

50376
1989
279

50376
1989
279

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES ARTOIS

N° d'ordre 471

Thèse pour l'obtention du
Doctorat d'Université
en Chimie Organique et Macromoléculaire

présentée le 12 décembre 1989

par

Annie RICOUART



CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE STRUCTURES PEPTIDIQUES
APPLIQUÉES À LA CARACTÉRISATION ET L'INHIBITION DE
LA PROTÉINE KINASE C

Jury Pr. B. ROQUES (Président)
Dr. F. HYAFIL (Rapporteur)
Pr. C. LOUCHEUX (Rapporteur)
Pr. C. SERGHERAERT
Pr. A. TARTAR

Ce travail a été réalisé dans le service de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille (Professeur TARTAR), en collaboration avec les laboratoires GLAXO (Centre de Recherche des ULIS) dans le cadre d'un contrat CIFRE.

Je remercie Monsieur le Docteur F. HYAFIL qui, en m'intégrant dans son équipe, m'a permis de préparer cette thèse dans d'excellentes conditions. Je lui suis reconnaissante pour ses précieux conseils et l'intérêt qu'il a toujours manifesté pour mon travail et ma carrière.

Je remercie Monsieur le Professeur A. TARTAR, dont les critiques constructives et l'esprit scientifique ont guidé mon initiation à la recherche, pour la confiance qu'il m'a accordée au cours des quatre années passées dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur C. SERGHERAERT qui a suivi quotidiennement l'évolution de mon travail et m'a prodigué, à tout instant, de précieux conseils. Je lui sais gré de la gentillesse et la disponibilité qu'il m'a toujours manifestées.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur B. ROQUES qui a bien voulu, en dépit de nombreuses activités, participer au jury de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur C. LOUCHEUX, dont j'ai pu apprécier la clarté de l'enseignement lors de mon Diplôme d'Etudes Approfondies, de me faire l'honneur de juger ce travail.

Pendant ces trois ans, nous avons entretenu avec l'équipe du Laboratoire GLAXO, une agréable collaboration. Je remercie particulièrement Madame D. TOULLEC, Monsieur T. GRAND PERRET et Monsieur J. KIRILOVSKY pour la gentillesse avec laquelle ils m'ont conseillée.

Je remercie Monsieur le Professeur CHAMBAZ et l'équipe du laboratoire de Biochimie des Régulations Cellulaires Endocrines (CEN de Grenoble) pour l'accueil sympathique qu'ils m'ont réservé.

Je remercie les membres du Service de Chimie des Biomolécules, pour ces quatre années passées en leur compagnie. En particulier, j'adresse mes plus vifs remerciements à Madame G. MASSE et à Monsieur P. LEMIERE pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes parents et à ma famille qui m'ont soutenue chaleureusement pendant toutes ces années d'étude.

Ces travaux ont fait l'objet des publications et communications suivantes:

PUBLICATIONS

Y. GOLDBERG, C. GLINEUR, J.C. GESQUIERE, A. RICOUART, J. SAP, B. VENNSTRÖM and J. GHYSDAEL.

Activation of protein kinase C or cAMP-dependent protein kinase increases phosphorylation of the c-erbA-encoded thyroid hormone receptor and of the v-erb-A-encoded protein.

EMBO Journal (1988), 7 (8), 2425-2433.

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Evidence for negative control in protein kinase C substrate specificity.

International Journal of Peptide and Protein Research (1989), 33, 304-307.

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Phosphorylation of the peptide c-erb-A (124-137) by Protein Kinase C. Evidence for negative control in substrate specificity.

Second Forum of Peptides. 1989, 174, 345-348.

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Inhibition of protein kinase C by retro-inverso pseudosubstrate analogues.

Biochemical and Biophysical Research Communications (sous-presse).

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Design of potent protein kinases inhibitors using the bisubstrate approach.

J. Med. Chem. (soumis)

COMMUNICATIONS

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Un nouveau concept pour la spécificité de substrat d'une protéine kinase: l'existence de séquences "signaux négatifs".

2^{ème} Forum Peptides, Nancy, (Mai 1988)

J.M. PELOSIN, M. KERAMIDAS, E.M. CHAMBAZ, A. RICOUART,
A. TARTAR

Further characterization of the bovine adrenocortical Protein Kinase C isozyme.

Biology of Cellular Transducing Signals ' 89 - IXth International Washington Spring Symposium.

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Bisubstrate inhibitor concept: Application to Protein Kinase C. Eleventh American Peptide Symposium, San Diego (Juillet 1989).

Ces travaux ont fait l'objet des publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS

A. RICOUART, P. MAES, T. BATTMANN, B. KERDELHUE, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Photosubstitution of cymantrenylalanine as a tool in peptide chemistry - Synthesis and biological activity of new GnRH analogs.

International Journal of Peptide and Protein Research (1988), 32, 56-63.

Y. GOLDBERG, C. GLINEUR, J.C. GESQUIERE, A. RICOUART, J. SAP, B. VENNSTRÖM and J. GHYSDAEL.

Activation of protein kinase C or cAMP-dependent protein kinase increases phosphorylation of the c-erbA-encoded thyroid hormone receptor and of the v-erb-A-encoded protein.

EMBO Journal (1988), 7 (8), 2425-2433.

P. MAES, A. RICOUART, E. ESCHER, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Synthesis and biological activity of new metallocenic angiotensin II analogs.

Collection of czechoslovak chemical communications, 1988, 53, 2914-2919.

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Evidence for negative control in protein kinase C substrate specificity.

International Journal of Peptide and Protein Research, (sous presse)

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Inhibition of protein kinase C by retro-inverso pseudosubstrate analogues.

Biochemical and Biophysical Research Communications (soumis)

A. RICOUART, A. TARTAR, C. SERGHERAERT

Design of potent protein kinases inhibitors using the bisubstrate approach.

J. Med. Chem. (soumis)

COMMUNICATIONS

C. SERGHERAERT, P. MAES, A. RICOUART, A. TARTAR

Analogues de la LHRH préparés par photosubstitution.

XIV GECOM, La Tour Carol (1986)

TABLE DES MATIERES

I) <u>INTRODUCTION</u>	1
II) <u>LA PROTEINE KINASE C</u>	4
A) <u>MISE EN EVIDENCE ET REPARTITION</u>	4
B) <u>ROLE PHYSIOLOGIQUE</u>	5
C) <u>PROPRIETES</u>	7
1) <u>SUBSTRATS</u>	7
2) <u>ACTIVATION</u>	8
2.1- <u>Activation par protéolyse</u>	8
2.2- <u>Activation par le calcium et les phospholipides</u>	8
2.3- <u>Activation par les esters de Phorbol</u>	14
3) <u>INHIBITION</u>	15
D) <u>SEQUENCE</u>	18
III) <u>PREPARATION DES PEPTIDES</u>	23
A) <u>SYNTHESE</u>	23
1) <u>PRINCIPE</u>	23
2) <u>LE SUPPORT</u>	23
3) <u>PROTECTION DES AMINO-ACIDES</u>	24
3.1- <u>Fonction alpha-aminée</u>	24
3.2- <u>Chaînes latérales</u>	25
4) <u>FIXATION DU PREMIER AMINO-ACIDE</u>	26
4.1- <u>Résine chlorométhylée</u>	26
4.2- <u>Résine benzhydrylamine</u>	27
5) <u>ELONGATION DE LA CHAINE</u>	27
5.1- <u>Déprotection</u>	27
5.2- <u>Couplage</u>	28
5.3- <u>Contrôle de la synthèse</u>	30
6) <u>COUPURE DE LA LIAISON PEPTIDE-RESINE</u>	30
7) <u>STRATEGIE DE SYNTHESE</u>	31

B) <u>PURIFICATION ET CONTROLES</u>	32
1) <u>TECHNIQUES DE PURIFICATION</u>	33
1.1- <u>Filtration sur gel</u>	33
1.2- <u>Chromatographie liquide haute pression (HPLC)</u> <u>en phase inversée</u>	34
2) <u>CONTROLES</u>	34
2.1- <u>Chromatographie sur couche mince (CCM)</u>	34
2.2- <u>Chromatographie liquide haute performance</u> <u>analytique</u>	35
2.3- <u>Analyse d'acides aminés</u>	35
2.4- <u>Microséquençage</u>	36
2.5- <u>Spectrométrie de masse</u>	36
IV) <u>MISE AU POINT DE SUBSTRATS ET D'INHIBITEURS</u>	
<u>PEPTIDIQUES DE LA PKC</u>	38
A) <u>METHODES GENERALES D'ETUDES ENZYMATIQUES</u>	38
1) <u>SUBSTRATS</u>	38
2) <u>INHIBITEURS</u>	41
2.1- <u>Inhibiteurs irréversibles</u>	41
2.2- <u>Inhibiteurs réversibles</u>	41
B) <u>DETERMINANTS SPECIFIQUES DE RECONNAISSANCE</u>	
<u>PAR LES ENZYMES</u>	44
1) <u>GENERALITES</u>	45
2) <u>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	46
2.1- <u>Spécificité de reconnaissance par la PKA</u>	46
2.2- <u>Spécificité de reconnaissance par la PKC</u>	48
2.2.1- Travaux justifiant la nécessité de résidus basiques en position N-terminale	49

2.2.2-	Travaux justifiant la nécessité de résidus basiques en position C-terminale	52
2.2.3-	Travaux justifiant la nécessité de résidus basiques en position C ou N-terminale	52
2.3-	<u>Conclusion</u>	55
3)	CONCEPTION ET ETUDE DE PEPTIDES SUBSTRATS DE LA PKC	56
3.1-	<u>Principe de la phosphorylation quantitative in vitro</u>	56
3.2-	<u>Etude de la protéine encodée par le c-erb A</u>	58
3.3-	<u>Influence de résidus arginines N-terminaux sur l'affinité de peptides substrats</u>	62
3.4-	<u>Influence de la position des résidus arginines C-terminaux sur l'affinité de peptides substrats</u>	66
C)	<u>CONCEPTION ET ETUDE D'INHIBITEURS DE LA PKC</u>	67
1)	ANALOGUES DE SUBSTRATS PEPTIDIQUES SPECIFIQUES DE LA PKC	67
1.1-	<u>Remplacement de la sérine par un résidu neutre</u>	67
1.1.1-	Remarques sur le mode d'évaluation des inhibiteurs	68
1.1.2-	Activité comparée des inhibiteurs à polyarginines	68
1.1.3-	Etude du peptide Arg ₄ -Ala-Arg ₆	70
1.2-	<u>Remplacement de la sérine par un résidu susceptible d'être reconnu par l'enzyme</u>	71
1.2.1-	Résidu présentant un doublet électronique libre au niveau de la chaîne latérale	72
1.2.2-	Rétro-inverso peptide	73
1.2.2-	Résultats	74
1.3-	<u>Préparation d'analogues du pseudosubstrat</u>	76
1.3.3-	Concepts	76
1.3.2-	Etude du substrat [Ala ^{9,10} ,Lys ^{11,12}]GS(1-12)	78
1.3.3-	Résultats	79

1.3.4-	Conclusion	82
2)	<u>ELABORATION DE STRUCTURES BISUBSTRAT</u>	84
2.1-	<u>Définition du modèle susceptible de se fixer sur le site ATP</u>	84
2.2-	<u>Préparation de structures mixtes Isoquinoléine-Polyarginine</u>	86
2.2.1-	Ebauche d'une structure bisubstrat	87
2.2.2-	Optimisation de la structure d'un bisubstrat	89
2.3-	<u>Analogues de l'inhibiteur "H7" pouvant être greffés en N-term</u>	97
2.3.1	Dérivés de la 1(5-isoquinoléine sulfonyl) pipérazine	97
2.3.2	Dérivés de la N-(2-aminoéthyl) 5-isoquinoléine sulfonamide	98
2.4-	<u>Fixation d'un analogue actif de "H7" sur un substrat polyarginine</u>	101
V)	<u>PREPARATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES DES DIFFERENTS SOUS-TYPES DE PKC</u>	106
A)	<u>CHOIX DES SEQUENCES</u>	106
B)	<u>UTILISATION DES PEPTIDES EN TANT QU'IMMUNOGENES</u>	110
1)	<u>MODES DE COUPLAGE</u>	110
1.1-	<u>Couplage au glutaraldéhyde</u>	110
1.2-	<u>Couplage à l'acide maléimidocaproïque</u>	111
2)	<u>CARACTERISATION DU CONJUGUE</u>	114
3)	<u>IMMUNISATIONS</u>	115
C)	<u>TESTS IMMUNOLOGIQUES</u>	117
1)	<u>TITRATION DES IMMUN-SERUMS</u>	117
1.1-	<u>Principe</u>	117
1.2-	<u>Dosage ELISA sur microplaque</u>	117

1.3- <u>Résultats: Evolution des titres antipeptide</u>	119
2) CARACTERISATION DES SOUS-TYPES DE PKC PAR LES ANTICORPS	121
2.1- <u>Purification de la PKC - Séparation des isoformes</u>	121
2.2- <u>Caractérisation des isoformes par Western-Blotting</u>	122
2.2.1- Principe	122
2.2.2- Résultats	123
2.3- <u>Conclusion</u>	124
VI) <u>CONCLUSION</u>	125
VII) <u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	130
A) <u>METHODES GENERALES</u>	130
1) PREPARATION DES REACTEURS	130
2) FIXATION DU PREMIER AMINO-ACIDE SUR UNE RESINE CHLOROMETHYLEE	130
3) DETERMINATION DE LA CHARGE D'UNE AMINO-ACYL RESINE	131
3.1- <u>Dosage des chlorures selon la méthode de Charpentier Vohlard</u>	131
3.2- <u>Dosage des fonctions amines libres</u>	132
3.2.1- Dosage à l'acide picrique selon la méthode de GISIN	132
3.2.2- Dosage à la ninhydrine selon la méthode de KAISER	132
4) ELONGATION DE LA CHAINE PEPTIDIQUE	134
4.1- <u>Activation de l'acide aminé</u>	135
4.1.1- Formation d'un ester activé d'HOBt	136
4.1.2- Formation d'anhydride symétrique	136
4.2- <u>Contrôles après déprotections et couplages</u>	136

4.2.1-	Test de KAISER	136
4.2.2-	Test de CHRISTENSEN	137
5)	INCORPORATION D'UNE STRUCTURE ARYL-SULFONYLE EN POSITION N-TERMINALE D'UN PEPTIDE	138
6)	COUPURE DE LA LIAISON PEPTIDE RESINE	138
7)	ANALYSE D'ACIDES AMINES	139
7.1-	<u>Hydrolyse sur résine</u>	140
7.2-	<u>Hydrolyse des peptides</u>	140
7.3-	<u>Analyse d'acides aminés</u>	141
8)	CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	142
8.1-	<u>Révélation par masquage de fluorescence</u>	142
8.2-	<u>Révélation à la ninhydrine</u>	142
8.3-	<u>Révélation par le réactif de Reindel-Hoppe</u>	143
9)	TESTS DE PHOSPHORYLATION	144
9.1-	<u>Milieu réactionnel</u>	145
9.2-	<u>Incubation</u>	146
9.3-	<u>Séparation du substrat phosphorylé</u>	146
9.3.1-	Séparation sur papier échangeur d'ion	146
9.3.2-	Séparation par précipitation au TCA	147
10)	COUPLAGE D'UN PEPTIDE SUR UNE PROTEINE PORTEUSE	148
10.1-	<u>Préparation de la protéine porteuse</u>	148
10.2-	<u>Couplage au glutaraldéhyde</u>	148
10.3-	<u>Couplage avec le 6-maléimidocaproate de N-hydroxy-succinimide</u>	149
10.3.1-	Préparation du MCS	149
10.3.2-	Activation de la protéine porteuse	150
10.3.3-	Réduction du peptide	150
10.3.4-	Réaction de couplage	151
11)	DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE LOWRY	152

12) DOSAGE DES FONCTIONS THIOLS SELON LA METHODE D'ELLMAN	153
13) DOSAGE DES IMMUN-SERUMS SELON LA METHODE ELISA	154
B) <u>EXEMPLES DE SYNTHESSES</u>	157
1) PREPARATION DES QUATRE PEPTIDES SUBSTRATS DE LA PKC: S1, S2, S3 ET S4	157
1.1- <u>Synthèse</u>	157
1.2- <u>Purification</u>	160
1.2.1- Gel filtration	160
1.2.2- Contrôle de pureté	161
1.2.3- Contrôle d'identité	162
2) <u>SYNTHESE D'ANALOGUES DE L'INHIBITEUR H7 UTILISES DANS LE CADRE DES BISUBSTRATS</u>	167
2.1- <u>(1-dansyl, 2-méthyl) pipérazine</u>	167
2.2- <u>1-(8-quinoléine sulfonyl)-2-méthyl pipérazine</u>	168
2.3- <u>5-isoquinoléine sulfochlorure</u>	168
2.4- <u>Acide théophylline acétique</u>	169
2.5- <u>1-(5-isoquinoléine sulfonyl) pipérazine [I₁]</u>	169
2.6- <u>N-(5-isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-méthyl propionate) pipérazine [I₂]</u>	170
2.7- <u>N-(5-isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-méthyl valérate) pipérazine [I₃]</u>	171
2.8- <u>N-(2-aminoéthyl) 5-isoquinoléine sulfonamide</u>	172
2.9- <u>[N-(3-méthylpropionate), N'(5-isoquinoléine sulfonyl) éthylène diamine [I₅]</u>	173
2.10- <u>N-[2-(succinimido)éthyl] 5-isoquinoléine sulfonamide [I₆]</u>	173
2.11- <u>N-[2-(succinimido)éthyl]5-isoquinoléine sulfonamide, méthyl ester [I₇]</u>	174

2.12- <u>N-(5-isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-propionyl</u>	
<u>-Ser-Arg₆) éthylène diamine ["I₅-Ser-Arg₆"]</u>	175
3) PREPARATION DE PEPTIDES ANTIGENIQUES	177
3.1- <u>Peptide antigénique PKC alpha</u>	177
3.1.1- Synthèse	177
3.1.2- Purification	180
3.1.3- Contrôles	181
3.2- <u>Peptide antigénique PKC bêta</u>	183
3.2.1- Synthèse	183
3.2.2- Purification	183
3.2.3- Contrôles	184
3.3- <u>Peptide antigénique PKC gamma</u>	186
3.3.1- Synthèse	186
3.3.2- Purification	186
3.3.3- Contrôle	187
4) PREPARATION DES CONJUGUES	188
4.1- <u>Conjugué PKC alpha</u>	188
4.1.1- Préparation de la BSA activée	188
4.1.2- Réduction et couplage du peptide	189
4.1.3- Analyse d'acides aminés du peptide	189
4.2- <u>Conjugué PKC bêta</u>	191
4.2.1- Dialyse de l'anatoxine tétanique	191
4.2.2- Couplage du peptide	191
4.2.3- Contrôle du conjugué	191
4.3- <u>Conjugué PKC gamma</u>	192
 VIII <u>FICHES ANALYTIQUES DES SUBSTRATS ET</u>	
<u>INHIBITEURS PEPTIDIQUES PREPARES</u>	194
 IX <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	217

ABREVIATIONS

- Acides aminés naturels

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

- Acides aminés exotiques

βAla = βA = β Alanine	Orn = O = Ornithine
AA	acide aminé
AT	anatoxine tétanique
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
BSA	sérumalbumine bovine
CCM	chromatographie sur couche mince
DAG	diacylglycérol
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DCU	dicyclohexylurée
DIEA	diisopropyléthylamine
DMF	diméthylformamide
DTT	dithiotréitol
FAB	spectrométrie de masse par fast atomic bombardment
GMPC	guanosine monophosphate cyclique
HF	acide fluorhydrique
HOBT	hydroxybenzotriazole
HPLC	chromatographie liquide haute performance
K _m	constante de Michaelis
MCS	maléimidocaproate de N-hydroxysuccinimide
MLCK	myosin light chain kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase G
PKM	protéine kinase M
PS	phosphatidylsérine
tBoc	tertiobutyloxycarbonyl
TBP	tributylphosphine
TFA	acide trifluoroacétique

INTRODUCTION

La modification des protéines par addition réversible d'un groupement phosphate, est un processus qui intervient à tous les stades du développement et du fonctionnement de la cellule. Ces réactions biochimiques mineures induisent un changement conformationnel de la protéine avec modification de son activité biologique. La phosphorylation et la déphosphorylation sont régies chacune par une famille d'enzymes, respectivement les protéines kinases et les protéines phosphatases. Ces enzymes régulent le métabolisme cellulaire, l'activité des facteurs de transcription et la synthèse protéique. Outre leur rôle intracellulaire strict, elles sont impliquées dans les phénomènes de neurotransmission, de régulation du flux ionique au travers de la membrane et de transduction des informations extracellulaires.

