/v), pH 4.0 in 0.1 M phosphate buffer at 37 °C.

To a solution of TCEP-HCl (28.67 mg, 100 μmol , 100 mM final concentration) in 6 M Gn-HCl, 0.1 M, pH 7.2 sodium phosphate buffer (1 mL) was added the alkyldiselenide precatalyst **17** (30.2 mg, 0.1 mmol, 100 mM final concentration). To the resulting mixture was added MPA (5% v/v). Finally, the pH was adjusted to 4.0 by addition of 6 M NaOH and the SEA peptide (1.42 mg, 1.0 μmol) was dissolved in the previous solution. The reaction mixture was stirred at 37 °C under nitrogen atmosphere. The progress of the reaction was monitored by HPLC. For each point, a 2 μL aliquot was taken from the reaction mixture and quenched by addition of 50 μL of 10% aqueous AcOH. The chromatograms were processed on the basis of the absorbance signal at 215 nm to deduce the conversion ratio of the different species (no absorbance correction was applied as SEA peptides and MPA thioester were considered to have the same molecular extinction coefficient).

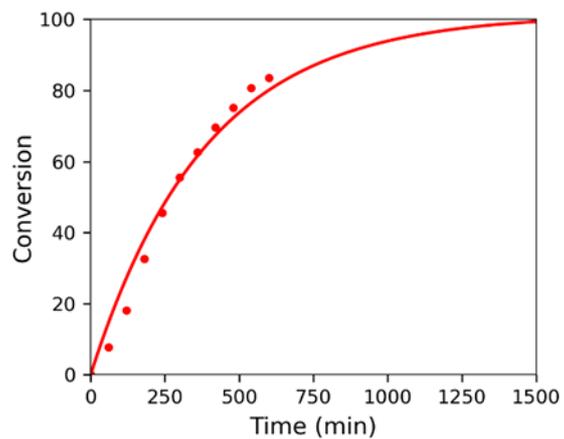
Results

Catalyst (Precatalyst)	Total selenol or thiol concentration (mM)	$k_{\text{app}} \cdot 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	StdErr $\cdot 10^{-3}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
-	-	2.68	0.56
MPAA ^a	100	4.52	2.65
3	200	10.22	1.28
1 (6)	200	11.9	1.94
1 (6)	100	9.67	0.49
1 (6)	50	9.07	0.92
1 (6)	25	6.27	0.51
1 (6)	12.5	4.36	0.78
1 (6)	6.25	3.42	0.38

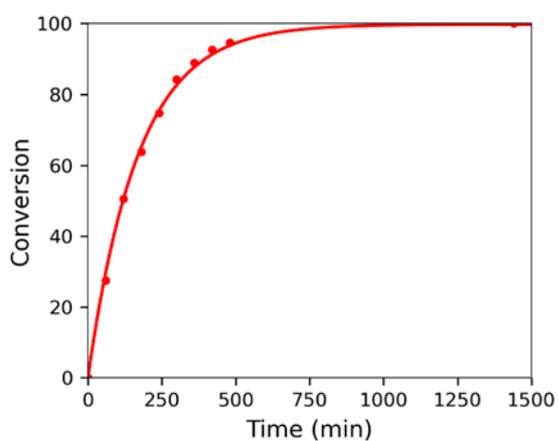
Table S 1 Kinetic data extracted from curve fitting. General conditions are as follows: 1 mM SEA-peptide, 6 M Gn-HCl, catalyst, 100 mM TCEP, 3-mercaptopropionic acid (5% v/v), pH 4.0 in 0.1 M phosphate buffer at 37 °C. Rate constants were extracted using Kintek Explorer SoftwareTM. A standard deviation estimate for experimental measurements was obtained from fitting with a multi-exponential function. Rate constants and associated standard errors were produced by χ^2 minimization fitting. Standard errors were estimated based upon the covariance matrix using Kintek software.^a Raw data with MPAA used as catalyst were extracted from reference 47 (J. Org. Chem. **2018**, 83, 12584–12594).



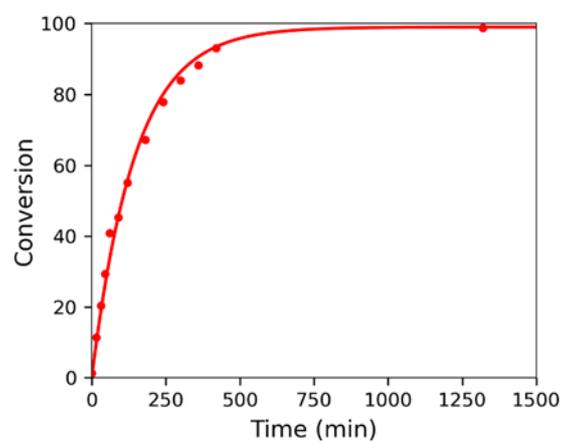
Uncatalyzed



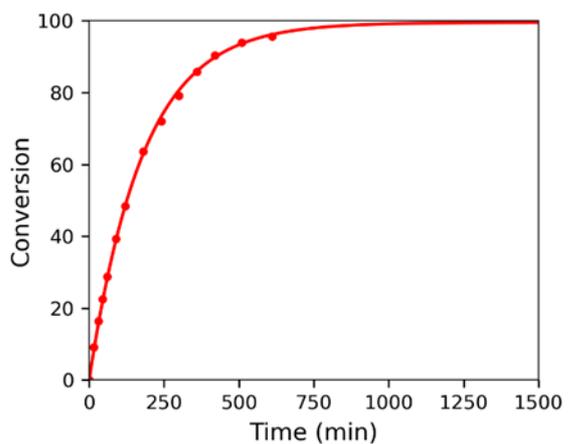
100 mM MPAA^a



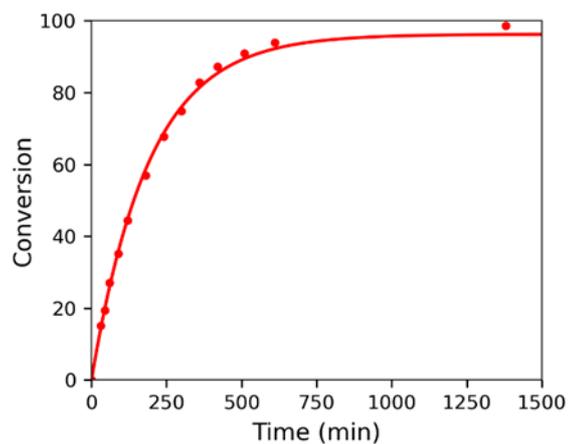
200 mM catalyst 3



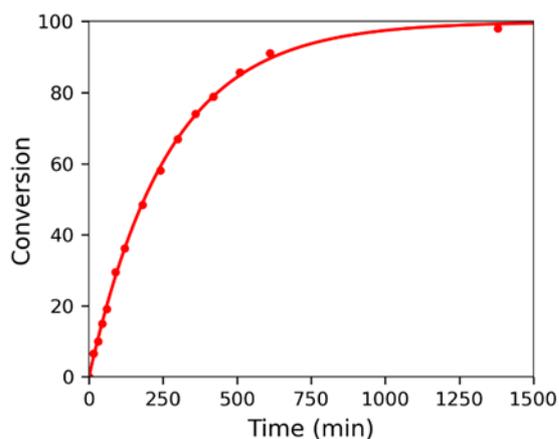
200 mM catalyst 1



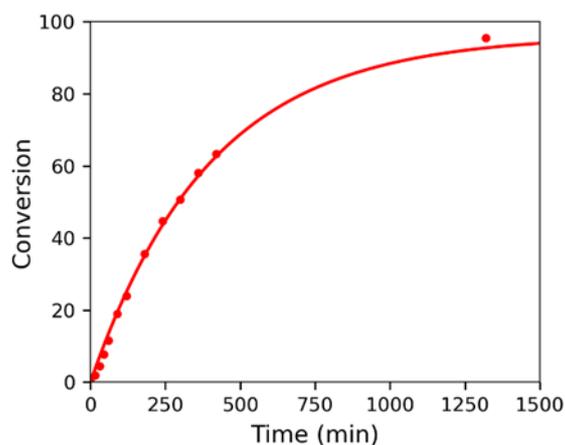
100 mM catalyst 1



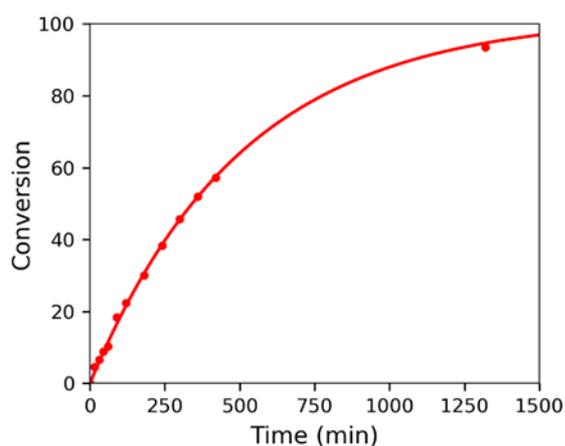
50 mM catalyst 1



25 mM catalyst 1



12.5 mM catalyst 1



6.25 mM catalyst 1

Figure S 104 Fitting of MPA thioester formation in the presence of catalysts. The dots correspond to experimental values. The continuous line corresponds to the fitting curve.^a Raw data with MPAA used as catalyst were extracted from reference 47 (J. Org. Chem. **2018**, *83*, 12584–12594).

Analytical approach

Data fitting based on numerical approaches (as proposed above) does not involve translating the problem into an analytical expression. Alternatively, the problem could be formulated analytically with respect to standard equations for a pseudo-first order kinetics. In this case, MPA is being considered as the reagent in large excess.

$$\text{Conversion of Product in \%age} = ([A]_0 - [A]_0 \cdot e^{-kt}) \cdot 100 / [A]_0 \quad (1)$$

with $[A]_0$ initial peptide concentration (M), k = pseudo-first order rate constant (min^{-1}), time (min)

We can verify that experimental data can be fitted to this equation (1). The red plots in the chart below represent the experimental datapoints for catalyst **13** used at 200 mM. The fitting curve (dashed line) was traced using equation (1) with a value of $[A]_0 = 0.001$ M and $k = 0.0119 \times 0.574 = 0.00686 \text{ min}^{-1}$.

The fit obtained (see) is perfectly consistent with the corresponding data presented in table S2 and obtained from the numerical approach.

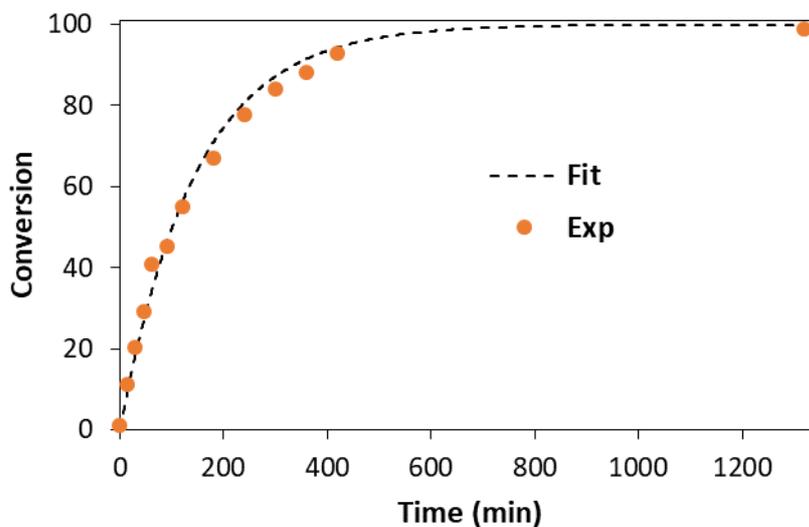


Figure S 105 Fitting of SEA/MPA exchange in the presence of catalyst 13 (200 mM). Data were fitted according to equation (1).