Des fonctions aussi diverses sont en fait régies par un nombre restreint d'enzymes. La famille des protéines kinases a été très étudiée, et l'intérêt qui lui était porté s'est accru par la découverte que de nombreux oncogènes présentent une activité kinasique. La nature du résidu modifié permet de les classer en deux groupes:

- les protéines tyrosine kinases, qui sont le plus souvent des récepteurs membranaires, cibles directes d'hormones,
- les protéines sérine/thréonine kinases, enzymes intracytoplasmiques régulées par des médiateurs chimiques ou seconds messagers, sécrétés en réponse à un message extracellulaire. Ces kinases activées par des mécanismes différents peuvent contrôler un même processus cellulaire, par action synergique ou antagoniste. On distingue trois types de Ser/Thr kinases caractérisées par la nature du second messenger:

- les kinases dépendantes des nucléotides cycliques (AMPc ou GMPc)
- les kinases dépendantes du calcium et éventuellement de la calmoduline
- une kinase dépendante du calcium et des phospholipides décrite plus récemment, la protéine kinase C (PKC).

Outre les fonctions cellulaires précédemment décrites, cette dernière constitue le récepteur physiologique et le relais par lequel certains promoteurs tumoraux, tels que les esters de phorbol, activent la prolifération cellulaire.

S'il est certain que la PKC joue un rôle fondamental dans la cellule, de nombreuses questions restent actuellement sans réponse:

- quels sont les processus nécessitant l'intervention de la PKC?
- quels sont les substrats physiologiques de la PKC, c'est à dire les protéines phosphorylées?
- quel est le mode de régulation de l'enzyme?

La complexité de son étude est accrue par la découverte récente de plusieurs gènes codant pour différentes isoformes de PKC, dont la répartition ne semble pas homogène dans les tissus. Il reste à montrer si ces isoformes ont une spécificité de substrats et un mode de régulation différents.

Nous avons choisi de développer deux éléments importants pour l'étude de la PKC:

- La préparation d'inhibiteurs spécifiques. En effet, l'implication de la PKC dans un processus cellulaire, peut être justifiée par le fait que l'utilisation d'un activateur de l'enzyme tel qu'un ester de phorbol, et d'un inhibiteur se traduit par un effet inverse sur le processus étudié.
- La caractérisation des différentes isoformes par des marqueurs

spécifiques, pour les identifier après purification ou les localiser sur coupes tissulaires.

La chimie des peptides naturels et modifiés a constitué la base de notre travail. Après avoir étudié les critères qui régissent la spécificité de la PKC vis à vis de ses substrats protéiques, nous avons préparé des séquences peptidiques susceptibles d'être phosphorylées par l'enzyme. Puis ces structures ont été modifiées dans le but d'obtenir des inhibiteurs spécifiques compétitifs vis à vis du site actif.

Pour la caractérisation des isoformes de PKC, nous avons sélectionné et synthétisé une séquence peptidique spécifique de chaque sous-type, qui utilisée en tant qu'immunogène devait nous fournir des anticorps spécifiques.

LA PROTEINE KINASE C

A) MISE EN EVIDENCE ET REPARTITION

La protéine kinase C (PKC) fut décrite pour la première fois en 1977 par l'équipe de Nishizuka qui mit en évidence son activation par protéolyse, fournissant ainsi la protéine kinase M capable de phosphoryler in vitro les histones et la protamine (TAKAI 1977, NISHIZUKA 1978). Par la suite un mode d'activation plus physiologique fut découvert, ce qui semblait être une proenzyme était en fait une protéine kinase activable par le calcium et les phospholipides, indépendante des nucléotides cycliques (TAKAI 1979).

La Protéine Kinase C est répartie dans la plupart des cellules, les plus fortes concentrations sont retrouvées dans la rate, le cerveau, et les cellules sanguines (plaquettes, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles et cellules leucémiques). Les plus faibles concentrations sont trouvées dans le coeur, le thymus et les muscles du squelette.

Dans les conditions d'extraction cellulaire, l'enzyme est retrouvée essentiellement dans les fractions solubles. In vivo sa localisation est variée, mais elle est toujours en faible quantité dans le noyau. Dans les cellules du coeur elle est localisée dans le cytosol, dans le cerveau elle est répartie pour moitié dans le cytosol et pour moitié dans les fractions particulières (associée aux membranes synaptiques), dans les neutrophiles elle se situe au niveau de la membrane. Cependant la répartition cytosol/membrane n'est pas constante, la fraction soluble semble correspondre à la forme inactive de l'enzyme, et lors de son activation par les phospholipides il se produirait une translocation de la protéine du cytosol vers la membrane (SCHATZMAN 1984, NISHIZUKA 1984, 1986).

B) ROLE PHYSIOLOGIQUE

La phosphorylation des protéines est un processus qui intervient dans le transfert d'une information de l'extérieur à l'intérieur de la cellule. Ce transfert s'accompagne d'un phénomène d'amplification du message, un stimulus extérieur provoque la libération de nombreuses molécules "seconds messagers" activant ainsi plusieurs protéines kinases analogues, qui elles-mêmes vont phosphoryler un nombre important de substrats. Ainsi, une hormone active à des concentrations nanomolaires provoque en quelques secondes la production de molécules en concentration millimolaire.

La protéine kinase C joue un rôle analogue à celui des enzymes dépendantes du calcium. Les processus médiés par ces enzymes régulent la sécrétion et l'exocytose de constituants cellulaires de nombreux tissus exocrines ou endocrines, et activent de nombreuses fonctions cellulaires. Ce rôle de la PKC a été mis en évidence pour la première fois dans les plaquettes, où l'hydrolyse des phosphoinositides induite par la thrombine ou le collagène est toujours associée à une augmentation du diacylglycérol intracellulaire, à la phosphorylation d'une protéine de 40 kD et à la sécrétion de sérotonine.

La PKC régit le rétrocontrôle qui suit la stimulation de certains récepteurs, ce qui évite une réponse prolongée et restaure la sensibilité du récepteur à de nouveaux signaux. Par exemple, la phosphorylation par la PKC du récepteur de l'EGF (facteur de croissance épidermique) provoque une diminution de son activité intrinsèque tyrosine kinase et de sa liaison au facteur de croissance. De même, la PKC réduit l'activité tyrosine kinase

Tissues and cells	Responses
Endocrine systems	
Adrenal medulla	Catecholamine secretion
Adrenal cortex	Aldosterone secretion
	Steroidogenesis
Pancreatic islets	Insulin release
Insulinoma cells	Insulin release
Pituitary cells	Pituitary hormone release
	Growth hormone release
	Luteinizing hormone release
	Prolactin release
	Thyrotropin release
Parathyroid cells	Parathyroid hormone release
Thyroid C cells	Calcitonin release
Leydig cells	Steroidogenesis
Exocrine systems	
Pancreas	Amylase secretion
Parotid gland	Amylase and mucin secretion
Submandibular gland	Mucin secretion
Gastric gland	Pepsinogen secretion
	Gastric acid secretion
Alveolar cells	Surfactant secretion
Nervous systems	
Ileal nerve endings	Acetylcholine release
Neuromuscular junction	Transmitter release
Caudate nucleus	Acetylcholine release
PC 12 cells	Dopamine release
Neurons	Dopamine release
Muscular systems	
Vascular smooth muscle	Muscle contraction
	Muscle relaxation
Inflammation and immune systems	
Platelets	Serotonin release
	Lysosomal enzyme release
	Arachidonate release
	Thromboxane synthesis
Neutrophils	Superoxide generation
	Lysosomal enzyme release
	Hexose transport
Basophils	Histamine release
Mast cells	Histamine release
Lymphocytes	T-lymphocyte activation
	B-lymphocyte activation
Metabolic and other cell systems	
Adipocytes	Lipogenesis
	Glucose transport
Hepatocytes	Glycogenolysis
Epidermal cells	Inhibition of gap junction
Fibroblasts	Inhibition of gap junction
Hepatocytes	Inhibition of gap junction

TABLEAU 1 Rôles possibles de la protéine kinase C
dans la réponse cellulaire (NISHIZUKA 1986)

du récepteur de l'insuline, induisant une diminution de la réponse cellulaire, elle agit aussi sur le récepteur de l'adrénaline et de l'angiotensine II (BOLLAG 1986).

La PKC module les échanges ioniques cellulaires en phosphorylant des protéines membranaires: canaux, pompes et protéines échangeuses d'ions, et participerait à l'exclusion du calcium après sa mobilisation induite par un signal extracellulaire.

La PKC a aussi un rôle à long terme dans l'expression des gènes et la prolifération cellulaire. Par exemple elle induit, en synergie avec les kinases calcium-dépendantes, la synthèse d'ADN dans les lymphocytes circulants appauvris en macrophages.

La découverte récente que la PKC est le "récepteur" des esters de phorbol, puissants promoteurs tumoraux, a fortement accru l'intérêt porté à cette enzyme. Ces composés favorisent le développement de tumeurs induites par des carcinogènes chimiques. In vitro ils sont capables d'activer la PKC à des concentrations de l'ordre de 10 nM; in vivo l'enzyme activée de façon anarchique et prolongée constituerait le relais par lequel ils exercent la promotion tumorale.

Les conséquences de ce phénomène sont d'autant plus importantes que la PKC est une enzyme ubiquitaire. Le tableau 1, publié récemment par NISHIZUKA (1986), résume les différents travaux effectués sur l'enzyme et énumère les processus cellulaires dans lesquels la PKC est susceptible d'intervenir.

Substrate proteins
Receptor proteins
Epidermal growth factor receptor
Insulin receptor
Somatomedin C receptor
Transferrin receptor
Interleukin-2 receptor
Nicotinic acetylcholine receptor
β -adrenergic receptor
Immunoglobulin E receptor
Membrane proteins
Ca ²⁺ -transport ATPase
Na ⁺ /K ⁺ ATPase
Na ⁺ channel protein
Na ⁺ /H ⁺ exchange system
Glucose transporter
GTP-binding protein
HLA antigen
Chromaffin granule-binding protein
Synaptic B50 (F1) protein
Contractile and cytoskeletal proteins
Myosin light chain
Troponin T and I
Vinculin
Filamin
Caldesmon
Cardiac C-protein
Microtubule-associated proteins
Enzymes
Glycogen phosphorylase kinase
Glycogen synthase
Phosphofructokinase
β -Hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A reductase
Tyrosine hydroxylase
NADPH oxidase
Cytochrome P450
Guanylate cyclase
DNA methylase
Myosin light chain kinase
Initiation factor 2
Other proteins
Fibrinogen
Retinoid-binding proteins
Vitamin D-binding protein
Ribosomal S6 protein
GABA modulin
Stress proteins
Myelin basic protein
High-mobility group proteins
Middle T antigen
pp60 ^{src} protein

TABLEAU 2 Substrats physiologiques possibles de la protéine kinase C (NISHIZUKA 1986)

C) PROPRIETES

1) **SUBSTRATS**

Le donneur de phosphate utilisé par la PKC est l'adénosine triphosphate (ATP), à l'exclusion de tout autre nucléotide (WISE 1982). Son K_m (constante de Michaelis) vis à vis des histones H1 est de 4 à 8 μM selon les auteurs (SCHATZMAN 1984). La réaction de phosphorylation n'affecte que les résidus sérines ou thréonines, et ne concerne pas les résidus tyrosines.

La plupart des substrats sont phosphorylés sous la dépendance du calcium et des phospholipides, à l'exception de certaines protéines telles que les protamines qui ne nécessitent pas d'activateur; dans ce dernier cas le mode de régulation de l'enzyme n'est pas encore élucidé (TAKAI 1977).

In vitro la PKC phosphoryle un très grand nombre de protéines telles que des enzymes, des récepteurs, des canaux ioniques, des protéines de transport, des protéines du muscle. Mais il n'est pas prouvé que ces protéines soient substrat dans les conditions physiologiques. Par exemple, les histones H1, substrat classiquement utilisé pour l'étude de la PKC, présentent une bonne affinité pour l'enzyme avec un K_m de 0,7 μM ; mais la PKC étant présente en très faible quantité dans le noyau, il est peu probable qu'elles constituent un substrat majeur de la cellule (ASCHEDEL 1985).

Dans une publication récente, NISHIZUKA (1986) proposait une liste des protéines phosphorylées in vitro et supposées substrat de la PKC in vivo (Tableau 2). Sa diversité d'action traduit toute l'importance que peut avoir cette enzyme dans la

régulation des processus cellulaires.

Quelques protéines sont connues pour être substrat *in vivo*: protéine des plaquettes de 40-47 kD, myosin light chain, récepteur de l'EGF, protéine ribosomale S6.

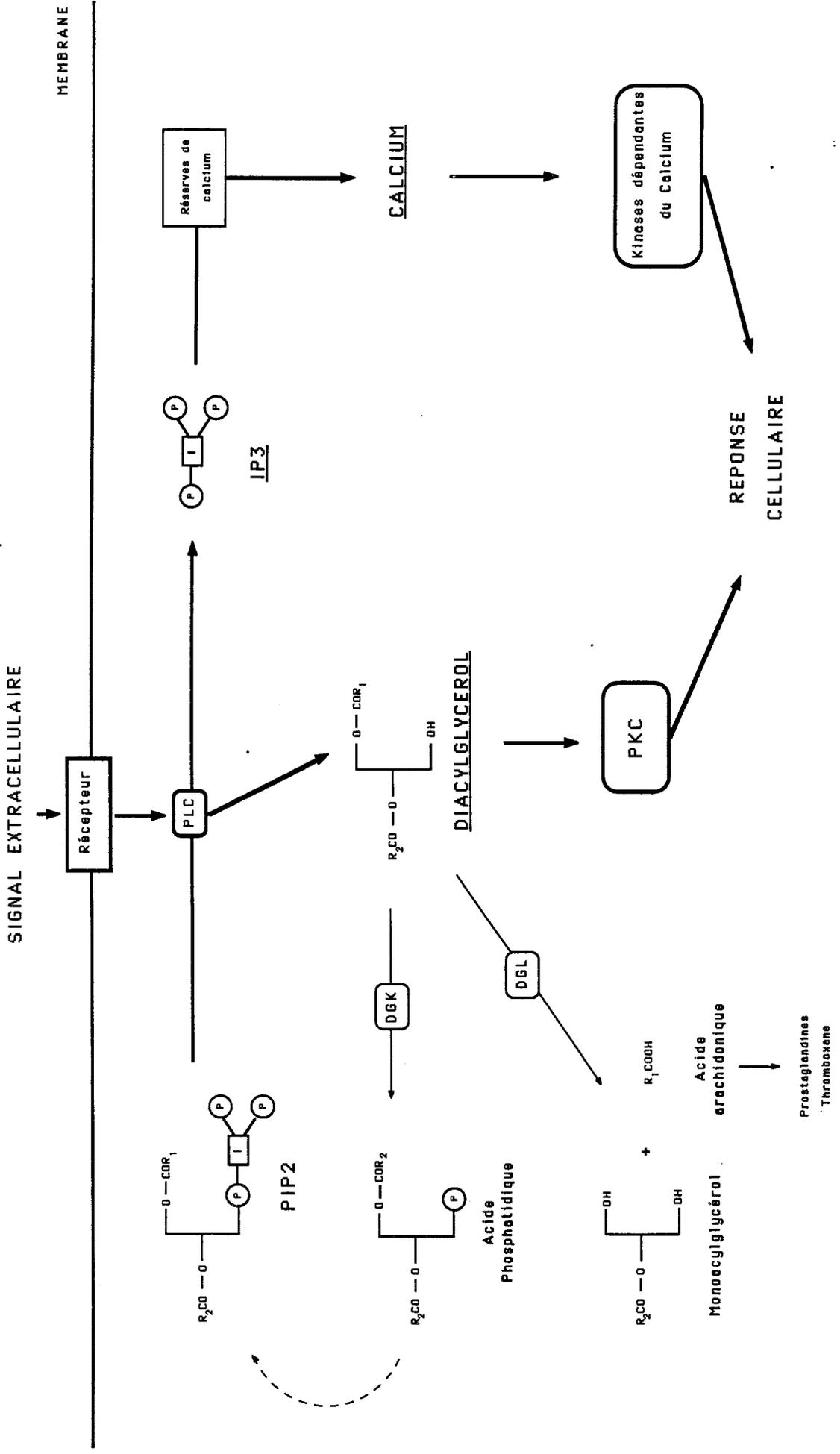
2) ACTIVATION

2.1-Activation par protéolyse

En absence d'activateur, la protéine kinase C de masse moléculaire 77 kD ne phosphoryle que des substrats comme la protamine; sous l'action d'une protéase calcium-dépendante (calpaïne) ou de la trypsine elle fournit la protéine kinase M (PKM) d'environ 51 kD, dont le domaine d'activité est beaucoup plus large (histones, glycogène synthétase...). La PKM est indépendante du calcium, des phospholipides et des nucléotides cycliques, mais ce mode d'activation est irréversible. Ces observations suggèrent que la PKC est composée d'au moins deux domaines: un domaine catalytique et un domaine régulateur.

2.2-Activation par le calcium et les phospholipides

In vitro, la PKC est activée par la présence simultanée de calcium et de phospholipides, le plus actif étant la phosphatidylsérine (PS). Le diacylglycérol (DAG), inactif seul, augmente fortement l'affinité de l'enzyme pour la phosphatidylsérine et le calcium. L'activation de la PKC nécessite une concentration en calcium de 50 à 100 μM , cette valeur est ramenée à 1 ou 2 μM en présence de diacylglycérol, et correspond



[I] = Inositol, (P) = Résidu phosphate, PLC = Phospholipase C,
 PIP2 = phosphatidylinositol 4-5 biphosphate, IP3 = Inositol 1-4-5 triphosphate,
 DGK = Diacylglycérol kinase, DGL = Diacylglycérol lipase

Figure 1 Mécanisme de formation du diacylglycérol et d'activation de la PKC in vivo.

aux concentrations cellulaires habituelles. Le calcium est donc nécessaire à l'activité de la PKC mais ne joue pas le rôle de régulateur *in vivo* (SHATZMAN 1984, NISHIZUKA 1984).

Les diacylglycérols les plus actifs sont la dioléine, la dilinoléine et la diarachidonine. Les études de relations structure-activité ont révélé que les deux fonctions esters et la fonction alcool étaient indispensables à leur activité, et que ces molécules devaient présenter une configuration 1,2 sinister. La longueur des chaînes d'acides gras a peu d'importance, mais la présence d'au moins une chaîne insaturée en position 2 est favorable (KISHIMOTO 1979, GANONG 1986, NISHIZUKA 1986).

In vivo le diacylglycérol est habituellement absent de la cellule, il n'apparaît que de façon transitoire lors de l'hydrolyse des phosphoinositides. En effet, la fixation d'une grande variété de molécules biologiques (hormones, neurotransmetteurs, antigènes...) sur leur récepteur spécifique extracellulaire, se traduit au niveau de la membrane par l'activation de la phospholipase C (PLC), induite semble-t-il par une kinase GMPC-dépendante. La PLC hydrolyse le phosphatidyl inositol 4-5 biphosphate (PIP₂) en inositol 1-4-5 triphosphate (IP₃) d'une part, et en diacylglycérol (DAG) d'autre part qui vont agir en tant que seconds messagers. L'IP₃ libéré dans le cytosol provoque la mobilisation du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique, alors que le DAG localisé dans la membrane va activer la PKC (Figure 1) (NISHIZUKA 1984,1986, BERRIDGE 1984).

Ces messagers ont une durée de vie très courte, l'IP₃ est rapidement hydrolysé en inositol qui sera réutilisé pour la synthèse des phosphoinositides. Le diacylglycérol subit deux types de métabolisation:

- soit une phosphorylation par une diacylglycérol kinase pour fournir l'acide phosphatidique ensuite utilisé pour la synthèse des phosphoinositides

- soit une hydrolyse par une diacylglycérol lipase qui conduit au monoacyl glycérol ensuite hydrolysé en acide arachidonique et glycérol. L'acide arachidonique est le précurseur d'autres médiateurs: prostaglandines, thromboxane et leucotriènes.

Le transfert du message extracellulaire à l'intérieur de la cellule se traduit donc par la libération de deux messagers qui activent simultanément deux routes: celle de la protéine kinase C par l'action du diacylglycérol, et en parallèle, celle des kinases calcium-dépendantes (telles que la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline) activées par l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, induite par l'IP3. Ces deux mécanismes agissent au niveau cellulaire de façon synergique ou coopérative, produisant ainsi la réponse finale de la cellule au stimulus extérieur.

L'effet des seconds messagers est fugace, par contre la durée de la réponse cellulaire est fonction de la stabilité des groupements phosphates amenés sur les protéines phosphorylées.

* Modèle d'activation de la PKC in vivo (BELL 1986)

Des études in vitro et sur des cultures cellulaires, ont montré que le phénomène de translocation de la PKC du cytosol vers la membrane intervenait lors de l'activation et que cette translocation devait avoir un rôle important dans le transfert de l'information. D'autre part, le calcium contrôle cette liaison à la membrane alors que le diacylglycérol contrôle à la fois la liaison et l'activité de l'enzyme.

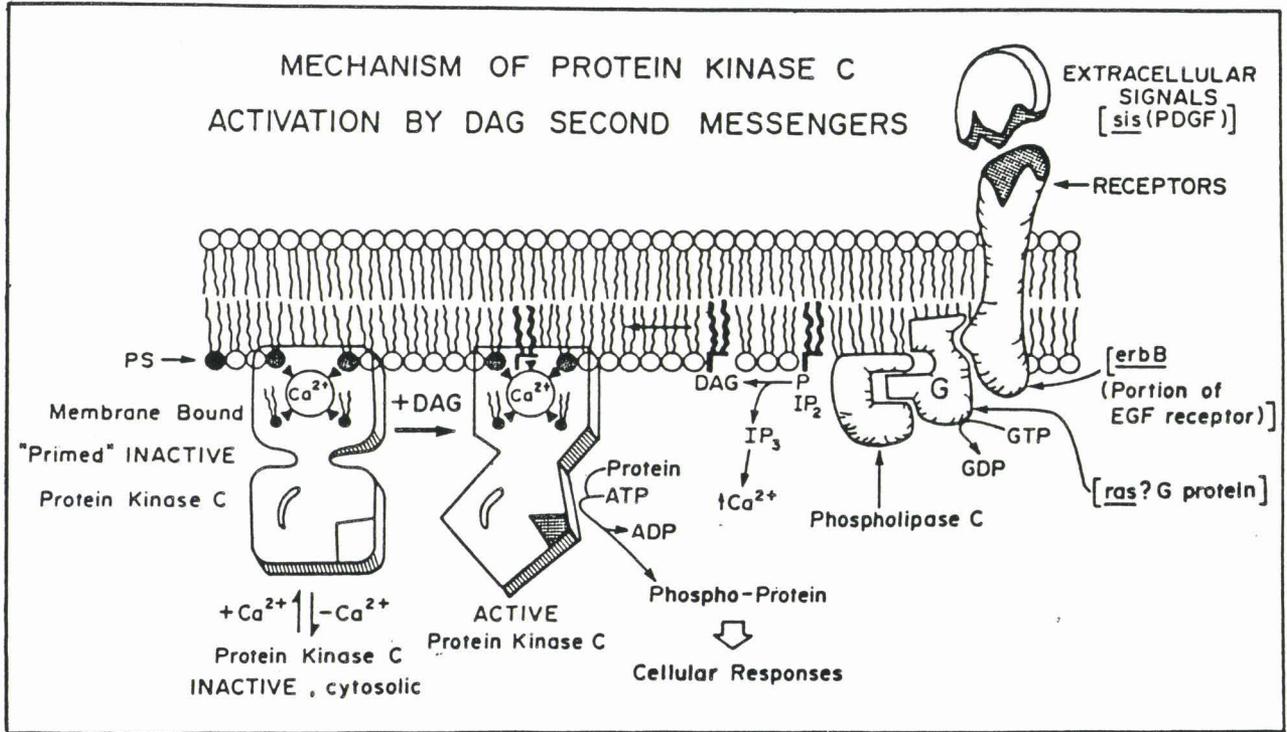


FIGURE 2 Modèle d'activation de la protéine kinase C in vitro
(BELL 1986)

L'activation de la PKC par la phosphatidyl sérine, le diacylglycérol et le calcium a été étudiée avec des micelles mixtes au triton X 100. Plusieurs éléments sur la spécificité, la stoechiométrie et le mécanisme d'activation ont pu être mis en évidence:

- la PKC est pleinement activée par des micelles contenant 8 moles % de phosphatidylsérine et 2,5 moles % de diacylglycérol (fractions semblables à celles trouvées dans les membranes plasmiques activées)
- l'activation ne nécessite pas de bicouche lipidique
- l'activation par la phosphatidylsérine est hautement coopérative et nécessite au moins quatre molécules.
- l'activation par le diacylglycérol n'est pas coopérative et ne nécessite qu'une molécule.
- les monomères de PKC se lient aux micelles mixtes de façon dépendante du calcium et de la phosphatidylsérine mais sont inactifs en absence de diacylglycérol.
- la stoechiométrie minimale est d'un monomère de PKC, une molécule de diacylglycérol, une molécule de calcium et quatre molécules de phosphatidylsérine.

Bell a proposé un modèle d'activation de la PKC in vivo (Figure 2):

Quatre molécules de PS forment une structure à la surface de la membrane et se lient au calcium par leur groupement carboxylique. La PKC se lie à ce complexe $4PS-Ca^{++}$. A ce stade la PKC est inactive. Puis le diacylglycérol produit en réponse à un signal extracellulaire, se déplace rapidement dans le plan de la membrane, et interagit par trois points de contact avec le complexe $PKC-é4PS-Ca^{++}$. Il se forme probablement une liaison

directement entre le calcium et le diacylglycérol qui expliquerait l'augmentation d'affinité de la PKC pour le calcium. La formation des trois liaisons entre le DAG et le complexe (une avec le calcium et deux avec la PKC) provoque un changement de conformation qui activerait l'enzyme. Puis la PKC est inactivée quand le DAG se dissocie de la membrane. L'enzyme peut ensuite rester liée à la membrane ou être relarguée dans le cytoplasme.

Ce modèle suggère que la PKC phosphoryle préférentiellement des séquences protéiques situées à proximité de la membrane plasmique. Ceci a été confirmé par l'étude de récepteurs et de protéines membranaires substrats de la PKC. Dans de nombreux cas la phosphorylation intervient sur un site cytoplasmique situé à une faible distance de la membrane:

- 9 AA pour la Thr 654 du récepteur de l'EGF (HUNTER 1984)
- 7 AA pour la Ser 247 du récepteur de l'interleukine 2 (GALLIS 1986).
- 38 AA pour la Ser 63 du récepteur de la transferrine, dans ce cas le résidu phosphorylable est plus éloigné mais pour les auteurs la structure tertiaire de la protéine pourrait situer le résidu phosphorylable à une distance beaucoup plus proche de la membrane (LIN 1986).
- 9 AA pour la Ser 12 de la protéine membranaire pp60^{src} (GOULD 1985). Contrairement aux récepteurs qui présentent une séquence transmembranaire, cette dernière protéine est ancrée dans la membrane grâce à la présence d'un acide myristique en N-term.

De nombreuses protéines sont myristylées in vivo mais le rôle de cette modification n'est pas encore élucidé. Dans certains cas ce phénomène a été corrélé avec la phosphorylation par la

PKC. ADEREM (1988) a montré que le traitement de macrophages par les lipopolysaccharides (LPS) se traduisait par l'incorporation spécifique d'acide myristique dans plusieurs protéines, en particulier dans une protéine de 68 kd analogue au substrat majeur de la PKC dans le cerveau et les fibroblastes. Or, la phosphorylation de cette protéine peut être induite par ces LPS. Selon l'auteur, la myristylation constituerait un mode de transduction d'un signal dans la cellule, impliqué dans la séquence d'événements suivants:

- 1- myristylation induite par les LPS
- 2- migration de la protéine myristylée vers la membrane où elle peut s'associer avec la PKC
- 3- phosphorylation par la PKC
- 4- relargage de la protéine phosphorylée dans le cytoplasme, peut-être induit par une démyristylation.

L'influence de la myristylation sur la phosphorylation in vitro par la PKC membranaire, a été étudiée par UTSUMI (é&1988) sur le modèle du lysozyme. Cet auteur a montré que la présence d'un acide gras à longue chaîne conférait à la protéine la possibilité de se lier à la membrane et par conséquent augmentait de manière significative sa phosphorylation par la PKC.

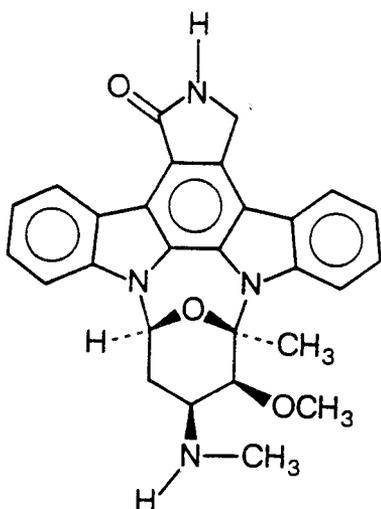
En conclusion, bien que la PKC soit une protéine soluble, elle phosphoryle essentiellement des protéines membranaires ou associées à la membrane. Cette caractéristique est un élément important de sélectivité et doit être pris en compte lors la recherche de substrats potentiels.

2.3- Activation par les esters de phorbol

Les esters de phorbol, puissants promoteurs tumoraux, peuvent activer la PKC à des doses de l'ordre de 0,01 μM . Ils se fixent sur l'enzyme à la place du diacylglycérol et miment son action: augmentation de l'affinité pour le calcium et la phosphatidylsérine, activation (BERRIDGE 1984, SCHATZMAN 1984). Les diesters de phorbol présentent les mêmes déterminants structuraux que le diacylglycérol (deux oxygènes sur les carboxyles des fonctions esters et une fonction hydroxyle) (GANONG 1986) mais ils se lient peut-être à l'enzyme avec un nombre de liaisons plus important ce qui expliquerait leur plus grande affinité.

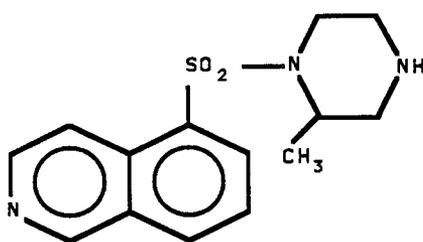
Les effets biologiques des esters de phorbol sont liés à la phosphorylation de différentes protéines par la PKC; mais à la différence du diacylglycérol ils ont une durée d'action prolongée due à leur métabolisation beaucoup plus lente. De plus, l'hypothèse de la translocation de la PKC peut expliquer pourquoi les esters de phorbol ont des effets sur des cellules différentes de celles sensibles aux agents qui accroissent la concentration en DAG. En effet la synthèse de DAG n'est connue que dans la membrane plasmique, seul site où la PKC peut être activée physiologiquement. Par contre les esters de phorbol et le calcium n'ont pas de localisation précise et peuvent induire l'association de la PKC avec différents types de membranes et donc des processus biologiques différents. Ces molécules sont actuellement très utilisées pour étudier le rôle physiologique de la PKC sur cultures cellulaires car contrairement au diacylglycérol, ils peuvent pénétrer dans les cellules. L'amplification d'un processus biologique par les esters de phorbol, est un élément qui suggère l'intervention de la PKC à un des stades de ce processus.

A



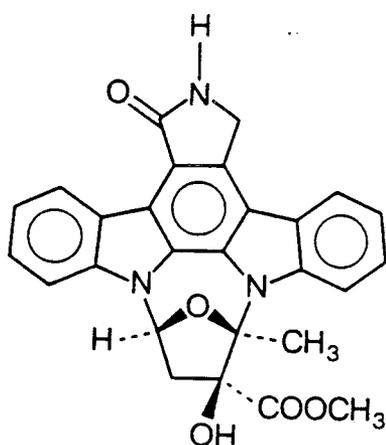
Staurosporine

B



1-(5-isoquinoline sulfonyl)-2-méthyl pipérazine (H7)

C



K-252a (= SF-2370)

FIGURE 3 Inhibiteurs de la protéine kinase C

3) INHIBITION

De nombreuses molécules sont connues pour inhiber la protéine kinase C, mais actuellement aucune d'entre elles ne présente une spécificité satisfaisante.

Parmi ces inhibiteurs on trouve:

- des psychotropes (chlorpromazine, imipramine, fluphénazine, halopéridol),
- des anesthésiques locaux (dibucaïne, tétracaïne),
- des polyamines (spermine, spermidine, cadavérine),
- le vérapamil, l'adriamycine, la palmitoylcarnitine, la mellitine, l'héparine, la polymyxine B, la vitamine E, l'acide rétinoïque... Ces molécules n'ont pas d'effet direct sur l'enzyme et sont inactives sur la PKC, la plupart d'entre-elles agissant par interaction avec les phospholipides (NISHIZUKA 1984, SCHATZMAN 1984).

La staurosporine (Figure 3 A), connue pour ses propriétés antifongiques, est actuellement l'inhibiteur le plus puissant de la PKC avec une constante d'inhibition (K_i) de 2,7 nM. Elle semble agir directement sur l'enzyme et n'entre pas en compétition avec les phospholipides, le calcium, le substrat protéique, ni l'ATP. Cependant elle inhibe aussi la PKA (protéine kinase dépendante de l'AMPC) pour des concentrations analogues.

La PKC est inhibée par des molécules entrant directement en compétition avec l'ATP. C'est le cas des dérivés du chloronaphtalène sulfonamide, inhibiteurs communs de la MLCK (myosin light chain kinase), la PKA, la PKG (protéine kinase

dépendante de la GMPC) et la PKC. Les dérivés d'isoquinoléines sulfonamides n'inhibent que les kinases dépendantes des nucléotides cycliques et la PKC. Dans cette série la 1-(5-isoquinoline sulfonyl),2-méthylpipérazine (H7, Figure 3 B) présente la meilleure activité sur la PKC avec un K_i de 6 μM , mais aucune spécificité vis à vis de la PKA ou de la PKG (HIDAKA 1984, 1987).

Le composé K-252a (Figure 3 C), isolé d'une culture de *Nocardiosis sp.* a des propriétés antibactériennes et antifongiques, et présente une analogie structurale avec la staurosporine. Il inhibe la PKC avec un K_i de 25 nM, de façon compétitive avec l'ATP, mais agit aussi sur les kinases dépendantes des nucléotides cycliques, K_i de 18 nM pour PKA et 20 nM pour PKG (KASE 1987)

* Inhibition par les pseudosubstrats

Il a été suggéré que la partie régulatrice des protéines kinases possédait une séquence qui, en l'absence de seconds messagers, était responsable de l'inhibition du domaine catalytique (CORBIN 1978).

Le premier modèle proposé considérait que les zones d'autophosphorylation des protéines étaient impliquées dans cette inhibition. Ce modèle a été étendu à des enzymes ne présentant pas d'autophosphorylation dans la partie régulatrice. Sachant que les résidus phosphorylés par un type de kinase donné, doivent être situés dans un environnement particulier en acides aminés, cet enchaînement a été recherché dans le domaine régulateur de nombreuses enzymes. Ce type de séquence nommée pseudosubstrat, a été détectée mais présentait un résidu neutre en lieu et place du

résidu phosphorylable. Cette séquence viendrait se positionner au niveau du site actif et empêcherait l'approche des substrats. En se liant à l'enzyme, les activateurs provoqueraient un changement de conformation qui détacherait le pseudosubstrat du site actif et autoriserait l'accès des substrats protéiques. Les peptides synthétiques basés sur la structure des sites d'auto-phosphorylation ou des pseudosubstrats de la myosin light chain kinase, la calmodulin dépendent protein kinase II, et la protéine kinase C se sont révélés de bons inhibiteurs pour leurs kinases respectives avec un K_i de l'ordre de $1 \mu\text{M}$ (HARDIE 1988).

Dans le cas de la PKC, le peptide correspondant présente un K_i de 147 nM vis à vis d'un peptide dérivé de la glycogène synthase. Son analogue contenant une sérine est phosphorylé par l'enzyme avec un K_m de 200 nM , (une des plus faibles valeurs connues pour cette enzyme) (HOUSE 1987).

Le pseudosubstrat de la PKC en plus du concept attrayant qu'il implique, est un espoir pour l'obtention d'un inhibiteur compétitif et spécifique. Cependant ses propriétés inhibitrices ne s'exercent pas vis à vis de tous les substrats et en particulier pour les histones H1; on ne peut donc généraliser son utilisation.

Actuellement l'inhibiteur le plus utilisé pour l'étude de la PKC est le composé H7, bien qu'il ne soit pas spécifique. La découverte d'inhibiteurs spécifiques reste un objectif primordial car il constitue un outil indispensable pour prouver le rôle que joue la PKC aux différents stades de la vie cellulaire.

D) SEQUENCE

Les techniques de séquençage de peptides et de synthèse d'oligonucléotides ont permis récemment d'isoler d'une banque d'ADN complémentaire des clones codant pour la protéine kinase C. Ces études, réalisées selon les équipes sur la PKC humaine, bovine, de rat ou de lapin, ont révélé l'existence de différentes séquences d'ADN complémentaire codant pour des protéines de structure très proche (COUSSENS 1986, KNOFF 1986, ONO 1986, PARKER 1986, KIKKAWA 1987a, OHNO 1987). Ces sous-types de protéines peuvent être regroupés en trois catégories dont la dénomination varie selon les espèces étudiées. Les analogies entre espèces permettent d'établir une nomenclature commune, nous utiliserons celle proposée par CARPENTER (1987) et NISHIZUKA (1987), résumée dans le tableau 3: PKC α , PKC β et PKC γ .