11.4. Additional mass spectrometry data for AcA-B-SEA transthioesterification

UPLC-MS analysis of the crude mixture for the uncatalyzed and catalyzed conversion of peptide AcA-B-SEA into AcA-B-MPA are respectively presented in Figure S 106 and Figure S 107.

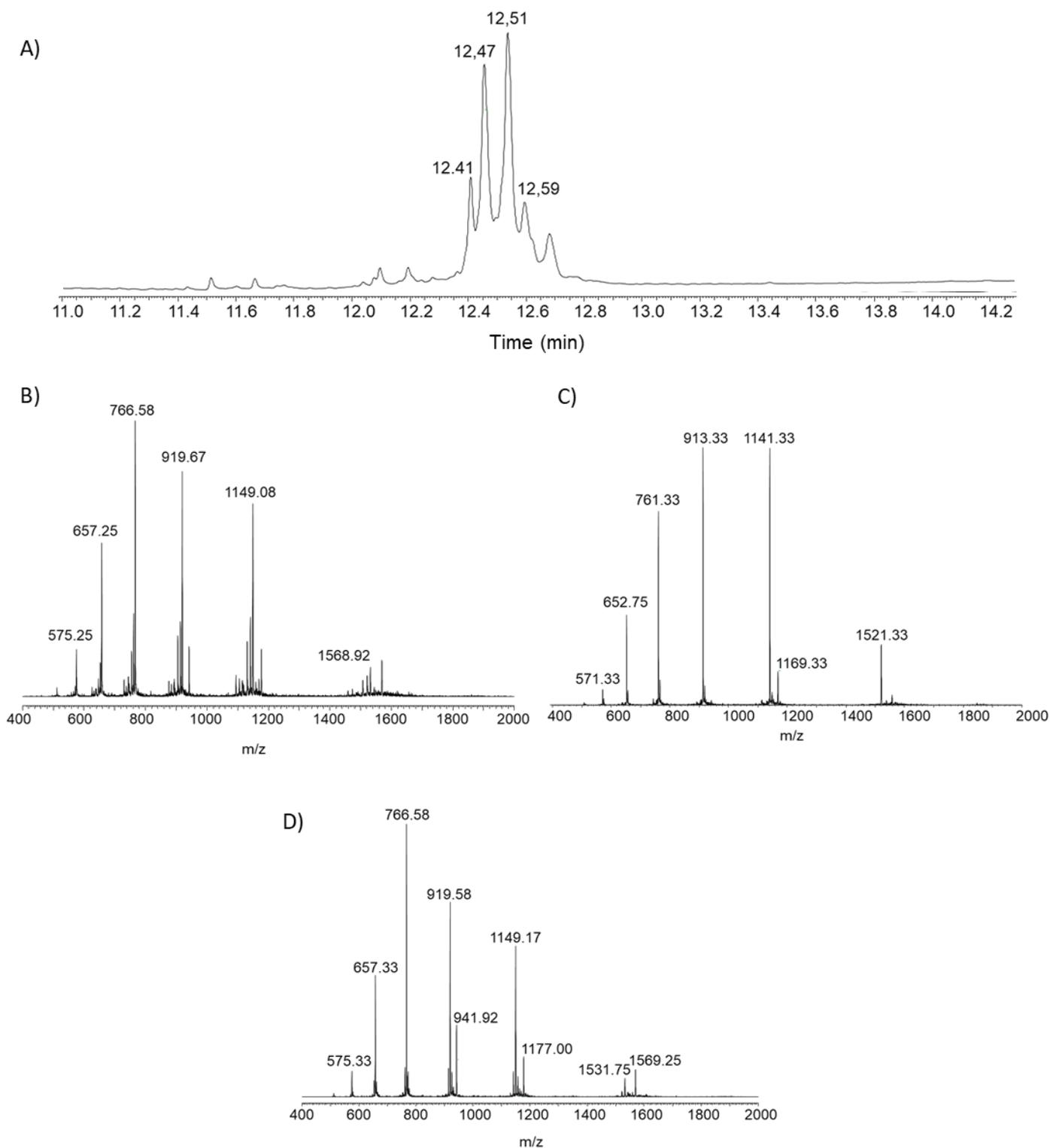


Figure S 106 UPLC-MS analysis of the crude mixture for the uncatalyzed conversion of peptide AcA-B-SEA into AcA-B-MPA. A) LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH_3CN . C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min^{-1} , UV detection at 215 nm. B) MS trace for $rt = 12.41$ min: m/z 1149.08 ($[M+4H]^{4+}$), 919.67 ($[M+5H]^{5+}$), 766.58 ($[M+6H]^{6+}$), 657.25 ($[M+7H]^{7+}$), 575.25 ($[M+8H]^{8+}$); calcd. for $[M]$ (average mass): 4592.8, found: 4593.2. C) MS trace for $rt = 12.47$ min: m/z 1141.33 ($[M+4H]^{4+}$), 913.33 ($[M+5H]^{5+}$), 761.33 ($[M+6H]^{6+}$), 652.75 ($[M+7H]^{7+}$), 571.33 ($[M+8H]^{8+}$); calcd. for $[M]$ (average mass): 4561.5, found: 4561.8. D) MS trace for $rt = 12.51$ min: m/z 1149.17 ($[M+4H]^{4+}$), 919.58 ($[M+5H]^{5+}$), 766.58 ($[M+6H]^{6+}$), 657.33 ($[M+7H]^{7+}$), 575.33 ($[M+8H]^{8+}$); calcd. for $[M]$ (average mass): 4592.8, found: 4593.2.

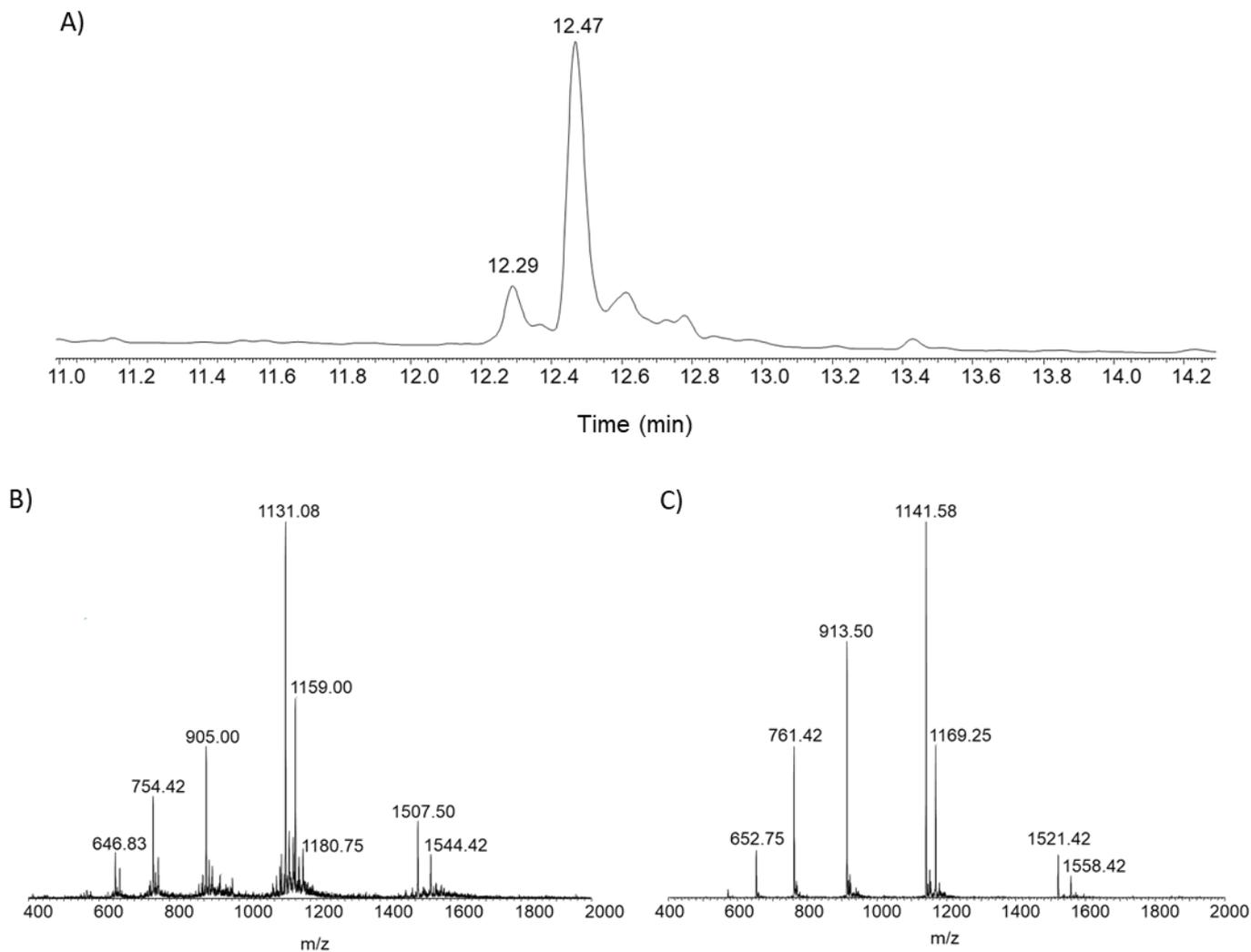


Figure S 107 UPLC-MS analysis of the crude mixture for the catalyzed conversion of peptide AcA-B-SEA into AcA-B-MPA with 25 mM of **6**. A) LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0-70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. B) MS trace for RT = 12.47 min: m/z 1507.50 ([M+3H]³⁺), 1131.08 ([M+4H]⁴⁺), 905.00 ([M+5H]⁵⁺), 754.42 ([M+6H]⁶⁺), 646.83 ([M+7H]⁷⁺); found for [M] (average mass): 4520. C) MS trace for RT = 12.47 min: m/z 1521.42 ([M+3H]³⁺), 1141.58 ([M+4H]⁴⁺), 913.50 ([M+5H]⁵⁺), 761.42 ([M+6H]⁶⁺), 652.75 ([M+7H]⁷⁺); calcd. for [M] (average mass): 4561.5, found: 4562.4.

Annexe 2. Article

Article

Insights into the Mechanism and Catalysis of Peptide Thioester Synthesis by Alkylselenols Provide a New Tool for Chemical Protein Synthesis

 Florent Kerdraon ¹ , Gemma Bogard ¹, Benoît Snella ¹, Hervé Drobecq ¹, Muriel Pichavant ¹, Vangelis Agouridas ^{1,2,*}  and Oleg Melnyk ^{1,*}

- ¹ U1019-UMR 9017—CIIL—Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France; florent.kerdraon@ibl.cnrs.fr (F.K.); gemma.bogard@inserm.fr (G.B.); benoit.snella@ibl.cnrs.fr (B.S.); herve.drobecq@ibl.cnrs.fr (H.D.); muriel.pichavant@pasteur-lille.fr (M.P.)
- ² Centrale Lille, F-59000 Lille, France
- * Correspondence: vangelis.agouridas@ibl.cnrs.fr (V.A.); oleg.melnyk@ibl.cnrs.fr (O.M.)

Abstract: While thiol-based catalysts are widely employed for chemical protein synthesis relying on peptide thioester chemistry, this is less true for selenol-based catalysts whose development is in its infancy. In this study, we compared different selenols derived from the selenocysteamine scaffold for their capacity to promote thiol–thioester exchanges in water at mildly acidic pH and the production of peptide thioesters from *bis*(2-sulfanylethyl)amido (SEA) peptides. The usefulness of a selected selenol compound is illustrated by the total synthesis of a biologically active human chemotactic protein, which plays an important role in innate and adaptive immunity.