Séquence consensus	α	$\beta 1$	$\beta 2$	γ
Homme	α	$\beta 1$	$\beta 2$	γ
Rat	-	III	II	I
Lapin	γ	β	α	-
Boeuf	α	-	β	γ
Fraction enzymatique	Type III	Type II		Type I

Tableau 3 Nomenclature des différentes sous-espèces de PKC animales

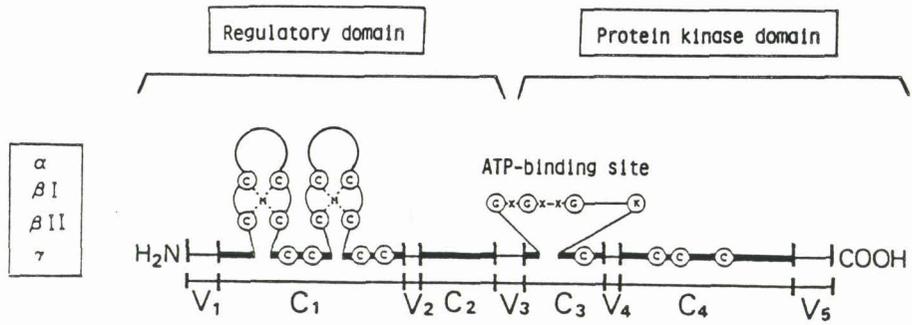


FIGURE 4 Structure commune des quatre sous-espèces de protéine kinase C (KIKKAWA 1987). C, G, K, X et M représentent respectivement: cystéine, glycine, lysine, amino-acide quelconque et métal.

L'alignement des séquences de PKC α , β et γ , montre deux régions de forte homologie, séparées par une large région variable V3 (COUSSENS 1986). La région N-terminale doit constituer la partie régulatrice qui interagit avec le calcium et les phospholipides alors que la partie C-terminale correspond au domaine catalytique (Figures 4 et 5). Les sous-types β 1 et β 2 ne diffèrent que par certains résidus C-terminaux, ils sont codés par deux ARN messagers qui seraient issus d'un seul gène par épissage alternatif (KUBO 1987, ONO 1987a). La PKC γ présente la plus forte divergence de séquence, avec cinq régions variables nommées V1 à V5 (COUSSENS 1986).

- La région V1 est constituée de 19 acides aminés chez les sous-espèces α et β , et de 18 acides aminés chez la sous-espèce γ .

- La région C1 comprise entre V1 et V2 est hautement conservée avec 81 % d'homologie entre les sous-types. Elle contient deux séquences de six cystéines de type C-X2-C-X13-C-X7-C-X7-C dont l'espacement est conservé pour chaque sous-classe de PKC. Ce type de structure a déjà été observé pour de nombreuses métallo-protéines ou des protéines se liant à l'ADN. Dans le cas de la PKC, son rôle fonctionnel est actuellement inconnu.

- La région V2 est constituée de 14 acides aminés totalement originaux pour PKC γ alors qu'il subsiste des homologies entre PKC α et β .

- La région C2 présente une homologie de 67 % entre sous-types et plus de 65 % des différences constituent des "changements conservatifs". Elle contient à son extrémité C-terminale une structure appropriée pour la coordination du calcium et pourrait correspondre à son site de liaison. Il existe aussi dans la région

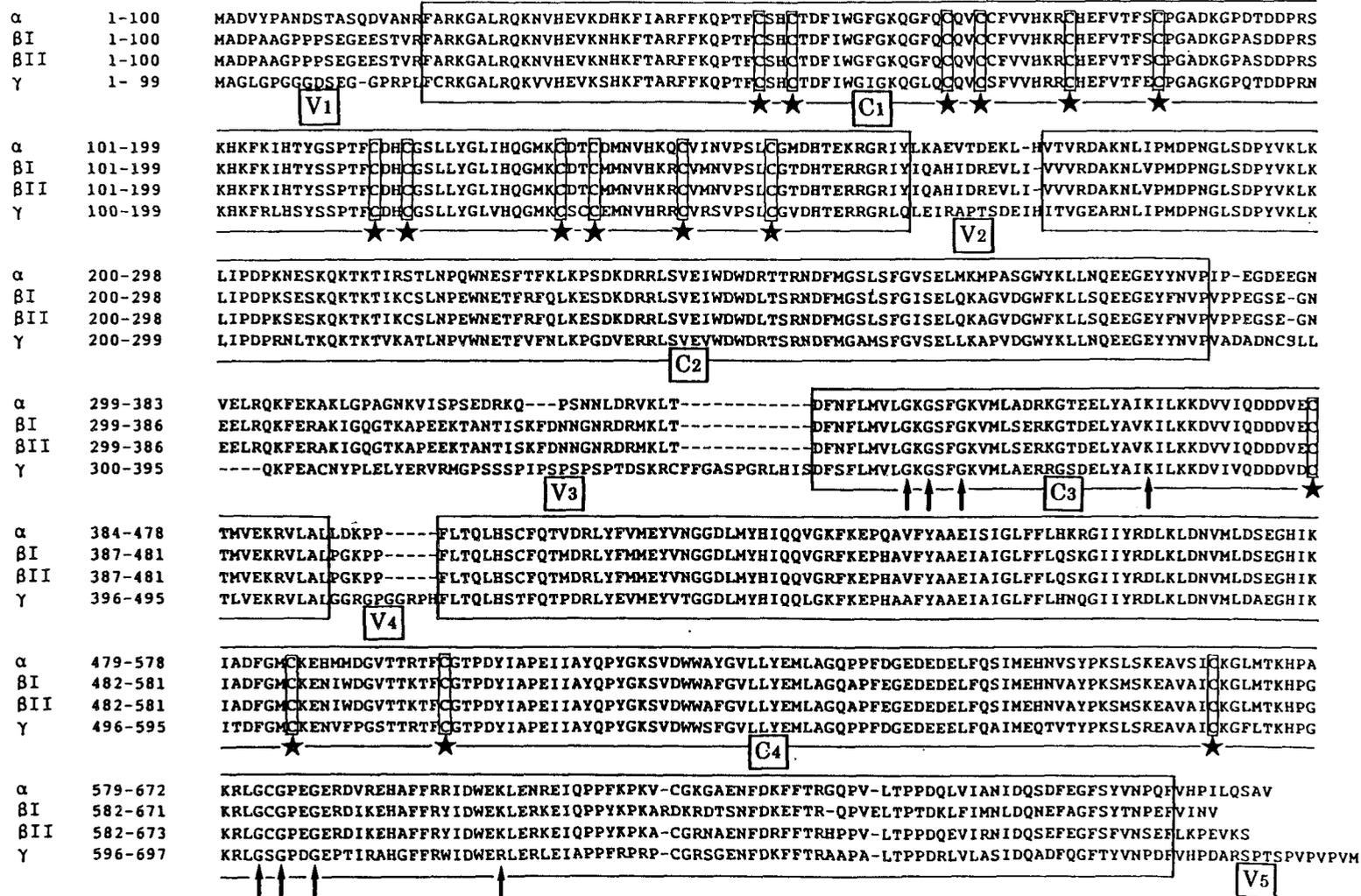


FIGURE 5 Séquences en amino-acides des sous-espèces α , β 1, β 2 et γ , déduites des clones de cDNA extraits de cerveau de rat (KIKKAWA 1987).

V3 de la PKC α une séquence présentant une forte homologie structurale avec la calmoduline, qui serait bon candidat pour la fixation du calcium, mais cette région n'est pas conservée dans les deux autres sous-types.

- La région V3 est la plus longue des séquences divergentes, avec dans le cas de la PKC de rat 48 résidus pour α , 51 pour β et 60 pour γ . Cette zone toujours hydrophile, représente un domaine exposé en surface qui correspondrait au site de clivage par la calpaïne et formerait la liaison entre le domaine catalytique et le domaine régulateur.

- La région située en position C terminale par rapport à V3 constitue le domaine catalytique et présente une homologie de 40 % avec le domaine catalytique des protéines kinases dépendantes de l'AMPC ou de la GMPC. Cette région contient deux sites potentiels de fixation de l'ATP (le plus probable en C3 et un deuxième en C4) avec la structure caractéristique: Gly- X -Gly- X - X -Gly.....Lys (X = acide aminé quelconque), dans cette zone l'homologie entre les sous-types est de 72 %.

- Une divergence apparaît à l'extrémité C terminale (V5) dont la longueur varie selon le sous-type considéré, respectivement 9, 4, 7 et 17 amino-acides pour α , β 1, β 2 et γ .

La conservation de la séquence en acides aminés est très importante entre les espèces animales, pour un même sous-type de PKC. Ainsi l'homologie entre les PKC humaines et bovines est supérieure à 98 % pour les trois sous-types. Bien que certaines séquences n'aient pas encore été détectées chez toutes les espèces, leur existence paraît très probable si l'on se base sur la forte homologie qui existe entre tous les types de PKC animale.

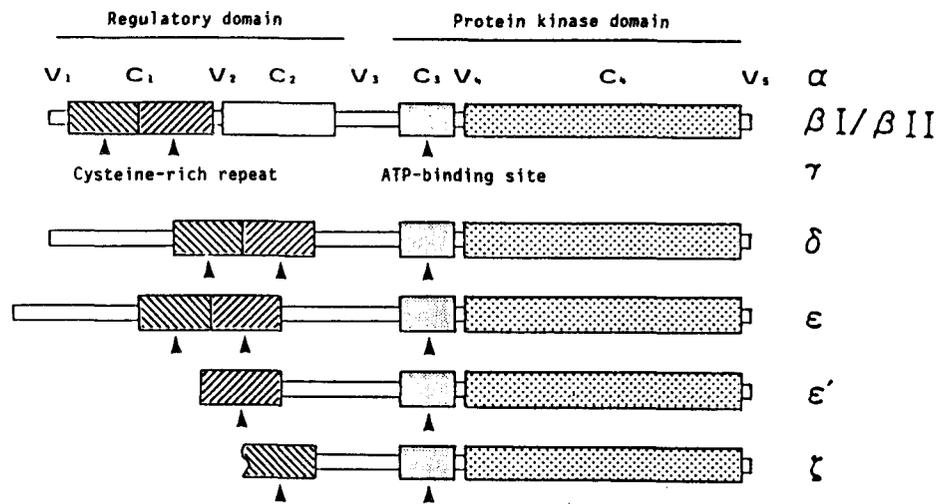


FIGURE 6 Représentation schématique comparée de la structure des sous-espèces de protéine kinase C (ONO 1988). Les triangles noirs indiquent les zones riches en cystéine et le site de fixation de l'ATP.

Récemment quatre autres types d'ADN complémentaire ont été mis en évidence dans le cerveau de rat: δ , ε , ε' et ζ . Les séquences d'acides aminés déduites de l'ADN révèlent des caractéristiques communes avec les précédents sous-types (Figure 6) (ONO 1987b, 1988):

- dans chaque cas on retrouve la séquence typique avec six cystéines, mais qui n'apparaît sous forme de tandem que pour δ et ε .
- on retrouve le site de fixation de l'ATP et une forte homologie avec les régions conservées C3 et C4 décrites pour α , β et γ . Par contre la région C2 est absente.

L'existence de ces différentes classes d'enzymes suggère qu'elles ont un rôle distinct ou coopératif dans la cellule, des disparités dans leurs substrats et leurs activateurs, et que les régions variables jouent un rôle important dans cette spécificité fonctionnelle. Ces protéines sont réparties différemment selon les tissus. Par exemple, dans le cytosol du cerveau de rat les activités relatives des quatre premiers sous-types sont: α : 16 %, β_1 : 8 %, β_2 : 55 %, γ : 21 %. Les formes γ et ε ne sont détectables que dans le cerveau (KIKKAWA 1987b, ONO 1988).

Les différents sous-types présentent une sensibilité différente aux activateurs. Ainsi la forme γ est moins sensible au diacylglycérol, mais sensible à des faibles concentrations d'acide arachidonique libre. La forme β présente une activité notable pour de faibles concentrations en calcium et dans une moindre mesure en acide arachidonique alors que la forme α répond de façon identique à l'acide arachidonique et au diacylglycérol. Les nouvelles formes sont peu sensibles au diacylglycérol, et la phosphatidylsérine multiplie leur activité par deux. Cette faible dépendance vis à

vis des phospholipides n'a pas pu pour l'instant être corrélée avec la structure différente de leur domaine régulateur.

L'étude approfondie des sous-types nécessite deux étapes importantes, d'une part la mise en évidence de ces sous-types dans les différents tissus, et d'autre part leur purification à partir des tissus les plus riches afin de faciliter l'étude de leurs propriétés in vitro.

Dans ce but nous avons tenté de développer une méthode immunologique basée sur l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement chaque sous-type. Les sous-espèces δ , ϵ , ϵ' et ζ , n'ayant pas encore été décrites au début de nos travaux, nous avons limité notre étude aux sous-espèces α , β et γ . Dans chaque cas, une séquence d'acides aminés ne présentant aucune homologie avec les autres sous-types a été sélectionnée et utilisée comme antigène chez des animaux de laboratoire pour fournir des anticorps utilisables pour la caractérisation de la PKC.

PREPARATION DES PEPTIDES

A) SYNTHESE

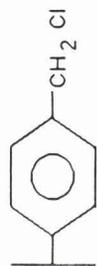
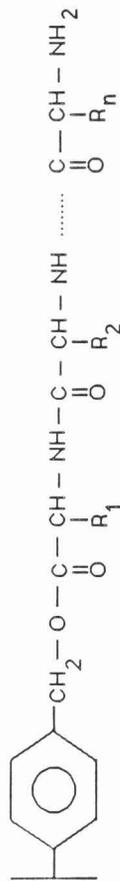
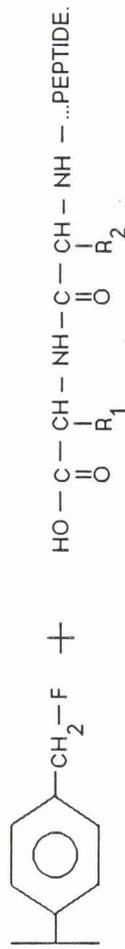
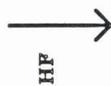
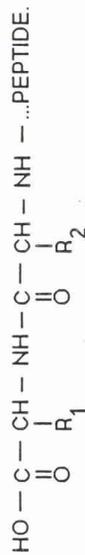
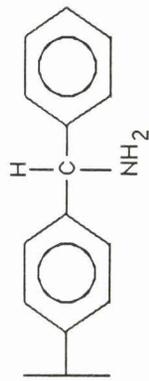
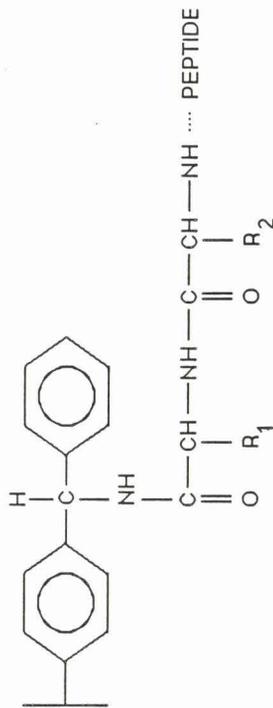
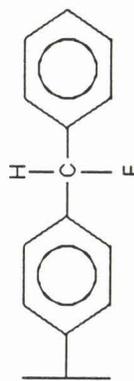
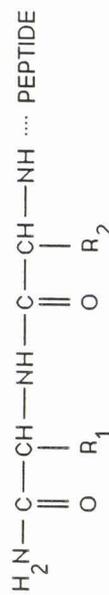
1) PRINCIPE

La synthèse des peptides est réalisée en phase solide selon la méthode de Merrifield (1963). Le premier amino-acide de la chaîne est ancré par sa fonction carboxylique sur une résine insoluble, la fonction alpha aminée étant protégée par un groupement semi-permanent. L'élimination de ce groupement protecteur régénère l'amine qui va pouvoir réagir avec le deuxième amino-acide de la séquence biologique. L'élongation du peptide se fait ensuite par répétition de ces différentes étapes de déprotection et de couplage; l'addition des amino-acides est effectuée dans l'ordre inverse de la séquence: de la partie C-terminale vers la partie N-terminale. Pendant toute la durée de la synthèse les fonctions réactives des chaînes sont protégées par des groupements permanents, qui généralement seront éliminés lors du clivage peptide-résine.

2) LE SUPPORT

Le support utilisé est une résine obtenue par copolymérisation de styrène et de 1% de divinylbenzène, qui réunit les trois propriétés requises:

- bonne résistance à l'abrasion
- insolubilité et gonflement satisfaisant dans les solvants de synthèse (chlorure de méthylène et diméthylformamide)
- porosité suffisante pour permettre le contact entre les réactifs et le peptide en élongation.

A**RESINE CHLOROMETHYLEE****PEPTIDYL-RESINE****RESINE RESIDUELLE****PEPTIDE C-CARBOXYLIQUE****B****RESINE BENZHYDRYLAMINE****PEPTIDYL-RESINE****RESINE RESIDUELLE****PEPTIDE C-CARBOXAMIDE****FIGURE 7 Résines fonctionnalisées: Résine chlorométhylée (A) et Résine benzhydramine (B).**

Les noyaux benzéniques de la résine sont fonctionnalisés afin d'ancrer par liaison covalente le premier amino-acide de la chaîne. Nous avons principalement utilisé pendant notre étude une résine type chlorométhylée qui fournit après clivage, des peptides à fonction C-terminale carboxylique (Figure 7A); une résine de type benzhydrylamine a été utilisée de façon ponctuelle lorsque nous souhaitions obtenir des peptides à fonction C-terminale amide (Figure 7B).

La capacité de fixation de la résine est exprimée en mEq/g. Elle est quantifiée par la méthode de Chapentier-Volhard (dosage des chlorures) dans le cas des résines chlorométhylées, et par un test de Kaiser quantitatif (dosage des fonctions amines primaires) dans le cas des benzhydrylamine résines. Sa connaissance permet d'évaluer la quantité de réactifs à utiliser et le poids de peptide attendu.

3) PROTECTION DES AMINO-ACIDES

3.1- Fonction alpha-aminée

Afin d'éviter les réactions secondaires lors du couplage, la fonction alpha-aminée des amino-acides est protégée par un groupement semi-permanent le tertiobutyloxycarbonyle ou tBoc, qui fournit une fonction uréthane sensible aux acides forts.

Les amino-acides naturels et leurs isomères optiques sont commercialisés sous forme libre ou protégée. Les amino-acides exotiques utilisés, tels que la β -alanine, ont été protégés par action du pyrocarbonate de diterbutyle (cf partie expérimentale).