Keywords: peptide thioester; alkylselenol; catalysis; chemical protein synthesis



Citation: Kerdraon, F.; Bogard, G.; Snella, B.; Drobecq, H.; Pichavant, M.; Agouridas, V.; Melnyk, O. Insights into the Mechanism and Catalysis of Peptide Thioester Synthesis by Alkylselenols Provide a New Tool for Chemical Protein Synthesis. *Molecules* **2021**, *26*, 1386. <https://doi.org/10.3390/molecules26051386>

Academic Editor: Luca D. D'Andrea

Received: 11 February 2021

Accepted: 27 February 2021

Published: 4 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Chemical protein synthesis is now established as an alternative mode of production of tailored proteins for use in diverse fields of research, primarily biological and medicinal research [1]. Thioester chemistry is central to the field of chemical protein synthesis by the frequent application of the native chemical ligation (NCL [2–6], Figure 1A) and desulfurization methods [7–10] to the chemoselective formation of peptide junctions to cysteine or alanine in water using unprotected peptide segments as reactants [11].

Besides the assembly of the protein itself and the acceleration of peptide bond formation [12–16], one limitation of chemical protein synthesis using NCL is the production of the peptide thioester segments [17]. Therefore, facilitating the access to the peptide thioesters using Fmoc-SPPS has been intensively pursued, especially during the last decade, and the progress made in this area explains in part the rapid increase in the number of protein targets assembled since 2010 [1,11]. One corpus of methods that has contributed to the progress of chemical protein synthesis exploits the capacity of *N*-(2-mercaptoethyl)amides, i.e., *N,S*-acyl shift systems [18–36], to rearrange into thioesters in aqueous media. Several of these systems have been validated by the synthesis of challenging proteins [37–44].

One popular mode of use of *N,S*-acyl shift systems is the production of alkylthioesters by exchanging the *N*-(2-mercaptoethyl)amine unit by a thiol used in excess, i.e., R'SH in Figure 1B. Such exchange reactions are equilibrated, the equilibrium being displaced toward the thioester form at acidic pH probably due to the masking of the departing *N*-(2-mercaptoethyl)amine by protonation [45]. Detailed mechanistic studies performed on the *bis*(2-sulfanylethyl)amido (SEA) system established that in such conditions the thiol–thioester exchanges are rate limiting. This is because thiol–thioester exchanges proceed preferably through thiolate species [46], while the attacking thiol R'SH in the process shown in Figure 1B is mostly in its neutral form at the acidic pH used for the exchange

reaction, typically pH 4 [47]. These mechanistic findings led to the conclusion that the production of peptide thioesters from SEA peptides might be facilitated by catalyzing the thiol/thioester exchange step shown in Figure 1B. Indeed, efficient catalysis could be achieved by using diselenol catalyst **8a** obtained by in situ reduction of diselenide **7a** ($R'' =$ alkyl group, Figure 1D), which in practice was found to be superior to other classical thiol or selenol additives for promoting the production of peptide thioesters from SEA peptides at pH 4. The design of catalyst **8a** has been inspired by the observation that the simpler diselenol **8b** ($R'' = H$, Figure 1D) was able to catalyze the SEA/thiol exchange reaction, albeit with byproduct formation due to the presence in **8b** of a nucleophilic secondary amine, hence the introduction of a blocking alkyl group on the nitrogen.

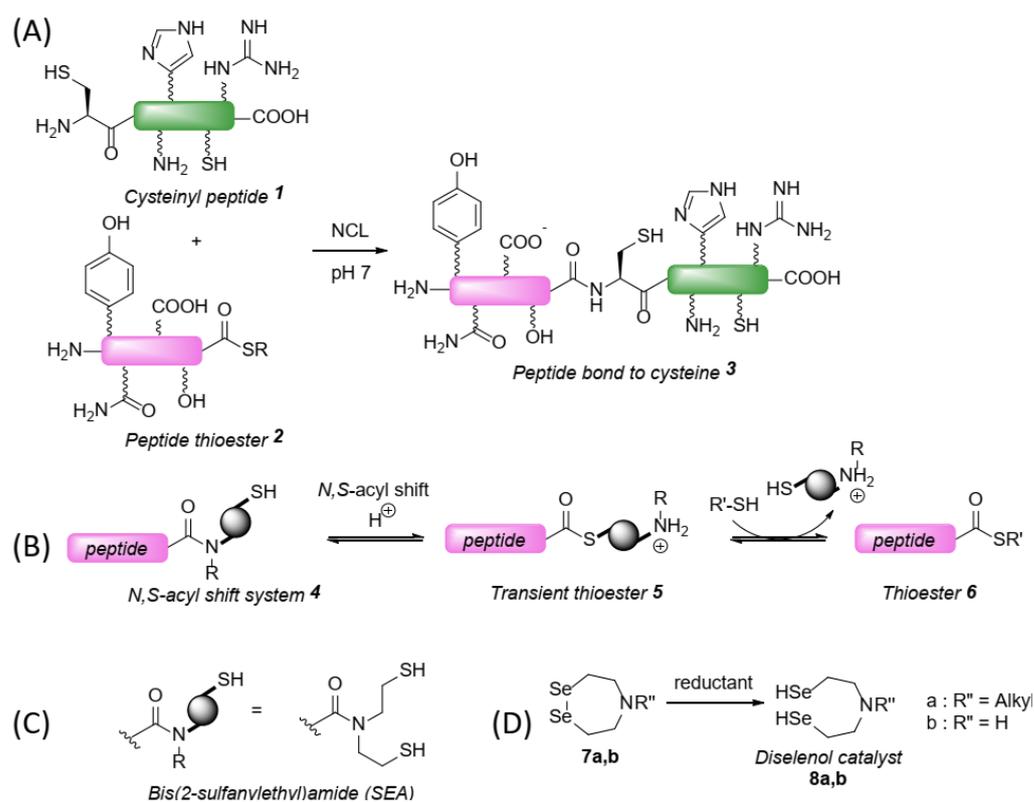


Figure 1. (A) Principle of the native chemical ligation (NCL). (B) *N,S*-acyl shift amide systems rearrange into thioesters in aqueous solution and can be used for producing stable thioesters by exchange with a thiol. (C) The *bis*(2-sulfanylethyl)amide (SEA) system. (D) Selenol catalysts reported by Cargoët et al. [47].

The diverse kinetic data collected so far support that the catalysis of the SEA/thiol exchange reaction by selenols proceeds as shown in Figure 2 [45,47]. According to this mechanism, the SEA peptide **9** undergoes a spontaneous *N,S*-acyl shift to produce the transient SEA thioester **10**. The latter reacts with the selenol catalyst probably through selenoate species to produce selenoester **12**, which then undergoes an exchange reaction with the thiol additive used in excess. The catalytic potency of selenols stems from their low pK_a compared to thiols, which ensures that a significant fraction of the selenol is in the form of a nucleophilic selenoate at the working acidic pH for the reaction, and also from the strong acylating properties of selenoesters of type **12** [13,16].

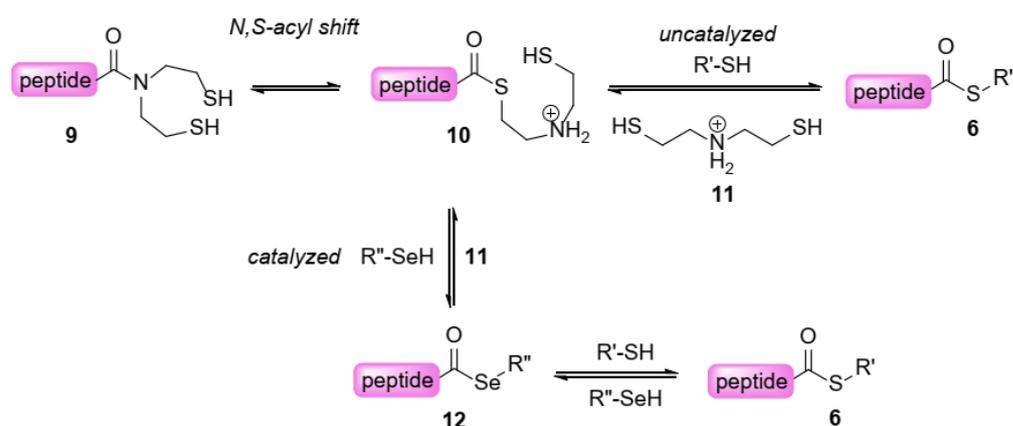


Figure 2. Mechanism of the SEA/thiol exchange catalysis by selenols.

The ease of synthesis, the catalytic potency and the water solubility are certainly key points to consider in the design of catalysts acting on unprotected peptide segments. Diselenol catalysts of type **8a** are efficient and water soluble but their synthesis is complex and low yielding. This latter limitation prompted us to search for novel selenol catalysts whose production would be easier. Evolving catalyst **8a** structure into easier to make selenol catalysts while maintaining similar catalytic potencies is not obvious. This is because the importance of the bis selenol and tertiary amine functionalities in the catalysis by **8a** remains unknown. In addition, the consequences of changing catalyst structure on selenol nucleophilicity and pK_a are hard to predict.

In this work, we evaluated the interest of selenol compounds **13** and **14** for catalyzing the SEA/thiol exchange process (Figure 3). These compounds, which share the 2-(selanylethyl)amino motif with original catalyst **8a**, have been studied in the past as analogs of choline [48–50]. They have the advantage of being easily produced in multigram quantities from cheap starting materials. Detailed kinetic studies showed the capacity of selenol **13** to act as a substitute of diselenol **8a** for the synthesis of peptide thioesters. Its usefulness is illustrated by the first chemical synthesis of a biologically active 9 kDa granulysin protein, an antibacterial human protein secreted by cytotoxic cells in response to various infectious agents [51–53].

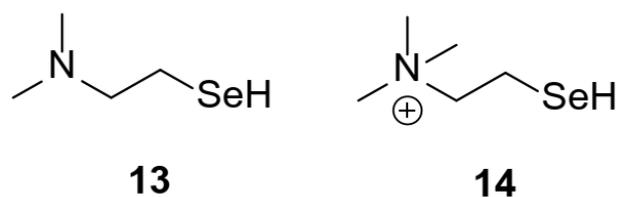
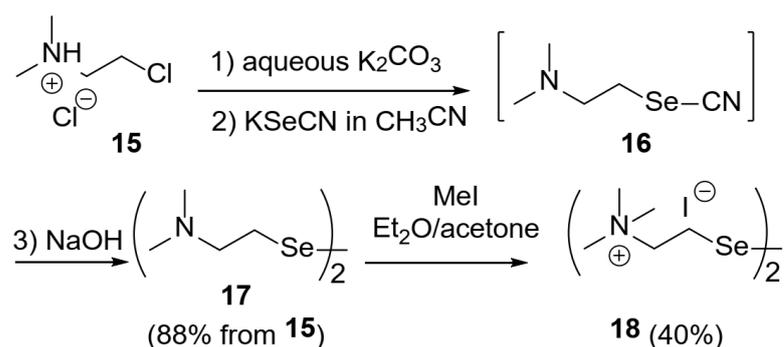


Figure 3. Selenol catalysts studied in this work.

2. Results and Discussion

2.1. Catalyst Synthesis

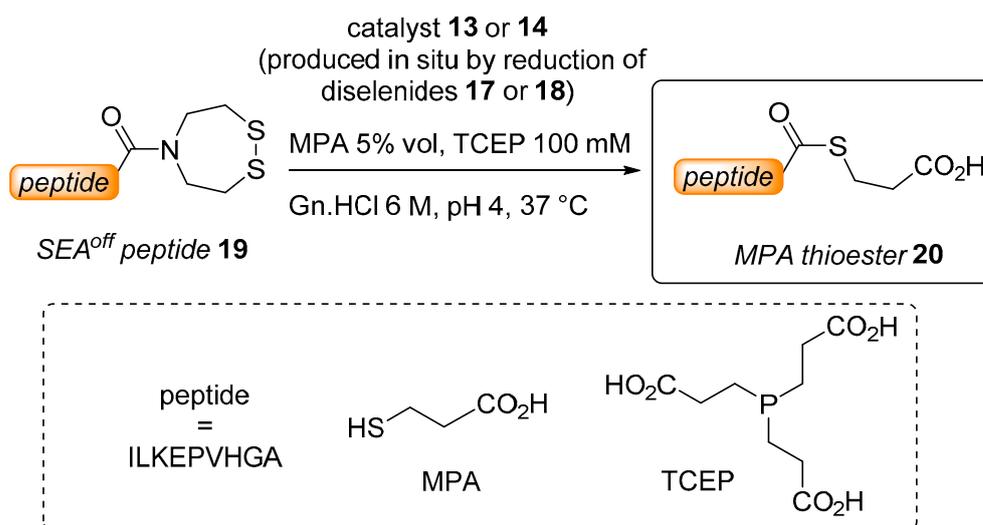
Catalysts **13** and **14** were produced as their corresponding diselenides, i.e., diselenides **17** and **18** respectively, starting from 2-chloro-*N,N*-dimethylethylamine hydrochloride according to known procedures [50,54]. Briefly, 2-chloro-*N,N*-dimethylethylamine was neutralized with potassium carbonate and then reacted with potassium selenocyanate to produce *N,N*-dimethyl-2-selenocyanatoethan-1-amine **16**, which upon treatment with sodium hydroxide afforded diselenide **17** (Scheme 1). Diselenide **17** was easily alkylated with methyl iodide to produce diselenide **18**.



Scheme 1. Synthesis of diselenide precatalysts **17** and **18**.

2.2. Kinetic Studies

The SEA/thiol exchange reaction used for studying the potency of the different catalysts is shown in Scheme 2. The water soluble *tris*(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) enables an in situ reduction of the cyclic SEA^{off} disulfide **19** and of the diselenide precatalyst **17** or **18**. The thiol additive used in this reaction is 3-mercaptopropionic acid (MPA), which is a classical thiol used for preparing peptide thioesters.



Scheme 2. The *bis*(2-sulfanylethyl)amido (SEA)/thiol exchange reaction investigated by kinetic studies.

The exchange reactions were monitored by HPLC (Figure 4A). The kinetic data were fitted to extract the apparent second order rate constants (Figure 4B). In this figure and in the following paragraphs, the data are expressed as a function of total selenol concentration. As suggested by the experimental data shown in Figure 4B, the rate constants obtained for **13** and **8a**, which are formed by in situ reduction of diselenides **17** and **7a**, plateau at the same value above 50 mM. However, examination of Figure 4B or of Table 1, which gives the half-reaction times for the different experiments, shows that the potencies of catalysts **13** and **8a** are not the same for concentrations below 50 mM. In such a case, the SEA/thiol exchange reaction proceeds faster with catalyst **8a**. The difference is particularly striking by looking at the data obtained at the lowest catalyst concentration tested (compare in the insert of Figure 4A blue circles and triangles for **13** and **8a** respectively used at 6.25 mM concentration). We can conclude at this point that catalyst **8a** can be substituted by selenol **13** with the condition of being used at a minimal concentration of 50 mM, under which conditions the highest rate for the SEA/thiol exchange reaction can be achieved.

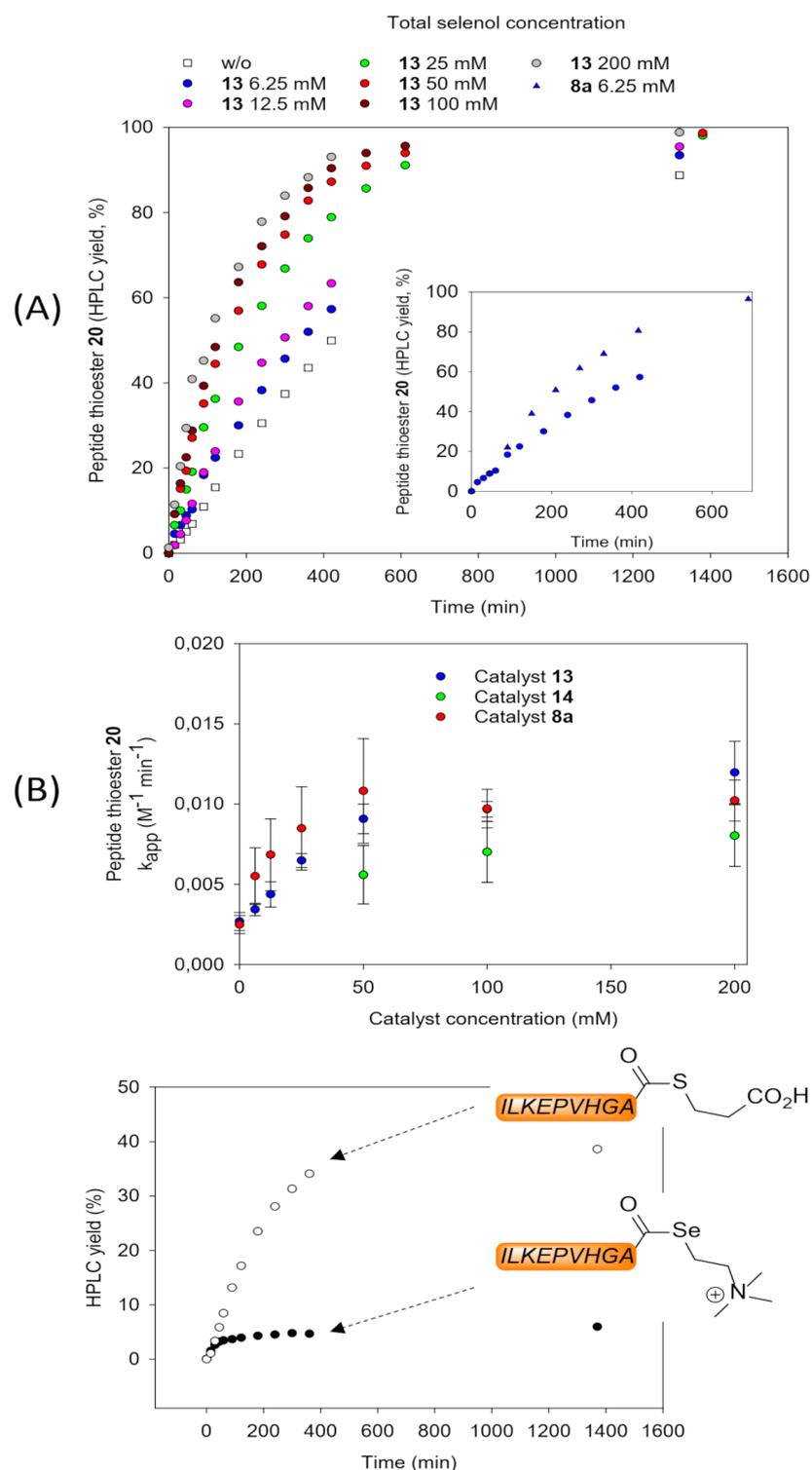


Figure 4. Study of the SEA/thiol exchange reaction catalyzed by selenols **8a** or **13**. Conditions: SEA peptide = 1 mM, 37 °C under inert atmosphere, 6 M Gn·HCl, MPA 5% *v/v*, 100 mM *tris*(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP·HCl), pH 4.0. (A) Experimental data as obtained by HPLC monitoring. (B) Apparent second-order rate constants obtained by fitting experimental data. The error bars correspond to the standard error of the fit. (C) Kinetic profile in the presence of catalyst **14** (200 mM).

The ability to accelerate the SEA/MPA exchange reaction was also assessed according to the same conditions for selenol **14** obtained from in situ reduction of **18**. Whether at a

concentration of 200 mM, 100 mM or 50 mM, selenol **14** was found to be significantly less potent than catalysts **8a** and **13** (Table 1). We noticed the formation of a red solid in the reaction mixture after a few hours at the highest concentration tested (200 mM), probably elemental selenium (see Supplementary Information, Figure S17). This observation strongly suggests that catalyst **14** decomposes throughout the course of the reaction. We also noticed an increase of the pH of the reaction mixture, a phenomenon that was not observed with the other selenols. Since previous studies established that the SEA/thioester ratio at equilibrium increases with pH [45,47], the pH drift observed in these experiments might explain in part the diminished conversion observed with catalyst **14**. Taken together, the lower conversion and rates observed with catalyst **14** preclude its use as an interesting alternative to **8a** for the production of peptide thioesters from SEA peptides.

Table 1. Catalysis of *bis*(2-sulfanylethyl)amido (SEA)–thiol exchange using selenols **8a**, **13** or **14** ^{a,b}.

Entry	Total Selenol Concentration 8a, 13, 14 (mM)	Catalyst $t_{1/2}$ (h)		
		8a ^c	13	14 ^d
1	200	1.97	1.68	2.51
2	100	2.03	2.08	2.87
3	50	1.95	2.22	3.60
4	25	2.35	3.10	nd
5	12.5	3.00	4.60	nd
6	6.25	3.35	5.87	nd

^a Conditions: SEA peptide = 1 mM, 37 °C under inert atmosphere, 6 M Gn·HCl, MPA 5% *v/v*, 100 mM *tris*(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP·HCl), pH 4.0. Selenol catalysts were added in the form of the corresponding diselenides. ^b The half-reaction time ($t_{1/2}$) for the uncatalyzed reaction is 7.28 h [47]. ^c Data from ref [47]. ^d Measured pH at equilibrium: pH 4.45 at 200 mM **14**, pH 4.19 at 100 mM **14**, pH 4.14 at 50 mM **14**.

Another striking observation made during the HPLC-MS monitoring of the exchange process catalyzed by selenol **14** was the formation of the peptide selenoester derived from selenocholine in substantial amounts (Figure 4C). In contrast, the amount of selenoester formed during the SEA/thiol exchange catalyzed by selenols **8a** or **13** was below HPLC-MS detection limits. The persistence of the selenoester derived from **14** in the reaction mixture suggests that the quaternarization of the basic nitrogen significantly alters the reactivity of the carbonyl group nearby. This observation is reminiscent of the work of Mautner and coworkers, who noticed that the hydrolysis of 2-dimethylaminoethyl selenobenzoate proceeded significantly faster at pH 7 than hydrolysis of benzoylselenocholine. The authors proposed that the formation of an intramolecular hydrogen bond between the protonated secondary amine and the selenoester carbonyl oxygen might promote the hydrolysis of the selenoester carbonyl [49]. Such an intramolecular activation of the selenoester group by the protonated amine as illustrated in Figure 5 might contribute to the catalytic potency of selenols **8a** and **13**.

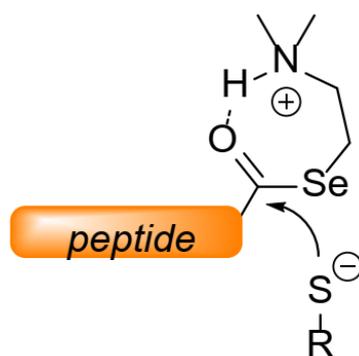


Figure 5. The presence of a protonated amine nearby the peptide carbonyl might promote the attack of thiol nucleophiles.

2.3. Total Chemical Synthesis of 9 kDa Granulysin

To illustrate the usefulness of the new catalyst **13**, we undertook the total chemical synthesis of 9 kDa granulysin (9-GN, Figure 6A). 9-GN is a human cytotoxic and proinflammatory protein that belongs to the NK-lysin family of proteins [53,55,56]. The protein is stabilized by two disulfide bonds. 9-GN protein is secreted by specialized cells from the immune system in response to infection by various agents such as bacteria, parasites, fungi and viruses. Designing an efficient and modular synthetic approach toward 9-GN can facilitate the development of novel antibacterial proteins of potential therapeutic interest.