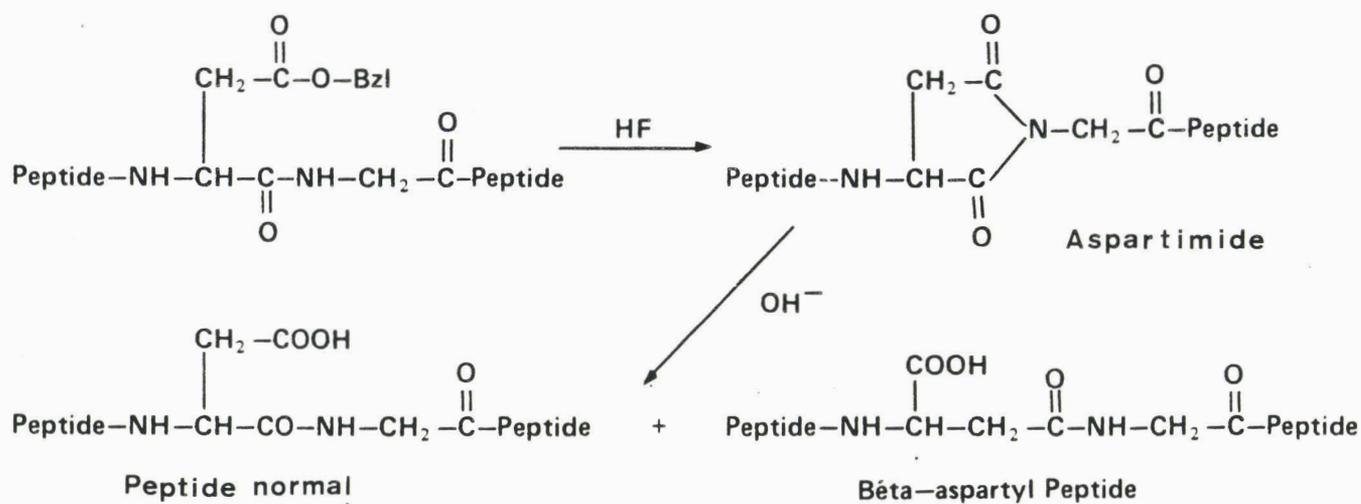


FIGURE 8 Formation de β -aspartyl peptide.

3.2- Chaînes latérales

Les fonctions réactives des chaînes latérales sont protégées par des groupements permanents, qui ne seront éliminés qu'en fin de synthèse. Les différents groupements protecteurs utilisés lors de nos synthèses sont regroupés dans le tableau 4. Le choix de certains groupements a été orienté en fonction de la séquence synthétisée.

Amino-acide	Groupe ment protecteur
Acide aspartique	Ester benzylique Ester de cyclohexyle
Acide glutamique	Ester benzylique
Cystéine	Thioéther para-méthoxybenzylique
Lysine	Chloro-2-benzyloxycarbonyle
Arginine	Paratoluène sulfonyle (tosyle)
Sérine	Ether benzylique
Thréonine	Ether benzylique

TABLEAU 4: Groupements protecteurs des chaînes latérales

L'acide aspartique est classiquement protégé sous forme d'ester benzylique. Si dans une synthèse il précède une glycine ou une sérine, il y a risque de formation d'un aspartimide qui peut redonner soit le peptide initial soit l'analogue β -migré (Figure 8).

La cyclisation en aspartimide est favorisée en milieu acide, l'ouverture du cycle se fait dans l'eau ou en milieu basique dilué. Cette réaction secondaire peut donc se produire lors des déprotections du peptide ou lors du clivage peptide-résine. La β -migration est plus fréquente sur la forme ester de l'acide

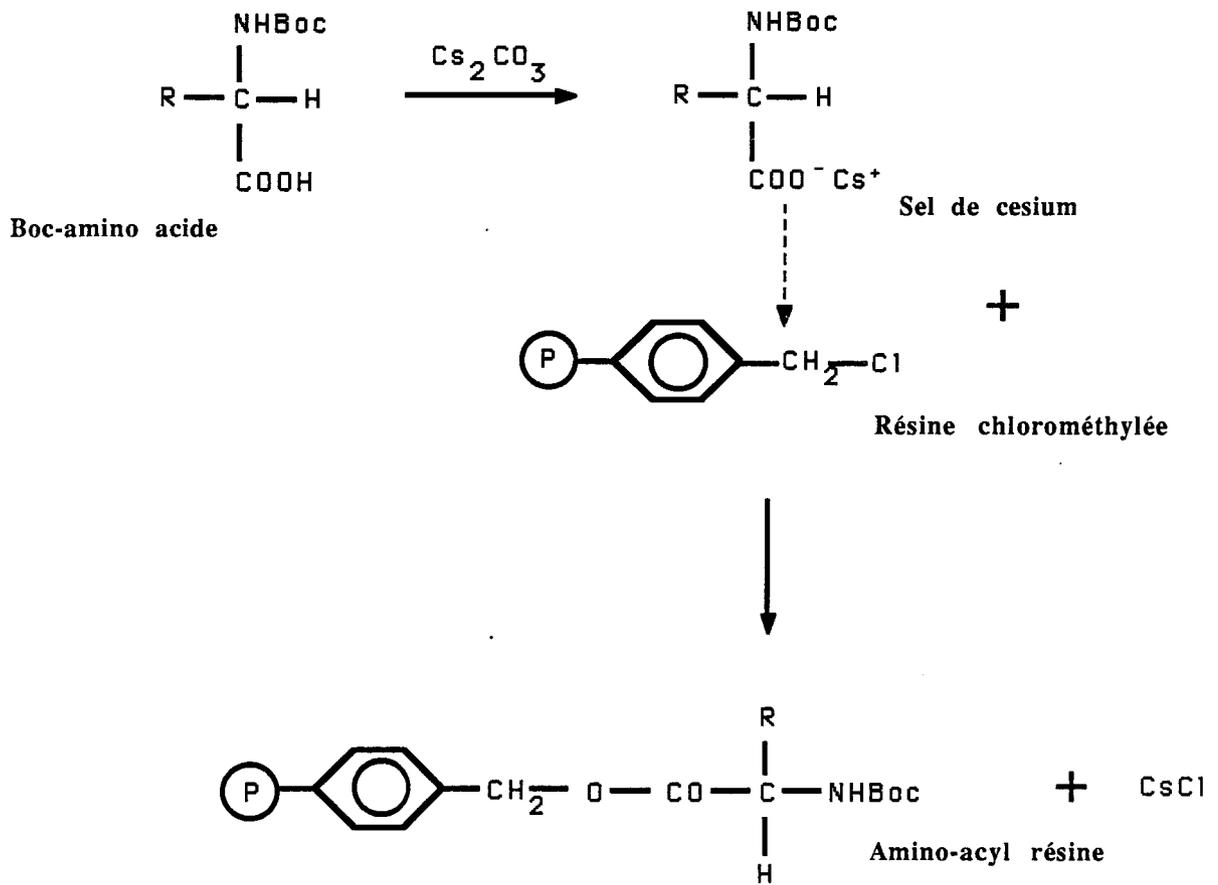


FIGURE 9 Fixation du premier acide aminé sur une résine chlorométhylée.

aspartique; elle est limitée par l'emploi du groupement protecteur très encombré, le cyclohexyle.

La fonction thiol de la cystéine peut être protégée par deux types de groupements:

- le groupement acétamidométhyle qui n'est pas éliminé lors du clivage peptide/résine (coupure à l'HF) et permet de conserver le peptide sous-forme de monomère. La déprotection du thiol est effectuée à un stade ultérieur, par oxydation à l'iode ou à l'acétate mercurique.

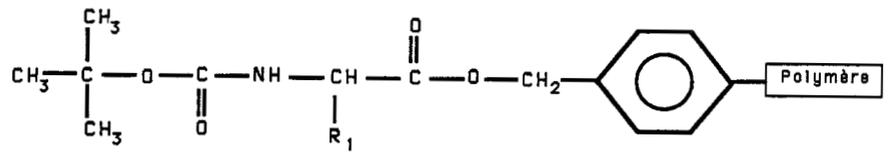
- les groupements méthoxybenzyle et méthylbenzyle éliminés lors de la coupure à l'HF. Le méthylbenzyle est beaucoup plus résistant à l'action du TFA (utilisé lors de la déprotection des fonctions alpha aminées), et sera préféré lorsque la cystéine est incorporée en début de synthèse.

La lysine utilisée est protégée par un groupement chloro-2-benzyloxycarbonyle beaucoup plus résistant au TFA que l'analogue non chloré. Ce dernier est utilisé lorsque la lysine intervient en fin de synthèse.

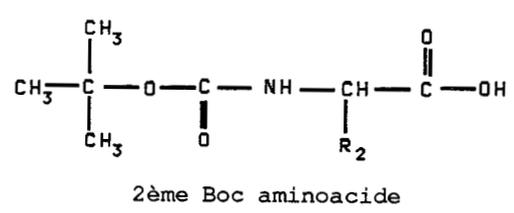
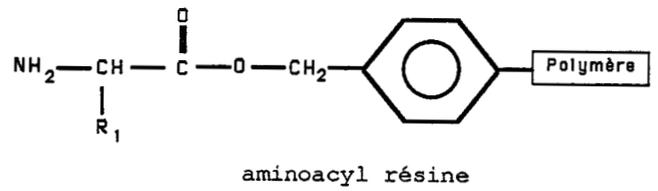
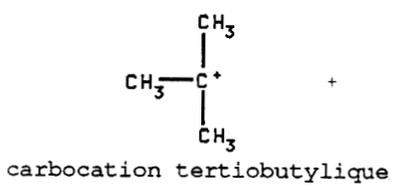
4) FIXATION DU PREMIER AMINO-ACIDE

4.1- Résine chlorométhylée (Figure 9)

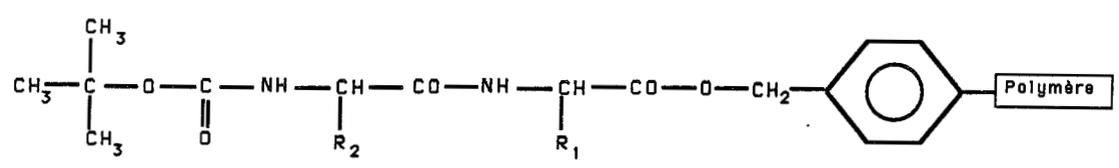
L'ancrage du tBoc amino-acide est assuré par une liaison ester. Le tBoc amino-acide est d'abord salifié par action du carbonate de césium. L'encombrement de l'ion césium favorise la dissociation du sel, augmentant ainsi la réactivité du carboxylate qui attaque le groupement $-CH_2Cl$ par une réaction de type SN_2 .



TFA
DIEA



DCC/HOBt



HF

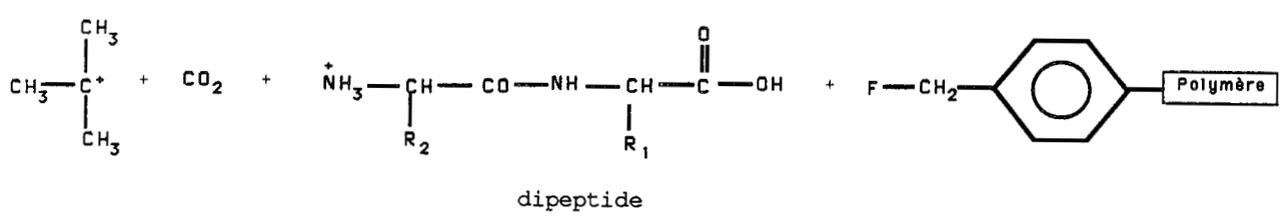


Figure 10 Synthèse peptidique en phase solide

Après réaction, la quantité d'acide aminé fixé sur la résine peut être évaluée selon deux méthodes:

- Dosage des chlorures libérés selon la méthode de Charpentier Volhard.

- Dosage, après déprotection, des fonctions alpha aminées des acides aminés fixés, selon la méthode de GISIN (1972).

La fixation du premier acide aminé sur la résine est une étape assez longue, c'est pourquoi les résines sont préparées en quantité importante et stockées afin de réaliser plusieurs synthèses différentes à partir d'un même lot.

4.2- Résine benzhydrylamine

L'ancrage est assuré ici par une liaison amide. La fixation du premier acide aminé est donc identique à celle d'un couplage classique entre deux acides aminés. Avant la réaction, on s'assure par un traitement à la DIEA que les fonctions amines primaires ne sont pas ionisées.

5) *ELONGATION DE LA CHAÎNE*

L'élongation de la chaîne s'effectue en deux étapes qui seront répétées autant de fois qu'il y a d'acides aminés à greffer (Figure 10).

5.1- Déprotection

La première étape consiste à éliminer le groupement tBoc de l'acide aminé présent sur la résine. Le réactif utilisé est l'acide trifluoroacétique (TFA) à 50 % dans le chlorure de

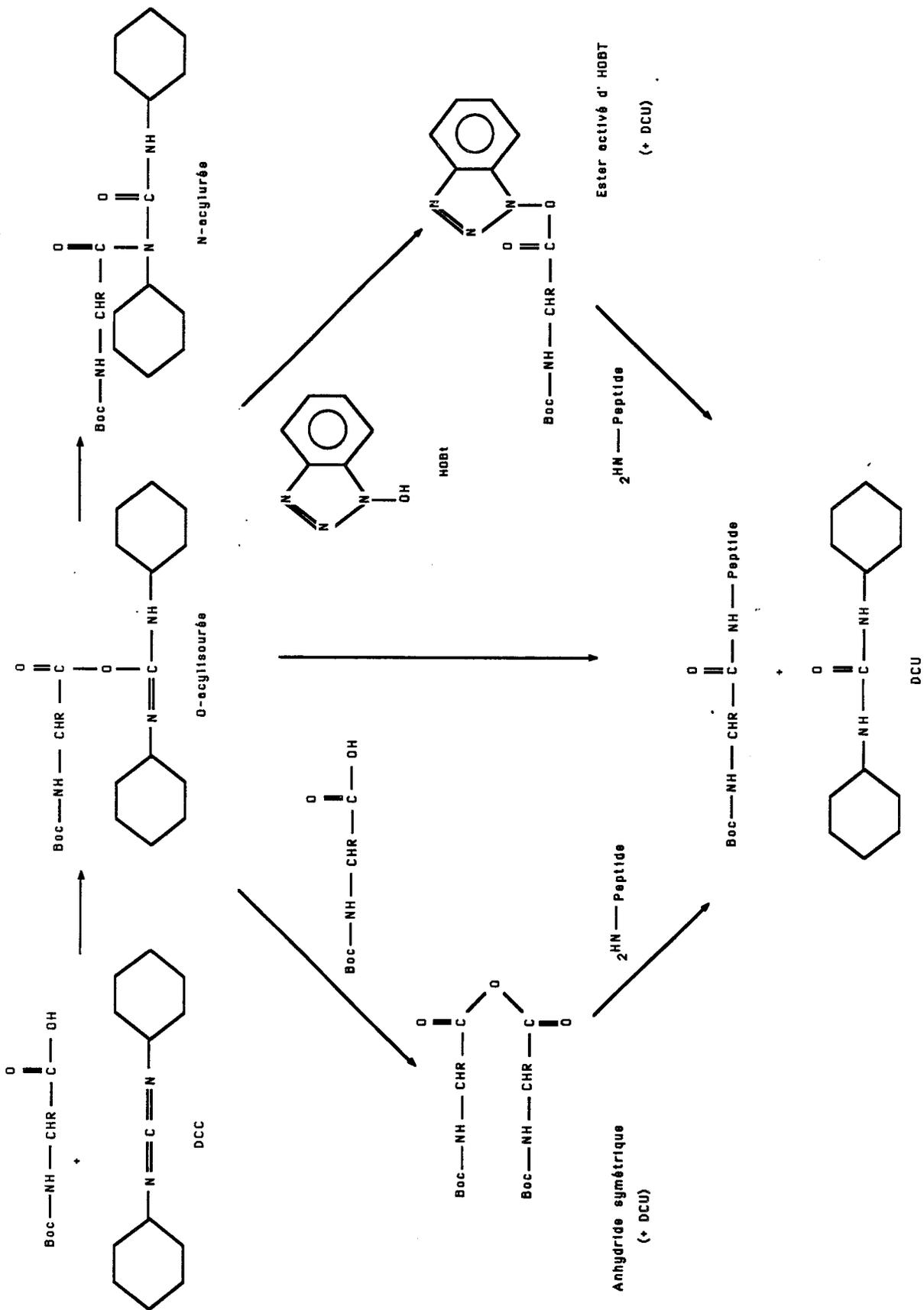


FIGURE 11 Modes de couplage des acides aminés.

méthylène. Après l'incorporation d'une cystéine ou d'une méthionine, la solution de TFA est additionnée de 2 % d'éthane dithiol pour toutes les déprotections ultérieures. Ce réducteur évite l'oxydation de l'atome de soufre ou l'alkylation par les carbocations tertiobutyliques libérés.

Après élimination du TFA les fonctions amines sont déprotonées par action de la diisopropyléthylamine (DIEA) à 5 %, cette base fortement encombrée ne provoque pas les réactions secondaires observées avec la triéthylamine, telles que la formation de carbènes à partir de solvants halogénés, ou la formation d'ammoniums quaternaires au niveau de la résine, qui en jouant le rôle d'échangeurs d'ions peuvent par la suite provoquer l'alkylation des peptides en élongation.

5.2- Couplage (Figure 11)

Les acides aminés sont activés par couplage à la dicyclohexylcarbodiimide (DCC) sous forme de O-acylisourée. Cependant ce composé intermédiaire réactif peut évoluer en un composé inactif la N-acylurée. La formation de ce composé qui entre en compétition avec la réaction de couplage, est d'autant plus importante que la vitesse du couplage est lente, en particulier lorsqu'un des amino-acides impliqués dans la réaction est fortement encombré. La transformation rapide de l'O-acylisourée en un deuxième composé réactif limite l'intervention de cette réaction parasite. Pour cela deux méthodes sont utilisées:

- formation d'un ester d'hydroxybenzotriazole (HOBT)
 - formation d'un anhydride symétrique; cette deuxième méthode nécessite une quantité double d'amino-acide par rapport à la DCC.
- Le temps de couplage est de deux heures pour l'ester d'HOBT et de

trente minutes pour l'anhydride symétrique. L'excès en réactifs est de 2,5 par rapport à la charge de la résine.

L'activation étant plus lente dans les solvants polaires tels que le diméthylformamide (DMF), elle est réalisée dans le chlorure de méthylène. Pour la majorité des amino-acides, activation et couplage sont obtenus in situ dans la suspension de résine. Cependant, ce solvant précipite en partie la dicyclohexylurée (DCU), sous-produit de réaction; lorsque l'acide nécessite une préactivation dans le chlorure de méthylène, la solution est de ce fait filtrée, évaporée et le résidu est repris par le DMF pour le couplage proprement dit.

Amino-acides particuliers

- Les couplages impliquant une glycine sont limités à trente minutes afin d'éviter la formation de peptides branchés, favorisée par le faible encombrement stérique de cet amino-acide (BODANSKY 1985).

- Pour éviter la déshydratation en nitrile de la fonction amide de l'asparagine favorisée par la DCC lors du couplage ou de la préparation d'anhydride symétrique (Figure 12), il est préférable d'introduire cet amino-acide préalablement activé sous forme d'ester d'HOBt (MOSJOV 1980).

- Il en est de même pour la glutamine qui peut subir une déshydratation irréversible en nitrile, ou en acide pyroglutamique qui bloque la croissance du peptide (Figure 13). Cette dernière réaction est favorisée en milieu acide et peut se produire lors de la déprotection de la glutamine et du couplage de l'acide suivant. L'acide suivant doit être amené sous forme d'anhydride symétrique afin d'éviter la présence d'HOBt qui présente des propriétés acides faibles.

5.3- Contrôle de la synthèse

L'évolution de la synthèse est suivie par le test de KAISER (1970) à la ninhydrine qui par chauffage développe une coloration bleue en présence de fonctions amines primaires. Ce test doit être positif après déprotection, et négatif après couplage. Si le premier couplage n'est pas complet, on procède à un deuxième couplage et si nécessaire à l'acétylation des chaînes n'ayant pas réagi, afin d'éviter la formation de peptides à délétion. Après la déprotection de l'acide aspartique et de l'asparagine, le chauffage nécessaire pour le test favorise la cyclisation en aspartimide et se traduit par une coloration rouge-orangé. Dans ce cas la sensibilité du test est beaucoup plus faible et il est préférable de procéder à un recouplage systématique.