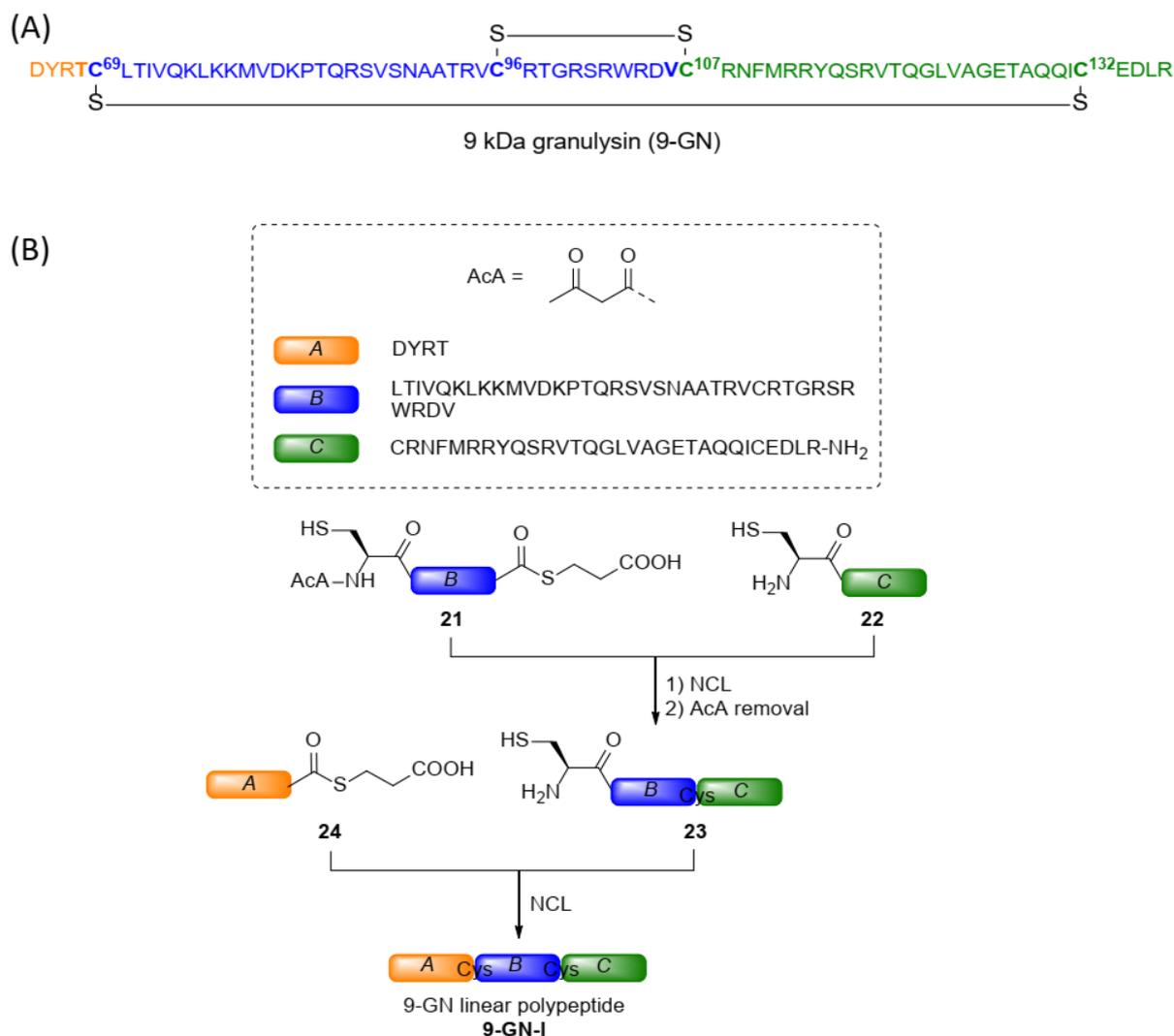


Figure 6. (A) Primary structure of 9 kDa granulysin (9-GN) and pattern of disulfide bonds. (B) General strategy used for assembling the linear 9-GN polypeptide (9-GN-I).

The synthetic strategy that was followed for accessing the linear 9-GN polypeptide (9-GN-I) is described in Figure 6B. 9-GN-I polypeptide was assembled from three peptide segments using NCL, which are highlighted by orange (N-terminal), blue (middle) and green (C-terminal) colors in Figure 6. The preceding residue of all the cysteines present in 9-GN sequence are β -branched amino acid residues, meaning that regardless of the AA-Cys junctions chosen for 9-GN assembly, the formation of difficult peptidic junctions will have to be dealt with. The assembly was done in the C-to-N direction and therefore required the protection of the N-terminal cysteine residue of the middle segment to avoid its cyclization or oligomerization during the first ligation step. The acetoacetyl (AcA) group was chosen for this purpose due to its ease of installation and removal [37–39,57].

The preparation of the middle thioester segment **21** in blue in Figure 6B proved to be challenging. First, the classical Fmoc SPPS of the SEA peptide precursor resulted in low yields due to difficult couplings after Arg94. This problem was solved by introducing Ala92 and Thr93 as a pseudoproline dipeptide unit, i.e., Fmoc-Ala-Thr(Ψ (Me,Me)Pro-OH (Figure 7) [58]. The second issue was the sluggish SEA/MPA exchange process enabling the installation of the thioester group, due to the presence of a sterically demanding valine residue at the C-terminus. Catalyst **13** proved to be particularly useful in this case. Interestingly, the protection of the N-terminal cysteine residue using methyl-S-(acetoacetyl)-thioglycolate (AcA-MTG) in the presence of 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA) and the diselenide-catalyzed SEA/MPA exchange reaction could be performed in one-pot with a pH change in between, thereby saving one intermediate purification step.

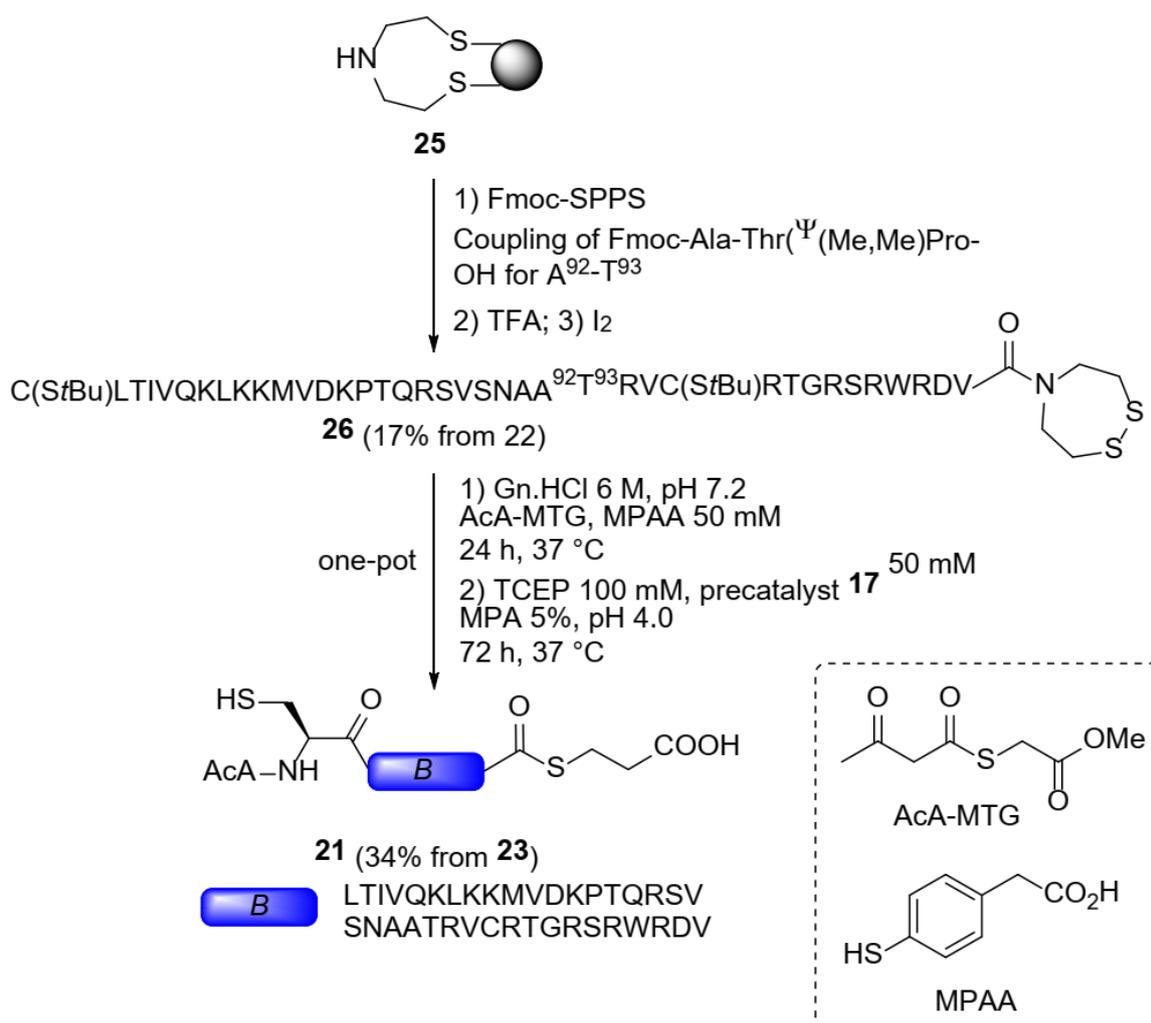


Figure 7. Synthesis of the middle thioester segment **21** by alkyl selenol-catalyzed SEA/MPA exchange.

The successful synthesis of thioester segment **21** set the stage for the assembly of the linear 9-GN-1 polypeptide (Figure 8). The ligation of middle **21** and right **22** segments was followed by the removal of the AcA group in one pot by adding hydroxylamine hydrochloride to the reaction mixture and adjusting the pH to mildly acidic values. The second ligation step with peptide thioester **24** provided the full length 9-GN-1 polypeptide which was purified by HPLC.

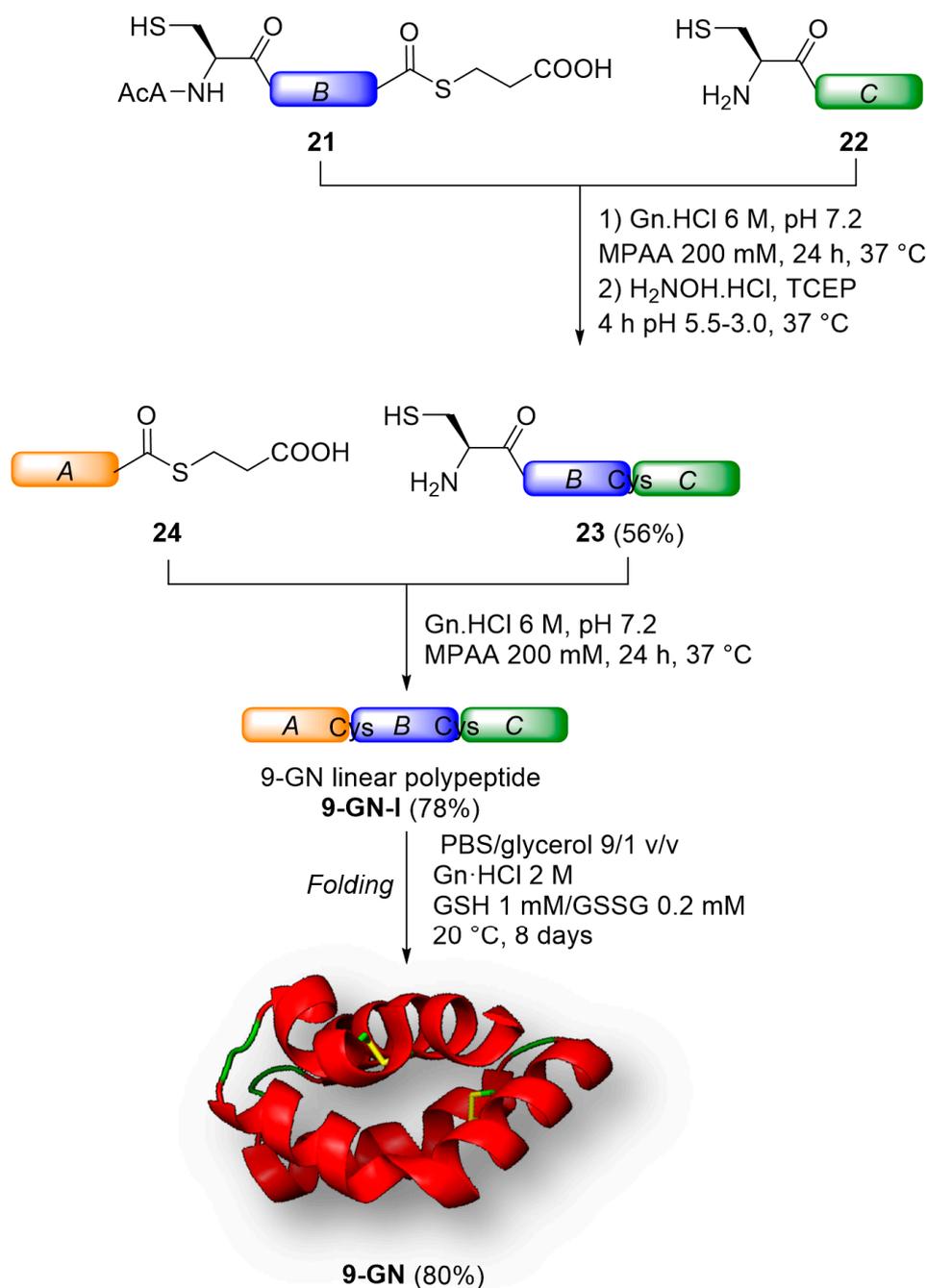


Figure 8. Total synthesis of 9-GN (the structure of 9-GN shown in this figure was prepared using Pymol and pdb entry 1L9L [59]).

The folding step was performed at 20 °C in a phosphate buffered saline/glycerol 9/1 mixture in the presence of glutathione (1 mM)/glutathione disulfide (0.2 mM) redox system and guanidine hydrochloride as a solubilizing additive. The use of guanidine hydrochloride during this step was mandatory to enable the solubilisation of the linear 9-GN-I polypeptide. The formation of the native pattern of disulfide bonds as shown in Figure 6A has been demonstrated by identifying the peptides produced upon trypsin digestion under non-reducing conditions by mass spectrometry (see Supplementary Information). The UPLC-MS analysis of 9-GN shown in Figure 9 highlights the quality of the protein obtained by the designed synthetic route.

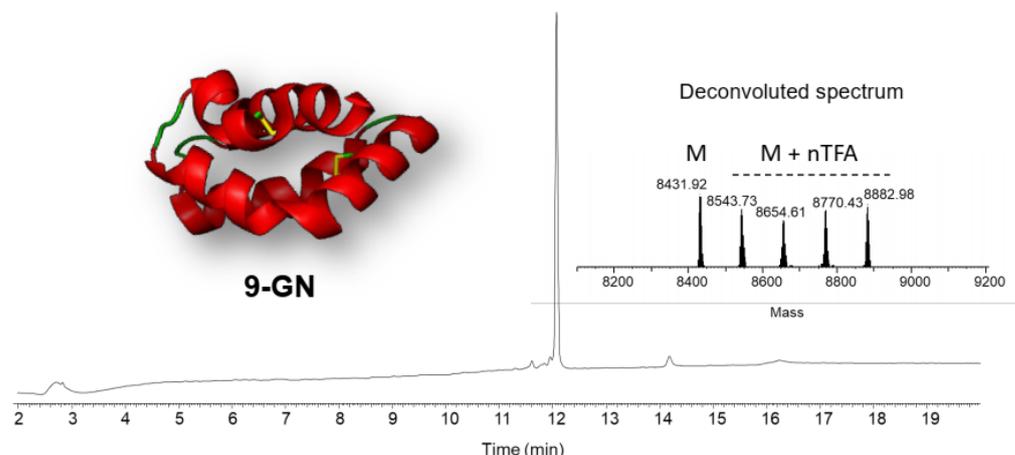


Figure 9. UPLC-MS analysis of synthetic 9-GN. UV detection at 215 nm. M (average mass) calcd. 8431.79, obs. 8431.9. 9-GN is a cationic protein that shows several TFA adducts in its deconvoluted MS spectrum. The structure of 9-GN shown in this figure was prepared using PyMol and pdb entry 1L9L [59].

2.4. Biological Activity of Synthetic 9-GN

The successful synthesis and folding of 9-GN set the stage for examining its biological activity. One hallmark of 9-GN is its capacity to induce the migration of immune cells to the site of infection. Typically, 9-GN is a chemoattractant for monocytes in the low nanomolar range in a transwell migration assay performed in Boyden micro chambers.

In such an assay, monocytes are placed on the upper layer of a cell permeable membrane inserted in a multi-well plate, which separates the cells from the solution containing the chemoattractant. After incubation (1 h), the cells that have migrated through the membrane are stained and counted. In such an assay, the synthetic 9-GN protein displayed a strong migration index in the 1–100 nM range as expected from literature data (Figure 10), showing the biological functionality of the protein obtained by chemical synthesis [56].

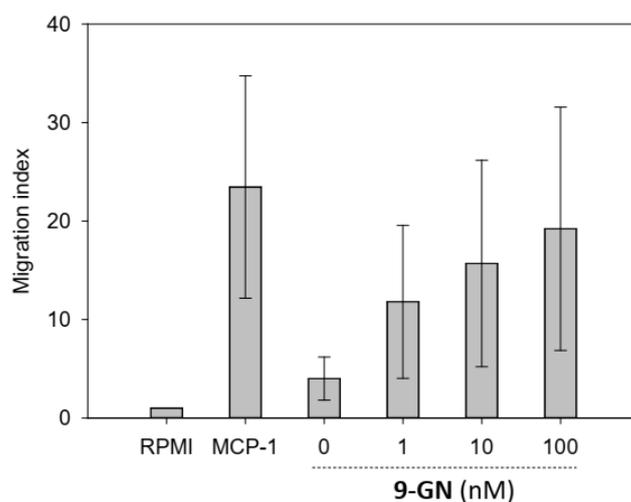


Figure 10. Monocyte migration assay in Boyden micro chambers. The data are expressed relative to the cell migration observed in the Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) supplemented with 0.1% fetal calf serum. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1, also called CCL2, 23 nM) was used as a positive control. The data for 0 nM of 9-GN were obtained using the protein dialysis buffer (PBS containing 10% by vol of glycerol). The bars correspond to the mean for six donors, from whom monocytes were isolated. The error bar correspond to the standard error of the mean. The data for each donor can be found in the Supplementary Information.

3. Materials and Methods

3.1. Synthesis of Diselenide Precatalyst 17

To a solution of potassium carbonate (11.5 g, 0.083 mol) in water (30 mL), was added 2-chloroethyl-*N,N*-dimethylamine hydrochloride (6.0 g, 0.042 mol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 10 min. The resulting crude mixture was extracted 3 times with 30 mL of Et₂O, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. 1.0 g of the resulting pale yellow oil (9.3 mmol) was diluted in 90 mL of acetonitrile and potassium selenocyanate (1.47 g, 10.2 mmol) was added portionwise. The resulting solution was stirred at room temperature for 16 h. Et₂O (100 mL) was added to the reaction mixture which was then filtered through a pad of celite. The filtrate was evaporated in vacuo and then redissolved in 120 mL of absolute ethanol. Aqueous sodium hydroxide (60 mL, 1 M) was slowly added under stirring and the reaction mixture was stirred 3 h at room temperature. The resulting mixture was concentrated in vacuo to remove the maximum of ethanol and extracted Et₂O (3 × 30 mL). The organic layers were combined, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford diselenide **17** as a yellow oil (1.24 g, 4.09 mmol, 88%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 3.10–2.96 (m, 4H), 2.68–2.55 (m, 4H), 2.25 (s, 12H) (see Figure S12).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 60.32, 45.20, 28.20 (see Figure S13).

MALDI-TOF Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (exact mass): 305.00, found: 304.92.

3.2. Synthesis of 9-GN

Step 1. Synthesis of peptide thioester **21**

To a solution of Gn·HCl (1.1 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (1.2 mL) was added MPAA (17 mg, 50 mM). SEA^{off} peptide **26** (15 mg, 2.6 μmol, 1.0 equiv) and AcA-MTG (77 μL of a 0.10 M solution in ACN, 7.7 μmol, 3.0 equiv) were then successively dissolved in the MPAA solution (1.3 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at 37 °C for 8 h. 3.0 additional equivalents of AcA-MTG were added and the mixture was stirred an additional 16 h at 37 °C under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was ascertained by UPLC-MS analysis.

After protection of the N-terminal Cys residue (24 h), the subsequent SEA/MPA exchange reaction was carried out in one pot. TCEP·HCl (34 mg, 0.10 M), diselenide catalyst **17** (20 mg, 50 mM) and MPA (65 μL, 5% by vol) were added to the previous mixture. The pH was adjusted to 4.0 by addition of 6 M NaOH and the reaction mixture was stirred at 37 °C for 72 h. After completion of the reaction, the mixture was diluted in 10 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B = acetonitrile in water 4/1 v/v containing 0.1% TFA, 50 °C, detection at 215 nm, 6 mL min⁻¹, 0–37% eluent B in 15 min, then 37–57% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give peptide thioester **21** as a white solid after lyophilization (5.09 mg, 34%).

Peptide **21** was analyzed by UPLC-MS (see Figure S18) and MALDI-TOF mass spectrometry (see Figure S19).

ESI (positive detection mode, see Figure S18): calcd. for [M] (average): 4561.40, found: 4561.79.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, see Figure S19): calcd. for [M + H]⁺ (average): 4562.40, found: 4562.87.

Step 2. Synthesis of peptide amide **23**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M, pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 mmol) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. Peptide **21** (3.5 mg, 0.61 μmol, 1.0 equiv) and peptide **22** (2.8 mg, 0.67 μmol, 1.1 equiv) were then successively dissolved in the MPAA solution (0.12 mL) and the pH of the mixture was adjusted to 7.2 by addition of 6 M NaOH. The mixture was stirred at

37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), the AcA protecting group was removed by reaction with NH_2OH . The reaction mixture was first acidified to pH 3.0 with 6 M HCl and extracted 3 times with 1.0 mL of Et_2O to remove MPAA. A 0.5 M solution of $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ in H_2O (26 μL , 13 μmol , 20 equiv) was then added and the pH was adjusted to 5.5. After 4 h stirring at 37 °C, pH was adjusted to 3.0 with 0.25 g mL^{-1} aqueous solution of TCEP·HCl. The crude was further diluted in 4.0 mL of water containing 0.25% TFA and purified by HPLC (eluent A = water containing 0.25% TFA, eluent B = acetonitrile in water 4/1 *v/v* containing 0.25% TFA, 50 °C, detection at 215 nm, 6 mL min^{-1} , 0–40% eluent B in 10 min, then 40–50% eluent B in 45 min, C18XBridge column) to afford peptide **23** as a white solid after lyophilization (3.49 mg, 56%).

Peptide **23** was analyzed by UPLC-MS (see Figure S20) and MALDI-TOF mass spectrometry (see Figure S21).

ESI (positive detection mode, see Figure S20): calcd. for [M] (average): 7899.22, found: 7899.94.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, see Figure S21): calcd. for [M+H]⁺ (average): 7900.22, found: 7901.49.

Step 3. Synthesis of **9-GN-1**

To a solution of Gn·HCl (0.57 g) in 0.1 M pH 7.4 phosphate buffer (0.60 mL) was added MPAA (34 mg, 0.20 mmol) and the pH of the mixture was adjusted to 7.7 by addition of 6 M NaOH. Peptide **23** (3.5 mg, 0.36 μmol , 1.0 equiv) and peptide thioester **24** (0.38 mg, 0.36 μmol , 1.0 equiv) were then successively dissolved in the MPAA solution (91 μL). The mixture was stirred at 37 °C for 24 h under nitrogen atmosphere. Completion of the reaction was insured by UPLC-MS analysis.