Lors d'un couplage sur une proline, on utilise le réactif de CHRISTENSEN (1979) spécifique des fonctions amines secondaires. Ce test est moins sensible que le test de KAISER et il est toujours préférable de faire un second couplage, même si le test est négatif dès le premier couplage.

6) COUPURE DE LA LIAISON PEPTIDE-RESINE

Le peptide est séparé de la résine par action du fluorure d'hydrogène anhydre (HF), qui réalise simultanément la déprotection des chaînes latérales et de la fonction N terminale (tBoc). Cette réaction est effectuée en présence de para-crésol ou d'anisole qui piègent les carbocations provenant de l'acidolyse des groupements protecteurs. Pour les peptides contenant une méthionine ou une cystéine, très sensibles à l'alkylation et à

l'oxydation, le groupement tBoc de la fonction N-terminale est éliminé préalablement et le milieu réactionnel de coupure à l'HF est additionné de diméthylsulfure.

Après coupure, les peptides précipités à l'éther sont extraits de la résine par des solutions d'acide acétique de concentration adaptée à la solubilité du peptide.

7) STRATEGIE DE SYNTHÈSE

Les peptides présentant une séquence C-terminale homologue sont issus d'une même synthèse. La résine n'est répartie en différents lots qu'au stade où les séquences divergent. Cette méthode offre un gain de temps appréciable pour l'étude de relations structure-activité de la séquence N-terminale.

B) PURIFICATIONS ET CONTROLES

La synthèse peptidique en phase solide s'effectue sans purification intermédiaire. Bien que les tests effectués après couplage et déprotection soient assez sensibles, on ne peut s'assurer que chaque réaction soit totale. Les sous-produits de synthèse sont principalement:

- des peptides tronqués dont l'élongation a été, volontairement (acétylation) ou non, stoppée.
- des peptides à délétion correspondant à une déprotection ou un couplage incomplets, et dont la séquence est privée d'un ou plusieurs amino-acides.
- des peptides branchés issus d'une mauvaise protection des chaînes latérales.
- des peptides provenant de réactions secondaires induites par les réactifs lors des déprotections ou de la coupure finale au fluorure d'hydrogène.

Généralement ces peptides non désirés ne sont pas en très grande quantité, mais ils doivent être séparés du peptide principal pour obtenir un degré de pureté important. De plus des traces de p-crésol ou de diméthylsulfure peuvent subsister.

Les peptides subissent différentes étapes de contrôle et de purification qui s'échelonnent selon l'ordre suivant:

- Analyse d'acides aminés qui met en évidence une éventuelle aberration dans la composition du peptide: excès ou absence d'un amino-acide.
- Analyse du peptide brut par chromatographie sur couche mince (CCM) ou chromatographie liquide haute pression (HPLC), qui nous

indique la proportion de peptide désiré dans le mélange peptidique.

- Purification par filtration sur gel.
- Contrôle par HPLC analytique du degré de pureté du peptide.
- Purification par HPLC préparative si la pureté n'est pas satisfaisante (suivie d'un nouveau contrôle par HPLC analytique).
- Confirmation de l'identité du peptide par analyse d'acides aminés, microséquence ou spectrométrie de masse.

1) TECHNIQUES DE PURIFICATION

1.1- Filtration sur gel

Dans la chromatographie sur gel perméable, la phase solide est constituée d'un gel de dextran présentant des pores de dimension connue. La vitesse de progression des molécules dans la colonne est proportionnelle à leur taille, les grosses molécules sont éluées rapidement alors que les petites molécules pénètrent dans les pores du gel et sont retenues plus longtemps. L'éluat après passage dans un spectrophotomètre ultraviolet (longueur d'onde 215 nm ou 254 nm) est fractionné automatiquement et soumis aux contrôles d'identité et de pureté. Cette méthode permet une purification du peptide par élimination des contaminants peptidiques de masse moléculaire inférieure ainsi que le crésol et le diméthylsulfure.

Le solvant le plus utilisé est l'acide acétique dont la concentration est fonction du caractère hydrophobe du peptide à purifier.

1.2- Chromatographie liquide haute pression (HPLC) en phase inversée

Dans l'HPLC en phase inversée, la phase stationnaire est moins polaire que la phase mobile. Les supports utilisés sont des billes de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes hydrocarbonées en C 18. L'éluant est constitué d'un gradient de solvants aqueux et organiques. Les solvants d'éluion sont choisis en fonction de leur viscosité, leur hydrophilie, et leur capacité à solubiliser les échantillons. Les molécules sont séparées en fonction de leur affinité vis à vis des phases stationnaire et mobile, leur temps de rétention augmente avec leur caractère hydrophobe.

Les peptides sont élués par un gradient de concentration croissante en acétonitrile maintenu à pH acide par l'acide trifluoroacétique. Cet acide volatil sera facilement éliminé par lyophilisation. L'éluat est détecté par spectrophotométrie ultraviolette; le coefficient d'extinction molaire de la liaison peptidique est maximum au voisinage de 215 nm, celui des dérivés aromatiques à 254 nm pour la phénylalanine et 280 nm pour la tyrosine et le tryptophane.

2) CONTROLES

2.1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies sont effectuées sur gel de silice. Le peptide déposé en spot au bas d'une plaque est séparé selon son coefficient de partage entre la phase stationnaire très polaire la

silice, et la phase mobile constituée d'un mélange solvant adapté à chaque type de peptide. Après migration, les plaques sont séchées et révélées. Chaque peptide est caractérisé dans un solvant donné par son Rf (le Rf. correspond au rapport : distance de migration du peptide sur celle du solvant, il est au maximum égal à 1). La plupart de nos peptides présentaient une forte proportion en résidus arginines, et leur caractère hydrophile a entravé la séparation entre la silice et les phases mobiles testées, se traduisant par une tâche très étalée non interprétable.

2.2- Chromatographie liquide haute pression analytique

Le principe est identique à celui de l'HPLC préparative, la différence provient des quantités d'échantillon injectées, d'où l'utilisation de colonnes de taille inférieure. Le mélange solvant est acidifié soit par un tampon phosphate, soit par l'acide trifluoroacétique (TFA) lorsque les peptides sont très basiques. En effet les contre-ions TFA qui se positionnent au niveau des charges positives de la molécule augmentent l'interaction avec les chaînons hydrophobes de la phase stationnaire, et donc le temps de rétention de ces peptides hydrophiles. Le degré de pureté d'un peptide est évalué en intégrant la surface du pic correspondant, à la longueur d'onde la plus sensible, 215 nm.

2.3- Analyse d'acides aminés

L'analyse d'acides aminés est réalisée après hydrolyse totale des peptides traités par l'HCl 6N, à 110°C sous vide pendant 24 heures. Le mélange d'acides aminés obtenu est résolu

par passage sur une colonne échangeuse d'ions et détecté après couplage à la ninhydrine.

Les conditions d'hydrolyse transforment l'asparagine et la glutamine en acides correspondants; certains amino-acides sont altérés, la sérine et la thréonine ne sont retrouvées que dans une proportion de 80 %, le tryptophane n'est pas détectable. La cystéine doit être oxydée en cystine avant l'analyse et ne peut être quantifiée.

Lorsque l'analyse d'acides aminés n'est pas adaptée pour contrôler l'identité d'un peptide, par exemple lorsqu'un amino-acide représente une forte proportion, sa quantification par rapport aux autres amino-acides de la séquence est erronée. Dans ce cas nous avons eu recours à des méthodes moins fréquentes en synthèse peptidique de routine, le microséquençage et la spectrométrie de masse.

2.4- Microséquençage

Il est effectué en phase gaz selon la dégradation récurrente d'Edman: le résidu N-terminal est couplé à un réactif, puis clivé de la chaîne et analysé par HPLC. Les acides aminés étant analysés un à un, il apparaissent donc tous dans la même gamme de concentration. Cependant après l'analyse d'un amino-acide, il en reste toujours une faible quantité dans l'analyse suivante (phénomène d'"overlap"); ceci peut causer des erreurs d'interprétation lors du séquençage de longues chaînes d'acides aminés identiques.

2.5- Spectrométrie de masse

Cette méthode a été utilisée pour des peptides présentant à la fois une proportion importante d'un amino-acide donné et une fonction N-terminale bloquée par une structure non peptidique. Nous avons retenu la méthode par FAB (fast atomic bombardment) qui fournit la masse de l'ion moléculaire.

**MISE AU POINT DE SUBSTRATS ET
D'INHIBITEURS PEPTIDIQUES DE LA PKC**

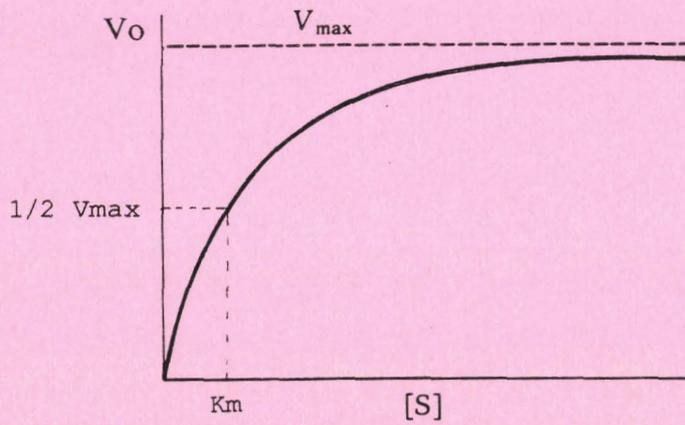


FIGURE 14 Variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.

A) METHODES GENERALES D'ETUDE ENZYMATIQUE

Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseur biologique, en diminuant l'énergie d'activation des réactions chimiques. Elles catalysent dans les conditions de vie cellulaire des réactions qui en leur absence nécessiteraient une température élevée, de fortes concentrations en réactifs, ou un pH extrême. Contrairement aux catalyseurs chimiques leur activité est limitée à une zone de température et de pH souvent étroite, et elles exigent la présence de cofacteurs ou d'activateurs spécifiques. Lorsque les conditions favorables sont réunies les vitesses de transformation sont beaucoup plus rapides que celles observées en chimie organique.

1) SUBSTRATS

Les enzymes expriment une sélectivité vis à vis de leurs substrats, cette sélectivité peut être limitée au stéréoisomère d'une seule molécule ou au contraire s'étendre à toute une famille chimique.

Pour une concentration donnée en enzyme, la vitesse de réaction tracée en fonction de la concentration en substrat fournit une hyperbole équilatère (Figure 14). Pour les fortes concentrations en substrat la vitesse tend vers une valeur maximale appelée V_{max} . Cette observation a conduit deux auteurs, Michaelis et Menten, à suggérer que la réaction enzymatique se déroulait en plusieurs étapes:

- combinaison rapide et réversible de l'enzyme (E) avec le substrat (S) pour fournir le complexe enzyme-substrat (E-S)



- transformation lente et réversible du complexe enzyme-substrat pour fournir l'enzyme et le produit de la réaction (P).



Puisque la deuxième étape est limitante, la vitesse de la réaction doit être proportionnelle à la concentration du complexe enzyme-substrat.

Ces auteurs ont établi une relation entre la concentration en substrat et la vitesse de réaction catalysée par l'enzyme:

$$V_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad \text{Relation 3}$$

V_i = vitesse initiale de réaction

$[S]$ = concentration en substrat

K_m (constante de Michaëlis et Menten) = $\frac{k_2 + k_{-1}}{k}$

D'après cette relation on en déduit que le K_m correspond à la concentration en substrat pour laquelle une enzyme donnée produit la moitié de sa vitesse maximale.

Chaque enzyme possède un K_m caractéristique pour un substrat donné, dans des conditions définies de température et de pH. La valeur de cette constante peut être obtenue d'après la courbe précédente, cependant la V_{max} ne peut être déterminée avec précision. Une mesure plus précise de K_m et de V_{max} peut être obtenue en effectuant une représentation des mêmes données sous

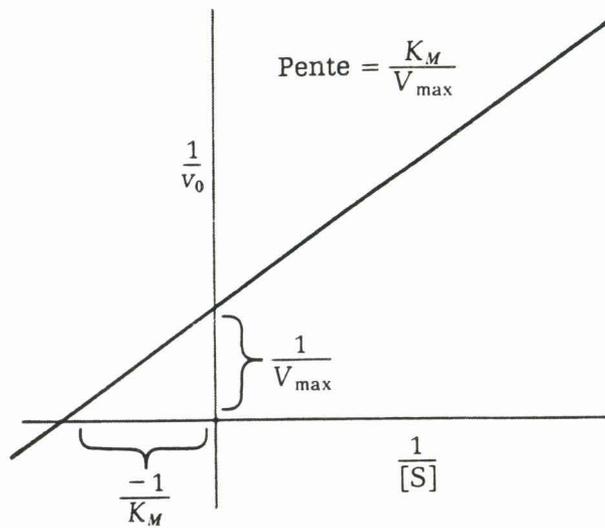


FIGURE 15 Variation de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat.
 Représentation en double inverse ou de Lineweaver et Burk.

une autre forme appelée "représentation en double inverse" ou de Lineweaver et Burk (Figure 15), qui utilise la transformation algébrique de l'équation de Michaelis et Menten:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Relation 4}$$

L'affinité de l'enzyme pour le substrat est exprimée par l'inverse de la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, K_D .

(cf Relation 1)

$$K_D = \frac{K_{-1}}{K_1}$$

On peut considérer que le K_m correspond à K_D , si la vitesse de dissociation du complexe Enzyme-Produit est faible par rapport à la vitesse de dissociation du complexe Enzyme-Substrat, car dans ces conditions $K_2 + K_{-1} \approx K_{-1}$. Le K_m est exprimé en unités de concentration (g/l ou molarité), il est d'autant plus faible que l'affinité pour l'enzyme est grande.

2) **INHIBITEURS**

Les enzymes peuvent être inhibées par de nombreuses molécules qui sont regroupées selon leur mode d'action: irréversible ou réversible.

2.1- Inhibiteurs irréversibles

Les inhibiteurs irréversibles détruisent ou se combinent à un groupement fonctionnel indispensable à l'activité enzymatique. Ce type d'inhibiteur fournit des informations sur la structure du site actif et le mécanisme d'action de l'enzyme.

2.2- Inhibiteurs réversibles

Les inhibiteurs réversibles sont répartis en deux catégories: compétitifs ou non compétitifs.

Les inhibiteurs compétitifs sont des molécules qui présentent une structure analogue à celle du substrat, mais qui ne peuvent être transformées par l'enzyme. Il y a compétition au niveau du site actif entre la fixation du substrat et celle de l'inhibiteur; cette inhibition est caractérisée par le fait qu'elle peut être levée par de fortes concentrations en substrat. Un inhibiteur compétitif ne modifie donc pas la V_{max} de l'enzyme, par contre elle augmente la valeur du K_m apparent.

Les inhibiteurs non compétitifs se fixent sur l'enzyme en un site différent de celui du substrat, de façon générale ils n'ont pas d'analogie structurale avec ce dernier. Un inhibiteur non

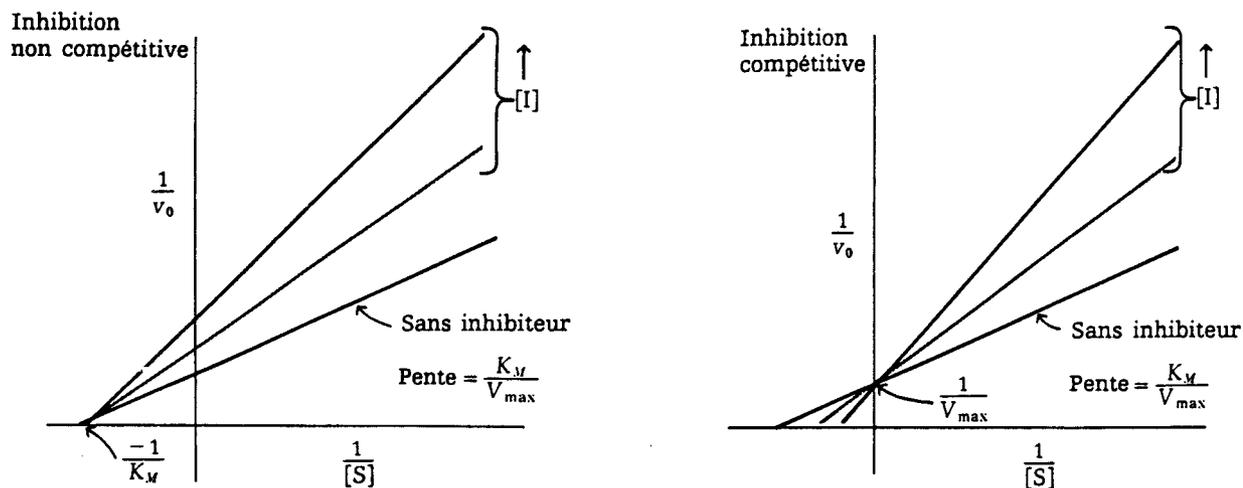


FIGURE 16 Détermination du mode d'inhibition par la représentation en double inverse.

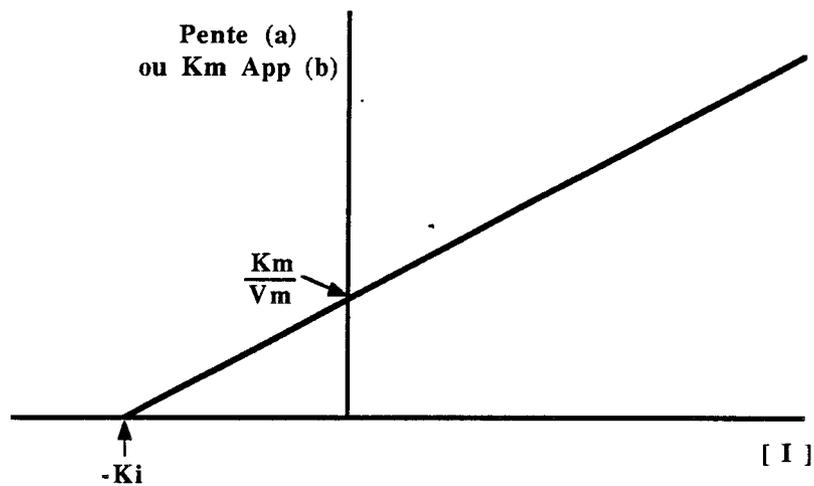


FIGURE 17 Détermination du K_i .

(a) Inhibition non compétitive: l'ordonnée correspond aux valeurs de pentes obtenues par la représentation en double inverse.

(b) Inhibition compétitive: l'ordonnée correspond aux valeurs de K_m apparent.

compétitif peut se fixer indifféremment sur l'enzyme ou sur le complexe enzyme-substrat.

Cette classe regroupe aussi les molécules qui présentent une analogie structurale avec les effecteurs de l'enzyme et entrent en compétition au niveau de leur site de fixation.

Un inhibiteur non compétitif diminue la valeur de V_{max} car quelle que soit la concentration en substrat il reste toujours une fraction de l'enzyme sous-forme inactive, par contre la capacité de fixation du substrat sur le site actif reste la même et la valeur du K_m n'est pas modifiée.

Détermination du mécanisme et de la constante d'inhibition

Le mécanisme d'inhibition peut être obtenu d'après la représentation des valeurs d'inhibition selon la méthode en double inverse: $1/V = f(1/[S])$. Pour cela il est nécessaire d'étudier la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat pour différentes concentrations en inhibiteur (Figure 16).

- Dans le cas d'une inhibition de type compétitif, les droites obtenues se coupent sur l'axe des ordonnées en un point correspondant à $1/V_{max}$. L'intersection de ces droites avec l'axe des abscisses fournit les valeurs de $-1/K_m$ apparent du substrat pour chaque concentration en inhibiteur.

- Dans le cas d'une inhibition de type non compétitif, les droites obtenues coupent l'axe des ordonnées en un point correspondant à $1/V'_{max}$, différent pour chaque concentration en inhibiteur. Ces droites se coupent sur l'axe des abscisses au point $-1/K_m$ du substrat.

De même qu'un substrat est caractérisé par son K_m , un inhibiteur est caractérisé par son K_i qui correspond à la

constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur:

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}$$

Cette valeur peut être obtenue à partir de la représentation précédente en double inverse: pour chaque concentration en inhibiteur, la pente de la droite correspond à $K_m/V_m (1 + [I]/K_i)$. Si l'on trace la variation de la pente en fonction de la concentration en inhibiteur, on obtient une droite qui coupe l'axe des abscisses au point $-K_i$ (Figure 17).

Dans le cas d'une inhibition de type compétitif, $K_{mApp} = K_m (1 + [I]/K_i)$ et V_{max} étant constant, la valeur de K_i peut aussi être obtenue plus simplement en représentant la variation du K_m apparent en fonction de la concentration en inhibiteur.

La concentration inhibitrice 50 ou IC_{50} , est une autre constante couramment utilisée pour exprimer le pouvoir inhibiteur quel que soit le type d'inhibition étudié. Elle correspond à la concentration en inhibiteur nécessaire pour réduire de 50 % l'activité enzymatique. Cette valeur est dépendante des conditions utilisées: concentration en enzyme, en substrat, en effecteur. Elle permet cependant de faire une comparaison rapide d'inhibiteurs dans un système donné.

B) DETERMINANTS SPECIFIQUES DE RECONNAISSANCE PAR LES ENZYMES

L'inhibition spécifique de la PKC peut être abordée selon plusieurs stratégies:

- inhibition vis à vis des effecteurs: calcium ou phospholipides.
- inhibition vis à vis des substrats: ATP ou protéine.

Le souci d'obtenir une inhibition directe sur le site actif de l'enzyme nous a orientés vers cette deuxième possibilité. D'autre part, le choix d'un inhibiteur compétitif de l'ATP ne nous paraissait pas satisfaisant car ce nucléotide est substrat de beaucoup d'autres kinases, d'où la difficulté de dégager une spécificité. La sélectivité que présentent les kinases vis à vis de leurs substrats protéiques est un atout qui pouvait être mis à profit dans la recherche d'inhibiteurs spécifiques.

Dans un premier temps nous avons tenté de cerner les règles qui régissent la reconnaissance des substrats par la PKC en nous référant d'une part à la littérature qui nous a fourni de nombreux exemples de substrats, et d'autre part à l'étude de peptides de synthèse. Dans un deuxième temps la structure du peptide présentant la meilleure affinité a été modifiée afin de perdre le caractère de substrat tout en maintenant la possibilité de fixation spécifique sur le site actif; l'objectif final étant de nous affranchir de la structure peptidique afin de diminuer la sensibilité de la molécule aux enzymes protéolytiques, et de favoriser sa pénétration dans les cellules.

1) GENERALITES

La spécificité de substrat de nombreuses protéines kinases est fortement liée à la séquence d'acides aminés qui entourent le résidu phosphorylable. Ainsi, de nombreuses Ser/Thr-Kinases exigent la présence de résidus arginines à proximité du résidu phosphorylable. C'est le cas de la phosphatase b kinase, la cAMP-dépendante protéine kinase, la cGMP dépendante protéine kinase, la myosine légère chaîne kinase (MLCK) du muscle lisse, l'histone H4 kinase et la calmoduline dépendante protéine kinase multifonctionnelle (KEMP 1983, PEARSON 1985). Ces arginines fourniraient des liaisons hydrogènes avec les groupements phosphates, et seraient impliquées soit dans la réaction de transfert de groupe phosphate de l'ATP vers la sérine, ou soit dans l'interaction entre l'enzyme et le résidu phosphorylé (KEMP 1977). Bien que le déterminant spécifique soit commun à toutes ces enzymes, sa position par rapport au résidu phosphorylable définit la reconnaissance par une kinase donnée. Pour certaines d'entre elles, une séquence spécifique minimale a été établie. Ainsi la calmoduline dépendante protéine kinase multifonctionnelle des muscles du squelette reconnaît la séquence Arg-X-Y-Ser (où X et Y sont des acides aminés quelconques), mais paradoxalement la présence d'une deuxième arginine au voisinage de l'arginine reconnue est très défavorable pour la reconnaissance (PEARSON 1985). Pour la PKA la séquence consensus correspond à Arg-Arg-X-Ser, où X est un résidu neutre (KEMP 1977).

Dans le cas de la PKC bien que la nécessité de résidus basiques soit établie, il n'a pas encore été possible de définir une règle stricte.

Lors de notre étude nous nous sommes intéressés essentiellement aux critères de reconnaissance par la PKA et la PKC, qui présentent des fonctions physiologiques analogues et de nombreux substrats communs. La spécificité des molécules préparées a été évaluée vis à vis de ces deux enzymes.

2) **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

2.1- Spécificité de reconnaissance par la PKA

La PKA phosphoryle les résidus sérines et dans une moindre mesure les résidus thréonines (KEMP 1977). Les premiers éléments concernant la spécificité de reconnaissance par cette enzyme ont révélé la présence de résidus basiques en position N-terminale par rapport au résidu phosphorylable (KEMP 1976). L'utilisation de peptides synthétiques correspondant aux séquences entourant des résidus phosphorylés in vivo a permis de cerner avec plus de précision les critères de reconnaissance.

Le peptide synthétique Arg-Gly-Tyr-Ser-Leu-Gly correspondant à la séquence 21-26 du lysozyme d'oeuf de poule, est phosphorylé avec un Km de 4,4 mM et une vitesse maximale de 12,2 $\mu\text{mol}/\text{mn.mg}$ (KEMP 1976). Le remplacement de l'arginine par une lysine, une proline ou une glycine provoque une chute importante de la vitesse de phosphorylation. Ceci traduit l'importance du résidu arginine par rapport aux autres résidus. La substitution de la sérine par une alanine fournit un inhibiteur compétitif des substrats, avec un Ki de 5 mM.

	Peptides	Taux de phosphorylation	Km (μM)
1	Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Val-Ala	207	<10
2	Arg-Arg-Ala-Ser-Val-Ala	193	20
3	Arg-Ala-Ser-Val-Ala	2	
4	Ala-Ser-Val-Ala	< 1	
5	Arg-Arg-Ala-Ser-Val	100	80
6	Arg-Arg-Ala-Ser	< 1	
7	Leu-Arg-Ala-Ser-Val	< 1	
8	Arg-Leu-Ala-Ser-Val	< 1	
9	Arg-Arg-Ala-Ser-Gly	7	
10	Arg-Arg-Ala-Ser-Phe	138	
11	Arg-Arg-Ala-Ser-Lys	17	
12	Arg-Arg-Ala-Thr-Val	< 1	

TABLEAU 5 Modifications du peptide correspondant au site de phosphorylation de la glycogène synthase par la PKA
(ZETTERQVIST 1976)

L'étude de la pyruvate kinase du foie a été une étape décisive dans la connaissance de la PKA.

Les premiers travaux concernaient l'enzyme extraite du foie de rat. ZETTERQVIST (1976) a recherché à partir du site de phosphorylation, la séquence minimale reconnue par la PKA (Tableau 5). Le peptide Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Val-Ala présente un Km inférieur à 10 μM , valeur la plus proche de celle de la protéine correspondante, 1 μM . L'effet que provoque sur le taux de phosphorylation, la substitution ou l'élimination des différents amino-acides de cette séquence permet d'ébaucher une règle de reconnaissance par la PKA. Les déterminants peuvent être classés en deux catégories: essentiels et favorables.

Les déterminants essentiels sont d'une part la présence des deux arginines en positions n-2 et n-3 par rapport à la sérine (peptides 2,3,4,7,8) et d'autre part la présence d'un résidu en position n+1 (peptides 5 et 6).

Les déterminants favorables sont la présence de résidus hydrophobes à l'extrémité C-terminale (peptides 2,5,9,10,11) et dans une moindre mesure d'un résidu en position N-terminale des deux arginines (peptides 1 et 2), mais ce dernier critère est à confirmer par l'étude d'autres peptides.

La thréonine n'est pratiquement pas reconnue par l'enzyme (peptide 12).

Le site de phosphorylation de la pyruvate kinase de porc, étudiée par KEMP (1977), est inclus dans une séquence présentant une forte homologie avec celle du rat. Le peptide correspondant Leu-Arg-Arg-Ala-**Ser**-Leu-Gly, est phosphorylé avec un Km de 16 μM . Les études de substitution d' amino-acides ont abouti aux mêmes conclusions que celles de Zetterqvist: le remplacement d'une des deux arginines par une lysine, une histidine ou une homoarginine

diminue fortement l'affinité. Kemp a proposé un modèle relativement strict de reconnaissance par la PKA:

-Arg-Arg-X-Ser- (X = résidu neutre).

Ce modèle a été confirmé par l'étude d'autres protéines et est actuellement admis comme le principal critère de reconnaissance par la PKA.

La spécificité de la PKA n'est pas seulement régie par ce que l'on peut appeler des déterminants positifs de reconnaissance. La présence de certains amino-acides, que l'on peut dénommer "déterminants négatifs", dans une séquence théoriquement cible de la PKA peut modifier la cinétique de transformation par l'enzyme ou inhiber totalement la reconnaissance. Ainsi l'addition d'arginines en position C-terminale de la sérine réduit fortement la vitesse de phosphorylation (KEMP 1979).

2.2- Spécificité de reconnaissance par la PKC

Comme dans le cas de la PKA, la reconnaissance par la PKC est liée à la présence de résidus arginines au voisinage du résidu phosphorylable.

Les premiers arguments en faveur de cette hypothèse ont été apportés par C.A. O'BRIAN (1984) qui a étudié le peptide synthétique correspondant au site majeur de phosphorylation des histones riches en lysines (H1):

Arg-Arg-Lys-Ala-Ser-Gly-Pro-Pro-Val,

il présente un K_m de 130 μM . L'auteur avait émis l'hypothèse que les polypeptides contenant plusieurs résidus basiques suivis de la séquence Ala-Ser, pouvaient être substrats de la PKC.

	Peptides	Km	Vmax
1	Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ser-Ser	32,5	2,0
2	Pro-Leu-Ser- <u>Leu</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ser-Ser	1604	0,06
3	Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ala-Ala	40,3	1,6
4	Pro-Leu-Ser- <u>Lys</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ala-Ala	826	0,3
5	Pro-Leu- <u>Arg-Arg</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ala-Ala	14	1,44
6	Pro-Leu-Ser- <u>Arg-Arg</u> -Leu- Ser -Val-Ala-Ala	21	1,35
7	Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ala-Ala-Lys	13,9	1,8
8	Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ala-Ala-Lys-Lys	4,1	1,8
9	Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -Thr-Leu- Ser -Val	36,9	2,2
10	Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -Thr-Leu- Ser	761	0,9

TABLEAU 6 Modifications du peptide issu de la glycogène synthase
(HOUSE 1987b)

De même HUNTER (1984) avait remarqué que le site de phosphorylation du récepteur de l'EGF appartenait à une séquence très basique:

Tyr-Leu-Arg-Arg-Arg-His-Ile-Val-Arg-Lys-Arg-Thr-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-Gln-Glu-Arg-Glu-Leu-Val-Glu

Ce peptide est phosphorylé avec un Km de 5 μ M et une Vmax de 5 μ mol/mn.mg, et contrairement à ce qui est observé pour la PKA la présence d'une arginine au voisinage immédiat du résidu phosphorylable ne semble pas défavorable.

L'étude de substrats physiologiques ou synthétiques a conduit à des résultats parfois contradictoires et montre la difficulté à définir une règle générale. Selon les auteurs l'élément déterminant pour la reconnaissance serait la présence de résidus basiques situés soit en N-term, soit en C-term, soit des deux côtés du résidu phosphorylable.

2.2.1- Travaux justifiant la nécessité de résidus basiques en position N-terminale

HOUSE (1987b) a étudié le peptide issu de la glycogène synthase par substitution ponctuelle des amino-acides susceptibles d'intervenir dans la reconnaissance (Tableau 6).

Le peptide (1) est bien reconnu par la PKC avec un Km de 32,5 μ M. La substitution de l'arginine en position 4 par une leucine, se traduit par une forte augmentation du Km (32,5 à 1604) et une chute de la vitesse de phosphorylation (2,0 à 0,06). De même pour le peptide 4, l'effet dramatique lié à la substitution de la l'arginine par une lysine (augmentation du Km de 40,3 à 826) prouve que ce dernier amino-acide n'est pas capable d'induire la reconnaissance.

Par contre l'addition d'une ou deux lysines (peptides 7 et 8) en

Peptides	Km (μM)	
	PKC	PKA
3 Pro-Leu-Ser- <u>Arg</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ala-Ala	40,3	
11 Pro-Leu-Ser- <u>Arg-Arg</u> -Leu- Ser -Val-Ala-Ala	20,6	3,2
12 Pro-Leu- <u>Arg-Arg</u> -Thr-Leu- Ser -Val-Ala-Ala	13,9	138

TABLEAU 7 Influence de la position des résidus arginines sur l'affinité de la PKA et de la PKC (HOUSE 1987b)

C-term du peptide 3 provoque une chute du K_m , respectivement d'un facteur 3 et 10. Ces résidus ont donc une influence au moins secondaire sur l'affinité.

La présence d'une arginine en N-term est donc nécessaire et suffisante pour la reconnaissance par la PKC. Cependant l'augmentation du nombre d'arginines par substitution de la sérine en 3 ou de la thréonine en 5 (peptides 5 et 6) est favorable et se traduit par une diminution appréciable du K_m .

La substitution ou l'élimination des deux sérines situées en C-term a peu d'influence sur la phosphorylation (Peptides 1, 3 et 9). Par contre l'absence totale de résidu en C-term de la sérine phosphorylable provoque une augmentation importante du K_m (peptide 10). Ce phénomène a déjà été observé avec la PKA, mais il n'est pas commun à toutes les kinases. Dans le cas de la MLCK par exemple, la délétion du résidu voisin du site de phosphorylation diminue la vitesse de phosphorylation mais a peu d'influence sur le K_m .

L'influence de la position des résidus arginines sur le K_m traduit le caractère beaucoup plus strict de la reconnaissance par la PKA comparée à la PKC (Tableau 7).

Avec une seule arginine le peptide 3 n'est pas reconnu par la PKA; de plus la présence de deux arginines n'est favorable que si le positionnement est correct:

Peptide 11: $K_m = 3,2 \mu M$ pour les positions n-3 et n-2 par rapport au résidu phosphorylable

Peptide 12: $K_m = 138 \mu M$ pour les positions n-4 et n-3.

Dans le cas de la PKC, l'augmentation d'affinité liée à la présence d'une deuxième arginine est moins forte et le déplacement du couple d'arginines n'a que peu d'impact sur l'affinité: évolution du K_m de 40,3 à 20,6 et 13,9 μM .

MBP

Gly-Lys-Gly-Arg-Gly-Leu-Ser-Leu-Ser-Arg-Phe-**Ser**-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-
Gln-Lys-Pro

EGF Récepteur

Tyr-Leu-Arg-Arg-Arg-His-Ile-Val-Arg-Lys-Arg-**Thr**-Leu-Arg-Arg-Leu-Leu-
Gln-Glu-Arg-Glu-Leu-Val-Glu

Histones H1

Ala-Lys-Lys-Ala-Gly-Ala-Arg-Arg-Lys-Ala-**Ser**-Gly-Pro-Pro-Val-Ser-Glu

Histones H2B

Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-**Ser**-Pro-Lys-Glu-**Ser**-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr

Protéine 17 (groupe de haute mobilité)

Ala-Lys-Val-Lys-Asp-Glu-Pro-Gln-Arg-Arg-**Ser**-Ala-Arg-Leu-Ser-Ala-Lys

Glycogène synthase

Ile-Arg-Ala-Pro-Gln-Trp-Pro-Arg-Arg-Ala-**Ser**-Cys-Thr-Ser-Ser-Ser-Gly

TABLEAU 8 Substrats physiologiques de la PKC (TURNER 1985)

La nécessité de résidus basiques en N-term du résidu phosphorylable est l'hypothèse que TURNER (1985) a retenue lors de son étude in vitro sur la phosphorylation de la protéine basique de la myéline (MBP). Selon cet auteur la sérine 115 constituerait le principal site de phosphorylation de la MBP in vivo. Le peptide MBP (104-123):

Gly-Lys¹⁰⁵-Gly-Arg¹⁰⁷-Gly-Leu-Ser-Leu¹¹¹-Ser-Arg¹¹³-Phe-Ser¹¹⁵-Trp-
Gly-Ala¹¹⁸-Glu-Gly-Gln-Lys-Pro

et son analogue plus court MBP (104-118) sont bien reconnus par la PKC. Par contre les peptides 111-118 et 111-123 ne sont pas phosphorylés par l'enzyme, ce qui signifie que les amino-acides inclus dans la séquence 104-110 jouent un rôle important dans la reconnaissance.

Le remplacement de l'Arg¹⁰⁷ ou de l'Arg¹¹³ par une Ala provoque une chute dramatique de la vitesse de phosphorylation alors que la substitution de la Lys¹⁰⁵ a des conséquences moindres. Le remplacement de la Lys¹⁰⁵ et de l'Arg¹⁰⁷ par une Ala oriente fortement la phosphorylation sur le résidu 115, alors que sur le peptide initial les autres sérines peuvent aussi être modifiées par l'enzyme.

TURNER souligne le fait que pour de nombreux autres substrats physiologiques, des résidus basiques, en particulier des arginines, sont situés en position 1 ou 2 du côté N-terminal du résidu phosphorylé (Tableau 8). Comme pour la PKA et la MLCK, ces résidus arginines en N-term constitueraient des éléments déterminants pour la reconnaissance par la PKC, cependant ces enzymes présentant des gammes de substrats différentes d'autres critères de sélection restent à définir.