After completion of the NCL ligation (24 h), TCEP·HCl (5.2 mg, 18 μmol) was added to the reaction medium to reduce any mixed disulfide formed during ligation. The resulting mixture was diluted in 3.0 mL of water containing 0.1% TFA. The crude was purified by HPLC (eluent A = water containing 0.1% TFA, eluent B = acetonitrile in water 4/1 *v/v* containing 0.1% TFA, 50 °C, detection at 215 nm, 6 mL min^{-1} , 0–38% eluent B in 10 min, then 38–58% eluent B in 60 min, C18XBridge column) to give **9-GN-1** as a white solid after lyophilization (2.92 mg, 78%).

Peptide **9-GN-1** was analyzed by UPLC-MS (see Figure S22) and MALDI-TOF mass spectrometry (see Figure S23).

ESI (positive detection mode, see Figure S22): calcd. for [M] (average): 8435.79, found: 8435.45.

MALDI-TOF (positive detection mode, matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, see Figure S23): calcd. for [M + H]⁺ (average): 8436.79, found: 8436.65.

3.3. Folding

The linear polypeptide **9-GN-1** (0.558 mg, 0.054 μmol) was dissolved in PBS containing 10% by vol of glycerol, 2 M of Gn·HCl, 1 mM reduced glutathione, 0.2 mM oxidized glutathione (1 mL/mg final peptide concentration). The reaction mixture was let 1 h at 0 °C, then 8 days at 20 °C.

The protein was dialyzed twice (respectively 2 h and 24 h) at 20 °C against 200 mL PBS containing 10% in vol of glycerol. 0.71 mL of the dialyzed solution were recovered and the concentration of the folded protein was determined using UV quantification at 280 nm (60.7 μM , 0.043 μmol , 80%).

Folded protein **9-GN** was analyzed by UPLC-MS (see Figure S24).

Experimental determination of the disulfide bridge pattern was achieved by trypsin digestion of **9-GN** and identification of the resulting fragments by mass spectrometry using non-reducing conditions. Fragments obtained by digestion with trypsin permitted the direct assignment of Cys69-Cys132 and Cys96-Cys107 disulfide bonds (see Figure S26 in the Supplementary Information).

3.4. Chemotaxis Assay

Blood monocytes were purified from six donors by positive selection over a MACS column using anti-CD14-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec) as previously described [60].

Monocyte migration (5×10^4 cells/well in 50 μ L of RPMI 1640 medium with 0.1% FCS) was performed in a 48-well Boyden microchamber (Neuroprobe) through a standard 5- μ m pore filter (Neuroprobe), at 37 °C for 1 h. Migration was evaluated in response to synthetic **9-GN** (1 to 100 nM in RPMI 1640 medium containing 0.1% FCS), CCL2 used as positive control (200 ng/mL, 23.1 nM, R&D Systems), and medium alone used as negative control. The filter was stained using Diff-Quik reagent. Migrated cells were counted on the lower side of the filter in three randomly selected high power fields (magnification \times 100). Each assay was performed in triplicate. Results are expressed as the difference between mean numbers of cells per high power fields minus the negative control (medium alone).

4. Conclusions

We conducted detailed kinetic studies of the catalysis of the *bis*(2-sulfanylethyl)amido (SEA)/thiol exchange process by selenols derived from selenocysteamine. These data provide important clues regarding the role played by the basic amino group of the selenocysteamine scaffold in catalysis and how to evolve the catalyst to achieve useful catalytic potencies while minimizing synthetic cost. Catalysis by *bis*(*N,N*-dimethylaminoethyl)diselenide proved particularly useful and involves presumably an intramolecular general acid catalysis by the proton of the dimethylammonium group. *Bis*(*N,N*-dimethylaminoethyl)diselenide can be easily produced in multigram scale from cheap starting materials. Its usefulness is illustrated by the chemical synthesis of a biologically active 9 kDa granulysin.

Supplementary Materials: The detailed experimental procedures and characterization data for all compounds are provided in a separate PDF file, Figure S1: General approach for the preparation of peptide amides, Figure S2: Synthesis of SEAoff peptides and MPA peptide thioesters, Figure S3: UPLC-MS analysis of CRNFMRRYQSRVTQGLVAGETAQQICEDLR-NH₂ peptide 22. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0–70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1765.33 ([M+2H]²⁺), 1177.33 ([M+3H]³⁺), 883.33 ([M+4H]⁴⁺), 706.75 ([M+5H]⁵⁺); calcd. for [M] (average mass): 3529.04, found: 3529.04, Figure S4: MALDI-TOF analysis of peptide 22. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 3530.04, found: 3529.8, Figure S5: UPLC-MS analysis of C(*t*Bu)LTIVQKLKMKMVDKPTQRSVSNAATRVC(*t*Bu)-RTGRSRWRDV-SEAoff peptide 26. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0–70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1636.25 ([M+2MTFA+3H]³⁺), 1598.92 ([M+MTFA+3H]³⁺), 1199.42 ([M+MTFA+4H]⁴⁺), 1171.75 ([M+4H]⁴⁺), 959.92 ([M+MTFA+5H]⁵⁺), 937.58 ([M+5H]⁵⁺), 781.67 ([M+6H]⁶⁺), 670.67 ([M+7H]⁷⁺); calcd. for [M] (average mass): 4682.77, found: 4682.95, Figure S6: MALDI-TOF analysis of peptide 26. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 4683.77, found: 4684.22, Figure S7: UPLC-MS analysis of DYRT-SEAoff peptide. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0–70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 671.42 ([M+H]⁺); calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 671.26, found: 671.42, Figure S8: MALDI-TOF analysis of DYRT-SEAoff peptide. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 671.26, found: 671.15, Figure S9: UPLC-MS analysis of DYRT-MPA peptide 24. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0–70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1283.17 ([2M+H]⁺), 642.42 ([M+H]⁺); calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 642.25, found: 642.42, Figure S10: MALDI-TOF analysis of peptide 24. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (monoisotopic): 642.25, found: 642.18, Figure S11: Synthesis scheme for the preparation of diselenide precatalyst 17, Figure S12: ¹H NMR (300 MHz) spectrum of compound 17 (CDCl₃, 293 K), Figure S13: ¹³C APT NMR (75 MHz) spectrum of compound 17 (CDCl₃, 293 K), Figure S14: ¹H NMR (300 MHz) spectrum of compound 18 (D₂O, 293 K), Table S1: Kinetic data extracted from curve fitting,^a Table S2: Fitting of MPA thioester formation in the presence of catalysts,^a Figure S16: Fitting of SEA/MPA exchange in the presence of catalyst 13 (200 mM). Data were fitted according to equation (1), Figure S17: Red selenium precipitate formed during catalysis

of SEA/MPA exchange in the presence of catalyst 14 (200 mM), Figure S18: UPLC-MS analysis of peptide 21. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0–70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: m/z 1558.25 ([M+MTFA+3H]³⁺), 1521.42 ([M+3H]³⁺), 1169.00 ([M+MTFA+4H]⁴⁺), 1141.58 ([M+4H]⁴⁺), 913.58 ([M+5H]⁵⁺), 761.58 ([M+6H]⁶⁺), 652.83 ([M+7H]⁷⁺); calcd. for [M] (average mass): 4561.40, found: 4561.79, Figure S19: MALDI-TOF analysis of peptide 21. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 4562.40, found: 4562.87, Figure S20: UPLC-MS analysis of peptide 23. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0–70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M] (average mass): 7899.22, found: 7899.94 (8012.58 [M+MTFA], 8124.97 [M+2MTFA], 8238.28 [M+3MTFA]), Figure S21: MALDI-TOF analysis of peptide 23. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 7900.22, found: 7901.49, Figure S22: UPLC-MS analysis of peptide 9-GN-I. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0–70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M] (average mass): 8435.79, found: 8435.45 (8547.50 [M+MTFA], 8659.48 [M+2MTFA]), Figure S23: MALDI-TOF analysis of peptide 9-GN-I. Matrix 2,5-dihydrobenzoic acid, positive detection mode, calcd. for [M+H]⁺ (average): 8436.79, found: 8436.65, Figure S24: UPLC-MS analysis of 9-GN. LC trace: eluent A 0.10% TFA in water, eluent B 0.10% TFA in CH₃CN. C18 column, gradient 0–70% B in 20 min, 50 °C, 0.4 mL min⁻¹, UV detection at 215 nm. MS trace: calcd. for [M] (average mass): 8431.79, found: 8431.92 (8543.73 [M+MTFA], 8654.61 [M+2MTFA], 8770.43 [M+3MTFA], 8882.98 [M+4MTFA]), Figure S25: Disulfide bridge pattern of 9-GN, Figure S26: MALDI-TOF analysis of the tryptic digest of 9-GN. Matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), positive detection mode. VC96R linked to DVC107R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 866.40, found 866.39; VC96R linked to WRDVC107R by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 1208.58, found 1208.57; TC69LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC132EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 2932.52, found 2932.49; DYRTC69LTIVQK linked to VTQGLVAGETAQQIC132EDLR by disulfide bridge, calcd. (monoisotopic) [M+H]⁺ 3366.71, found 3366.73, Table S3: Results of the Boyden micro chamber assay.

Author Contributions: Catalyst synthesis and kinetic measurements, 9-GN total synthesis, writing—review, F.K.; chemotactic assays, G.B.; Catalyst synthesis and kinetic measurements, B.S.; Proteomic experiments, H.D.; Chemotactic assays, writing—review, M.P.; Conceptualization, project administration, supervision, methodology, kinetic modelizations, writing—review & editing, V.A.; Conceptualization, project administration, supervision, methodology, writing—review & editing, O.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of Lille, the Pasteur Institute of Lille and by Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant ANR-18-CE44-0010.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Melnyk, O. Chemical Protein Synthesis in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 15140–15152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Dawson, P.E.; Muir, T.W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S.B.H. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science* **1994**, *266*, 776–779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Raibaut, L.; Ollivier, N.; Melnyk, O. Sequential Native Peptide Ligation Strategies for Total Chemical Protein Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7001–7015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Conibear, A.C.; Watson, E.E.; Payne, R.J.; Becker, C.F.W. Native Chemical Ligation in Protein Synthesis and Semi-Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 9046–9068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kulkarni, S.S.; Sayers, J.; Premjee, B.; Payne, R.J. Rapid and Efficient Protein Synthesis through Expansion of the Native Chemical Ligation Concept. *Nat. Rev. Chem.* **2018**, *2*, 0122. [[CrossRef](#)]
6. Agouridas, V.; El Mahdi, O.; Diemer, V.; Cargoet, M.; Monbaliu, J.-C.M.; Melnyk, O. Native Chemical Ligation and Extended Methods. Mechanisms, Catalysis, Scope and Limitations. *Chem. Rev.* **2019**, *12*, 7328–7443. [[CrossRef](#)]

7. Wan, Q.; Danishefsky, S.J. Free-Radical-Based, Specific Desulfurization of Cysteine: A Powerful Advance in the Synthesis of Polypeptides and Glycopolypeptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252. [[CrossRef](#)]
8. Yan, L.Z.; Dawson, P.E. Synthesis of Peptides and Proteins without Cysteine Residues by Native Chemical Ligation Combined with Desulfurization. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533. [[CrossRef](#)]
9. Jin, K.; Li, X. Advances in Native Chemical Ligation–Desulfurization: A Powerful Strategy for Peptide and Protein Synthesis. *Chem. A Eur. J.* **2018**, *24*, 17397–17404. [[CrossRef](#)]
10. Jin, K.; Li, T.; Chow, H.Y.; Liu, H.; Li, X. P–B Desulfurization: An Enabling Method for Protein Chemical Synthesis and Site-Specific Deuteration. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 14607–14611. [[CrossRef](#)]
11. 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*, 4938–4945. [[CrossRef](#)]
12. Dawson, P.E.; Churchill, M.J.; Ghadiri, M.R.; Kent, S.B.H. Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4325–4329. [[CrossRef](#)]
13. Mitchell, N.J.; Malins, L.R.; Liu, X.; Thompson, R.E.; Chan, B.; Radom, L.; Payne, R.J. Rapid Additive-Free Selenocysteine-Selenoester Peptide Ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14011–14014. [[CrossRef](#)]
14. Chisholm, T.S.; Clayton, D.; Dowman, L.J.; Sayers, J.; Payne, R.J. Native Chemical Ligation–Photodesulfurization in Flow. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *29*, 9020–9024. [[CrossRef](#)]
15. Ollivier, N.; Toupy, T.; Hartkoorn, R.C.; Desmet, R.; Monbaliu, J.-C.M.; Melnyk, O. Accelerated Microfluidic Native Chemical Ligation at Difficult Amino Acids toward Cyclic Peptides. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Durek, T.; Alewood, P.F. Preformed Selenoesters Enable Rapid Native Chemical Ligation at Intractable Sites. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12042–12045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Zheng, J.-S.; Tang, S.; Huang, Y.-C.; Liu, L. Development of New Thioester Equivalents for Protein Chemical Synthesis. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2475–2484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ollivier, N.; Behr, J.B.; El-Mahdi, O.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Fmoc Solid-Phase Synthesis of Peptide Thioesters Using an Intramolecular *N,S*-Acyl Shift. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2647–2650. [[CrossRef](#)]
19. Ohta, Y.; Itoh, S.; Shigenaga, A.; Shintaku, S.; Fujii, N.; Otaka, A. Cysteine-Derived *S*-Protected Oxazolidinones: Potential Chemical Devices for the Preparation of Peptide Thioesters. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 467–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hojo, H.; Onuma, Y.; Akimoto, Y.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. *N*-Alkyl Cysteine-Assisted Thioesterification of Peptides. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 25–28. [[CrossRef](#)]
21. Kawakami, T.; Aimoto, S. The Use of a Cysteinylyl Prolyl Ester (CPE) Autoactivating Unit in Peptide Ligation Reactions. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3871–3877. [[CrossRef](#)]
22. Kang, J.; Richardson, J.P.; Macmillan, D. 3-Mercaptopropionic Acid-Mediated Synthesis of Peptide and Protein Thioesters. *Chem. Commun.* **2009**, *4*, 407–409. [[CrossRef](#)]
23. Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhida, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Bis*(2-Sulfanylethyl)Amino Native Peptide Ligation. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5238–5241. [[CrossRef](#)]
24. Macmillan, D.; De Cecco, M.; Reynolds, N.L.; Santos, L.F.A.; Barran, P.E.; Dorin, J.R. Synthesis of Cyclic Peptides through an Intramolecular Amide Bond Rearrangement. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2133–2136. [[CrossRef](#)]
25. Hou, W.; Zhang, X.; Li, F.; Liu, C.F. Peptidyl *N,N*-*Bis*(2-Mercaptoethyl)-Amides as Thioester Precursors for Native Chemical Ligation. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 386–389. [[CrossRef](#)]
26. Sato, K.; Shigenaga, A.; Tsuji, K.; Tsuda, S.; Sumikawa, Y.; Sakamoto, K.; Otaka, A. *N*-sulfanylethylanilide Peptide as a Cryptothioester Peptide. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1840–1844. [[CrossRef](#)]
27. Adams, A.L.; Macmillan, D. Investigation of Peptide Thioester Formation via *N*→*Se* Acyl Transfer. *J. Pept. Sci.* **2013**, *19*, 65–73. [[CrossRef](#)]
28. Taichi, M.; Hemu, X.; Qiu, Y.; Tam, J.P. A Thioethylalkylamido (TEA) Thioester Surrogate in the Synthesis of a Cyclic Peptide via a Tandem Acyl Shift. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2620–2623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ruff, Y.; Garavini, V.; Giuseppone, N. Reversible Native Chemical Ligation: A Facile Access to Dynamic Covalent Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6333–6339. [[CrossRef](#)]
30. Burlina, F.; Papageorgiou, G.; Morris, C.; White, P.D.; Offer, J. In Situ Thioester Formation for Protein Ligation Using a-Methylcysteine. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 766–770. [[CrossRef](#)]
31. Asahina, Y.; Nabeshima, K.; Hojo, H. Peptidyl *N*-Alkylcysteine as a Peptide Thioester Surrogate in the Native Chemical Ligation. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1370–1373. [[CrossRef](#)]
32. Eto, M.; Naruse, N.; Morimoto, K.; Yamaoka, K.; Sato, K.; Tsuji, K.; Inokuma, T.; Shigenaga, A.; Otaka, A. Development of an Anilide-Type Scaffold for the Thioester Precursor *N*-Sulfanylethylcoumarinyl Amide. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4416–4419. [[CrossRef](#)]
33. Terrier, V.P.; Adihou, H.; Arnould, M.; Delmas, A.F.; Aucagne, V. A Straightforward Method for Automated Fmoc-Based Synthesis of Bio-Inspired Peptide Cryptothioesters. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 339–345. [[CrossRef](#)]
34. Tsuda, S.; Mochizuki, M.; Sakamoto, K.; Denda, M.; Nishio, H.; Otaka, A.; Yoshiya, T. *N*-Sulfanylethylaminoxybutyramide (SEAoxy): A Cryptothioester Compatible with Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5940–5943. [[CrossRef](#)]
35. Rao, C.; Liu, C.F. Peptide Weinreb Amide Derivatives as Thioester Precursors for Native Chemical Ligation. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2491–2496. [[CrossRef](#)]

36. Shelton, P.M.; Weller, C.E.; Chatterjee, C. A Facile *N*-Mercaptoethoxyglycinamide (MEGA) Linker Approach to Peptide Thioesterification and Cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3946–3949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ollivier, N.; Desmet, R.; Drobecq, H.; Blanpain, A.; Boll, E.; Leclercq, B.; Mougel, 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*, 5362–5370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Raibaut, L.; Cargoët, M.; Ollivier, N.; Chang, Y.M.; Drobecq, H.; Boll, E.; Desmet, R.; Monbaliu, J.-C.M.; Melnyk, O. Accelerating Chemoselective Peptide Bond Formation Using *Bis*(2-Selenylethyl)Amido Peptide Selenoester Surrogates. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2657–2665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bouchenna, J.; Sénéchal, M.; Drobecq, H.; Vicogne, J.; Melnyk, O. Total Chemical Synthesis of All SUMO-2/3 Dimer Combinations. *Bioconj. Chem.* **2019**, *30*, 2967–2973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Abboud, S.A.; Cisse, E.h.; Doudeau, M.; Bénédicti, H.; Aucagne, V. A Straightforward Methodology to Overcome Solubility Challenges for *N*-Terminal Cysteinyll Peptide Segments Used in Native Chemical Ligation. *Chem. Sci.* **2021**. [[CrossRef](#)]
41. Nakamura, T.; Sato, K.; Naruse, N.; Kitakaze, K.; Inokuma, T.; Hirokawa, T.; Shigenaga, A.; Itoh, K.; Otaka, A. Tailored Synthesis of 162-Residue *S*-Monoglycosylated GM2-Activator Protein (GM2AP) Analogues That Allows Facile Access to a Protein Library. *Chembiochem* **2016**, *17*, 1986–1992. [[CrossRef](#)]
42. Sato, K.; Shigenaga, A.; Kitakaze, K.; Sakamoto, K.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. Chemical Synthesis of Biologically Active Monoglycosylated GM2-Activator Protein Analogue Using *N*-Sulfanylethylanilide Peptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7855–7859. [[CrossRef](#)]
43. Sun, H.; Brik, A. The Journey for the Total Chemical Synthesis of a 53 kDa Protein. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 3361–3371. [[CrossRef](#)]
44. Kumar, K.S.; Bavikar, S.N.; Spasser, L.; Moyal, T.; Ohayon, S.; Brik, A. Total Chemical Synthesis of a 304 Amino Acid K48-Linked Tetraubiquitin Protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 6137–6141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pira, S.L.; El Mahdi, O.; Raibaut, L.; Drobecq, H.; Dheur, J.; Boll, E.; Melnyk, O. Insight into the SEA Amide Thioester Equilibrium. Application to the Synthesis of Thioesters at Neutral pH. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7211–7216. [[CrossRef](#)]
46. Hupe, D.J.; Jencks, W.P. Nonlinear Structure-Reactivity Correlations. Acyl Transfer between Sulfur and Oxygen Nucleophiles. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 451–464. [[CrossRef](#)]
47. Cargoët, M.; Diemer, V.; Snella, B.; Desmet, R.; Blanpain, A.; Drobecq, H.; Agouridas, V.; Melnyk, O. Catalysis of Thiol-Thioester Exchange by Water-Soluble Alkyldiselenols Applied to the Synthesis of Peptide Thioesters and SEA-Mediated Ligation. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 12584–12594. [[CrossRef](#)]
48. Shefter, E.; Kennard, O. Crystal and Molecular Structure of Acetylselenocholine Iodide. *Science* **1966**, *153*, 1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Chu, S.-H.; Mautner, H.G. Analogs of Neuroeffectors. V. Neighboring-Group Effects in the Reactions of Esters, Thioesters, and Selenoesters. The Hydrolysis and Aminolysis of Benzoylcholine, Benzoylthiolcholine, Benzoylselenolcholine, and of their Dimethylamino Analogs. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 308–312. [[CrossRef](#)]
50. Günther, W.H.H.; Mautner, H.G. Analogs of Parasympathetic Neuroeffectors. I. Acetylselenocholine, Selenocholine, and Related Compounds. *J. Med. Chem.* **1964**, *7*, 229–232.
51. Krensky, A.M.; Clayberger, C. Biology and Clinical Relevance of Granulysin. *Tissue Antigens* **2009**, *73*, 193–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Stenger, S.; Hanson, D.A.; Teitelbaum, R.; Dewan, P.; Niazi, K.R.; Froelich, C.J.; Ganz, T.; Thoma-Uszynski, S.; Melian, A.; Bogdan, C.; et al. An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin. *Science* **1998**, *282*, 121–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Pena, S.V.; Hanson, D.A.; Carr, B.A.; Goralski, T.J.; Krensky, A.M. Processing, Subcellular Localization, and Function of 519 (Granulysin), a Human Late T cell Activation Molecule with Homology to Small, Lytic, Granule Proteins. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 2680–2688.
54. Krief, A.; Dumont, W.; Delmotte, C. Reaction of Organic Selenocyanates with Hydroxides: The One-Pot Synthesis of Dialkyl Diselenides from Alkyl Bromides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1669–1672. [[CrossRef](#)]
55. Pena, S.V.; Krensky, A.M. Granulysin, a New Human Cytolytic Granule-Associated Protein with Possible Involvement in Cell-Mediated Cytotoxicity. *Semin. Immunol.* **1997**, *9*, 117–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Deng, A.; Chen, S.; Li, Q.; Lyu, S.C.; Clayberger, C.; Krensky, A.M. Granulysin, a Cytolytic Molecule, Is Also a Chemoattractant and Proinflammatory Activator. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 5243–5248. [[CrossRef](#)]
57. Boll, E.; Ebran, J.P.; Drobecq, H.; El-Mahdi, O.; Raibaut, L.; Ollivier, N.; Melnyk, O. Access to Large Cyclic Peptides by a One-Pot Two-Peptide Segment Ligation/Cyclization Process. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 130–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Haack, T.; Mutter, M. Serine Derived Oxazolidines as Secondary Structure Disrupting, Solubilizing Building Blocks in Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589–1592. [[CrossRef](#)]
59. Anderson, D.H.; Sawaya, M.R.; Cascio, D.; Ernst, W.; Modlin, R.; Krensky, A.; Eisenberg, D. Granulysin Crystal Structure and a Structure-Derived Lytic Mechanism. *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 355–365. [[CrossRef](#)]
60. Pichavant, M.; Taront, S.; Jeannin, P.; Breuilh, L.; Charbonnier, A.S.; Spriet, C.; Fourneau, C.; Corvaia, N.; Heliot, L.; Briche, A.; et al. Impact of Bronchial Epithelium on Dendritic Cell Migration and Function: Modulation by the Bacterial Motif KpOmpA. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 5912–5919. [[CrossRef](#)]