Sites PKC	Phe-Phe-Gly- Ser ⁴⁶ -Asp- <u>Arg</u> -Gly Gly-Thr-Leu- Ser ¹⁵¹ - <u>Lys</u> -Ile-Ser
Sites PKA	His- <u>Arg</u> -Asp- Thr ³⁴ -Gly-Ile-Leu Ser- <u>Arg</u> -Phe- Ser ¹¹⁵ -Trp-Gly-Ala
Sites communs	<u>Lys-Arg-Pro-Ser</u> ⁸ -Gln- <u>Arg</u> -Ser Ser-Gln- <u>Arg-Ser</u> ¹¹ - <u>Lys</u> -Tyr-Leu <u>Lys-Arg-Gly-Ser</u> ⁵⁵ -Gly- <u>Lys</u> -Asp <u>Arg-Gly-Leu-Ser</u> ¹¹⁰ -Leu-Ser- <u>Arg</u> Gly- <u>Arg-Ala-Ser</u> ¹³² -Asp-Tyr- <u>Lys</u> Gly- <u>Arg-Asp-Ser</u> ¹⁶¹ - <u>Arg</u> -Ser-Gly

TABLEAU 9 Sites de phosphorylation de la MBP par la PKA et la PKC
(KISHIMOTO 1985)

Peptides	PKC	PKA
Histones IIA	100	100
Ga-1 Gly-Ser- <u>Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg</u>	364	0
Ga-2 Gly-Ser- <u>Arg-Arg-Arg</u>	111	0
Ga-3 Gly-Ser-Orn-Orn-Orn	89	0
Ph-1 <u>Arg-Arg</u> -Leu-Ser-Ile-Ser-Thr-Glu-Ser	25	84
Py-1 <u>Arg-Arg</u> -Ala-Ser-Val-Ala	84	362

TABLEAU 10 Taux de phosphorylation des peptides rapporté à celui des histones (FERRARI 1985)

Peptides	Km	Vmax
Ga-1 Gly-Ser- <u>Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg</u>	11,6	4,87
Ga-2 Gly-Ser- <u>Arg-Arg-Arg</u>	412	1,78
Th-1 <u>Arg-Arg-Arg-Arg</u> -Tyr- <u>Arg-Arg</u> -Ser-Thr-Val-Ala	128	1,63
Th-2 <u>Arg-Arg</u> -Ser-Thr-Val-Ala	231	0,70
TH-B Pro- <u>Arg-Arg-Arg-Arg-Arg</u> -Ser-Ser- <u>Arg</u> -Pro-Val- <u>Arg</u>	31,5	3,12
S6-1 <u>Arg-Arg</u> -Leu-Ser-Ser-Leu- <u>Arg</u> -Ala	230	3,40

TABLEAU 11 Km apparent (μ M) et Vmax (pmol/mn) des peptides substrats (FERRARI 1985)

- 1- absence de déterminant positif de reconnaissance (arginines en N-term)
 - 2- présence de déterminant négatif de reconnaissance (résidus basiques en C-term).
- De même l'analogue tronqué Ga-2 est bien phosphorylé par la PKC et non reconnu par la PKA.
 - Ph-1 et Py-1, substrats peptidiques typiques de la PKA (deux arginines en N-Term) ne sont pas des bons substrats PKC.
 - la reconnaissance par la PKA est favorisée par la présence de résidus hydrophobes en C-term, ce n'est pas le cas pour la PKC.
 - La sélectivité vis à vis des résidus basiques est différente pour les deux enzymes; dans le cas de la PKA il a été montré que le remplacement d'une arginine par une ornithine avait un effet très néfaste sur la reconnaissance. La comparaison des peptides Ga-2 et Ga-3 prouve que la PKC est moins stricte dans sa sélectivité.

* TABLEAU 11:

- La comparaison des peptides Ga-1/Ga-2, Th-1/Th-2, et S6-1/Th-B suggère que l'efficacité de la phosphorylation est accrue par le nombre de résidus basiques proches du résidu phosphorylable, que ce soit en C-term ou en N-term. Cependant il apparaît que les résidus basiques situés en C-term ont une plus forte influence sur la diminution du Km.

Ces remarques soulignent les différences de spécificité qui séparent la PKA et la PKC que ce soit par la nature, la position ou le nombre de résidus basiques nécessaires à la reconnaissance des substrats.

	Km	Vmax
EGF-R1		
Tyr-Leu- <u>Arg-Arg-Arg</u> -His-Ile-Val- <u>Arg-Lys-Arg</u> - Thr -Leu- <u>Arg-Arg</u> -Leu-Leu-Gln-Glu- <u>Arg</u> -Glu-Leu-Val	15,4	0,18
EGF-R3		
Val- <u>Arg-Arg-Arg</u> - Thr -Leu- <u>Arg-Arg</u> -Leu	48	0,99
P60-1		
(myr) Gly-Ser-Ser- <u>Lys</u> -Ser- <u>Lys</u> -Pro- <u>Lys</u> -Asp-Pro- Ser -Gln- <u>Arg-Arg-Arg</u> -Ser-Leu-Glu	48	0,56
IL-2R		
Tyr-Gln- <u>Arg-Arg</u> -Gln- <u>Arg-Lys</u> -Ser- <u>Arg-Arg</u> -Thr-Ile	24	0,92
p36-1		
Asp-His-Ser-Thr-Pro-Pro-Ser-Ala-Tyr-Gly- Ser -Val- <u>Lys</u> - Ala-Tyr-Thr-Asn-Phe-Asp	250	0,034

TABLEAU 12 Peptides correspondant au site de phosphorylation par la PKC in vivo (WOODGETT 1986)

En étudiant les peptides correspondant au site de phosphorylation in vivo de plusieurs protéines, WOODGETT (1986) est arrivé à une conclusion analogue à celle de FERRARI (Tableau 12). La PKC phosphoryle de préférence les résidus Ser et Thr inclus dans une séquence très basique avec si possible des basiques en N et C-term. Cependant contrairement à la PKA, la présence de résidus en C-term est suffisante. Les acides aminés basiques n'ont d'influence que dans un environnement proche du résidu phosphorylable, distance maximum de six résidus. L'auteur propose une séquence minimale consensus de reconnaissance in vivo par la PKC:

(Ser/Thr) - Xaa - (Lys/Arg)

où Xaa est en général un amino-acide neutre.

La publication récente de substrats physiologiques de la PKC est venue étayer la théorie selon laquelle l'enzyme phosphorylait de préférence des résidus inclus dans une séquence basique. Ainsi, la découverte d'un pseudosubstrat dans la structure de la PKC a montré qu'il était possible d'observer des affinités supérieures à celle des peptides étudiés jusqu'ici (HOUSE 1987). Le pseudosubstrat est supposé se loger dans le site actif de l'enzyme et la maintenir à l'état inactif. Le peptide correspondant à cette séquence:

Arg-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Lys-Asn-Val

présente une constante d'inhibition (Ki) de 147 nM vis à vis du peptide [Ala^{9,10}, Lys^{11,12}] de la glycogène synthase. L'analogue dont l'alanine est substituée par une sérine est substrat avec un Km extrêmement bas (0,2 µM).

La protéine de 40 kD, connue depuis longtemps pour être le substrat majeur de la PKC dans les plaquettes, a été récemment clonée et exprimée (TYERS 1988). L'étude de sa séquence suggère

qu'elle soit phosphorylée au sein d'une séquence présentant des analogies avec celle du pseudosubstrat:

Gln-~~Lys~~-Phe-Ala-~~Arg~~-Lys-**Ser-Thr**-Arg-Arg-Ser-Ile-~~Arg~~-Leu.

2.3- Conclusion

La PKA et la PKC sélectionnent leurs substrats grâce à des déterminants bien distincts.

- La PKA reconnaît des structures de type -Arg-Arg-X-Ser/Thr. La nature des résidus situés en position C-terminale de cette séquence influence fortement la reconnaissance: effet positif pour les résidus hydrophobes, effet négatif pour les résidus basiques.

- La PKC ne répond pas à une configuration stricte et reconnaît des structures plus variées. En dépit de certaines divergences d'opinion, les auteurs s'accordent sur plusieurs critères de reconnaissance:

a) l'enzyme exige au moins une arginine à proximité du résidu phosphorylable,

b) l'affinité croît avec le nombre de résidus basiques, qu'ils soient situés en C-term ou en N-term,

c) le résidu arginine est le plus efficace pour induire la reconnaissance par l'enzyme.

Ces résultats sont le fruit de l'étude de peptides in vitro, mais Woodgett a remarqué que l'affinité des peptides était souvent inférieure à celle des protéines dont ils étaient issus. Il est probable que la structure tertiaire des protéines joue aussi un rôle important dans la sélectivité des substrats et amène éventuellement d'autres résidus basiques à proximité du résidu phosphorylé (KEMP 1977,1978; WOODGETT 1986).

3) CONCEPTION ET ETUDE DE PEPTIDES SUBSTRATS DE LA PKC

3.1- Principe de phosphorylation quantitative in vitro

La phosphorylation in vitro des peptides et protéines est quantifiée grâce à l'emploi de phosphate radiomarqué, amené sous-forme d'ATP [$\gamma^{32}\text{P}$]. La réaction enzymatique est effectuée soit par la PKC purifiée activée par le calcium et les phospholipides, soit par la sous-unité catalytique de la PKA qui ne nécessite pas d'activateur (voir partie expérimentale).

Deux méthodes ont été utilisées pour séparer le substrat phosphorylé de l'ATP radiomarqué.

* Au départ la séparation sur papier échangeur d'ions était utilisée indifféremment pour les peptides et les protéines. Le papier de phosphocellulose permet de retenir en milieu acide, des protéines basiques ou des peptides contenant au moins trois fonctions basiques (GLASS 1978). Un aliquot du milieu réactionnel est déposé sur un papier, l'ATP est éliminé par plusieurs lavages en milieu acide et la radioactivité restée sur le papier correspond aux molécules de phosphate incorporées dans le substrat.

* Nous avons dans un deuxième temps utilisé une méthode plus rapide pour la séparation des substrats protéiques: la précipitation par l'acide trichloroacétique. La présence d'une seconde protéine en quantité importante favorise la précipitation de la protéine substrat. L'ATP radioactif est éliminé dans le surnageant. Les peptides ne précipitant pas en milieu acide, il ne peuvent être séparés selon cette méthode. Nous avons mis à profit

cette propriété pour tester en tant qu'inhibiteurs des peptides substrats; dans la première méthode la mesure de la radioactivité nous aurait fourni la valeur globale de phosphate incorporé dans le peptide et la protéine; dans la seconde méthode nous avons pu quantifier la radioactivité incorporée dans la protéine seule.

3.2- Etude de la protéine encodée par le c-erb A

Le proto-oncogène c-erb A code pour la protéine nucléaire p46^{c-erb A}, récepteur présentant une forte affinité pour l'hormone thyroïdienne T 3 (SAP 1986). Son homologue viral v-erb A, code pour la protéine nucléaire p75^{gag-V-erb A}, qui ne présente plus la capacité de lier les hormones stéroïdes, mais perturbe la transcription de gènes liés à la différenciation. L'activité de ces protéines nucléaires est sous la dépendance d'agents activateurs de kinases, et il semble que la phosphorylation ait un rôle crucial dans leur fonctionnement. L'équipe de J. Ghysdael de l'Institut Pasteur de Lille, a remarqué que le traitement de cellules par des activateurs de la PKC (esters de phorbol) se traduisait par une très forte augmentation de la phosphorylation de ces deux protéines.

La séquence de la protéine du c-erb A a été étudiée afin de localiser des sites potentiels de phosphorylation répondant aux critères de reconnaissance par la PKC. La séquence entourant le résidu Ser¹²⁷, avec cinq résidus basiques en position C-terminale par rapport à la sérine, était un bon candidat:

Leu¹²⁴-Asp-Asp-**Ser**¹²⁷-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Glu¹³⁷

De façon surprenante, l'étude des peptides tryptiques de la protéine n'a révélé qu'un seul site de phosphorylation, correspondant aux sérines 28 et 29. La phosphorylation de ce site est aussi observé in vitro après traitement par la PKA, par contre elle n'est que très faiblement détectée après traitement par la PKC. D'après ces observations, il semble que la phosphorylation consécutive à l'activation par les esters de phorbol ne soit pas

due à l'action directe de la PKC, mais soit le résultat d'une cascade d'événements incluant l'intervention de cette enzyme.

Nous avons cherché à comprendre pourquoi la Ser¹²⁷ n'était pas phosphorylée par la PKC. Deux hypothèses étaient envisageables:

- la structure secondaire de la protéine native ne permettait pas l'accès de l'enzyme au site,
- la structure primaire entourant le résidu phosphorylable n'était pas reconnue.

Pour répondre à cette question nous avons synthétisé la séquence c-erb A (124-137), et étudié sa phosphorylation par la PKC. Ce peptide est un médiocre substrat de la PKC, avec un Km de 615 μ M. Il apparaît donc que le résidu phosphorylable n'est pas modifié, en dépit de la présence de 5 résidus basiques en position C-terminale que nous pouvons dénommer "déterminants positifs de reconnaissance". Nous avons émis l'hypothèse de l'existence dans la séquence primaire, de "déterminants négatifs de reconnaissance", comme cela avait déjà été observé pour la PKA. Les deux résidus aspartiques jouxtant la sérine pouvaient être impliqués dans ce phénomène, puisqu'ils amènent des charges négatives dans un environnement qui nécessite des charges positives. L'effet négatif de ces amino-acides pouvait intervenir selon deux modalités:

- diminution de l'affinité pour l'enzyme,
- interférence avec la réaction de transfert du groupement phosphate.

Dans ce dernier cas, le peptide pouvait inhiber de façon compétitive la phosphorylation d'un substrat de la PKC. Ce peptide testé en tant qu'inhibiteur de la phosphorylation des histones n'a révélé aucune activité, la première hypothèse paraissait donc la plus probable.

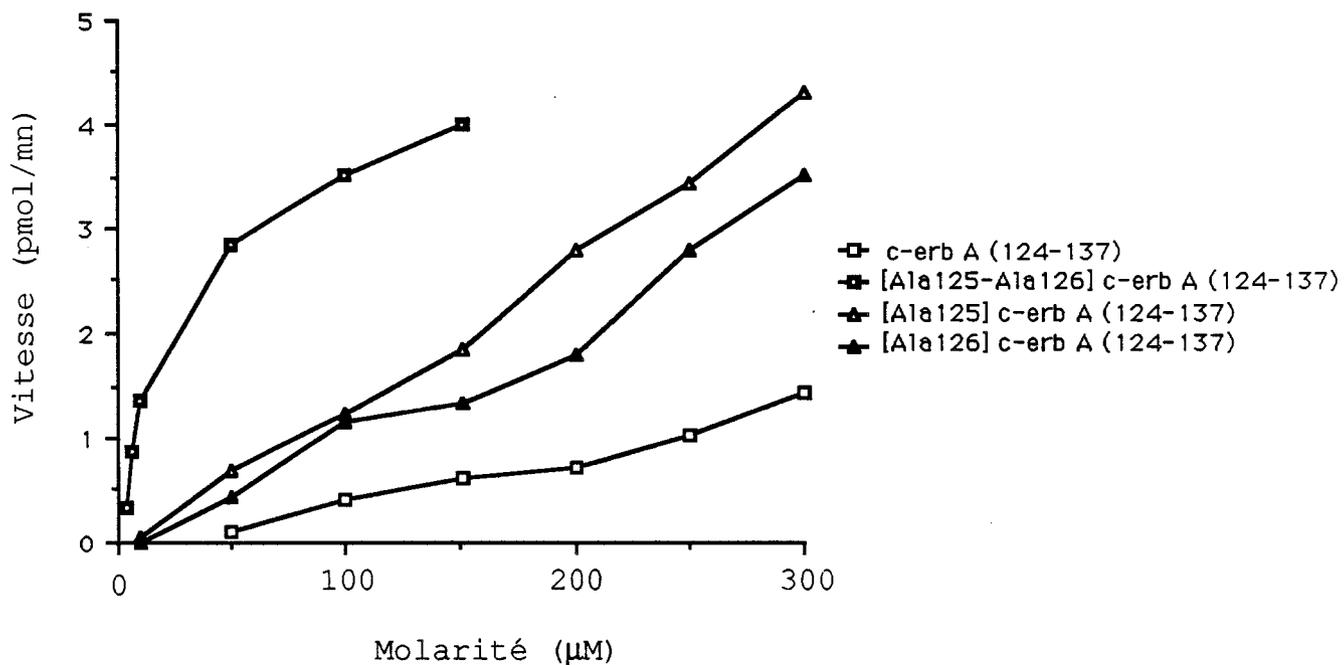


FIGURE 18 Phosphorylation des différents analogues du peptide c-erb A (124-137) par la Protéine Kinase C.

Afin d'évaluer l'influence réelle des résidus aspartiques, nous avons préparé trois analogues du peptide c-erb A (124-137), dans lesquels ces résidus étaient simultanément ou alternativement remplacés par une alanine.

[Ala¹²⁵⁻¹²⁶] c-erb A (124-137)

Leu-~~Ala~~¹²⁵-~~Ala~~¹²⁶-~~Ser~~¹²⁷-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Glu

[Ala¹²⁵] c-erb A (124-137)

Leu-~~Ala~~¹²⁵-Asp-~~Ser~~¹²⁷-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Glu

[Ala¹²⁶] c-erb A (124-137):

Leu-Asp-~~Ala~~¹²⁶-~~Ser~~¹²⁷-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Glu

L'affinité de ces peptides pour la PKC s'est révélée dépendante de la présence et de la position des résidus aspartiques, par contre la vitesse de phosphorylation n'est pas influencée par ces résidus. La figure 18 et le tableau 12 retracent l'évolution des différentes constantes cinétiques.

	PEPTIDE	Km (μM)	Vmax (μmol/mn.mg)
	c-erb A (124-137)	615	0,11
[Ala ¹²⁵⁻¹²⁶]	c-erb A (124-137)	19,1	0,18
[Ala ¹²⁶]	c-erb A (124-137)	225	0,28
[Ala ¹²⁵]	c-erb A (124-137)	367	0,28

TABLEAU 13: Constantes cinétiques du c-erb A (124-137) et de ses analogues

La bonne affinité que présente le peptide disubstitué par une alanine prouve que les cinq résidus basiques agissent bien en tant que déterminants positifs de reconnaissance. La présence d'un résidu acide peut masquer cette reconnaissance avec une efficacité d'autant plus grande que ce résidu est proche du résidu phosphorylable.

Ce nouvel élément doit donc être considéré lors de la recherche dans une séquence protéique, de sites potentiels de phosphorylation par la PKC. D'autre part, même si la séquence primaire ne contient pas de déterminant négatif de reconnaissance, ceux-ci peuvent être amenés à proximité du résidu phosphorylable par la structure secondaire de la protéine.

3.3-Influence de résidus arginines N-terminaux sur l'affinité de peptides substrats

Avant de concevoir la structure d'un inhibiteur, nous avons cherché s'il n'existait pas comme dans le cas de la PKA, des résidus basiques N-terminaux dont la position était cruciale pour la reconnaissance. Nous nous sommes basés sur les travaux de FERRARI (1985) et avons repris le modèle du meilleur substrat: Gly-Ser-Arg₆-Tyr. En position N-terminale de la sérine, nous avons ajouté différentes séquences polyarginines dans lesquelles étaient inclus des résidus alanines.

La présence d'arginines en position C-terminale constitue un déterminant négatif de reconnaissance pour la PKA. De plus, pour nous affranchir totalement d'une éventuelle reconnaissance, nous avons incorporé en position critique occupée par la séquence X -Arg-Arg- Y -(Ser) (X = résidu quelconque et Y = résidu neutre) pour les substrats PKA, le motif commun: Arg-Ala- X -Arg-(Ser) (X = Arg ou Ala) qui n'a pas la capacité d'induire la reconnaissance. Quatre peptides ont été préparés, leur nom a été attribué arbitrairement lors de la synthèse, détaillée dans la partie expérimentale.

S 1

Arg-Arg-Arg-Arg-**Ala**-Arg-Arg-**Ser**-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

S 3

Arg-Arg-Arg-Arg-**Ala-Ala**-Arg-**Ser**-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

S 4

Arg-Arg-**Ala**-Arg-Arg-**Ala-Ala**-Arg-**Ser**-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

S 2

Arg-**Ala**-Arg-**Ala**-Arg-**Ala-Ala**-Arg-**Ser**-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

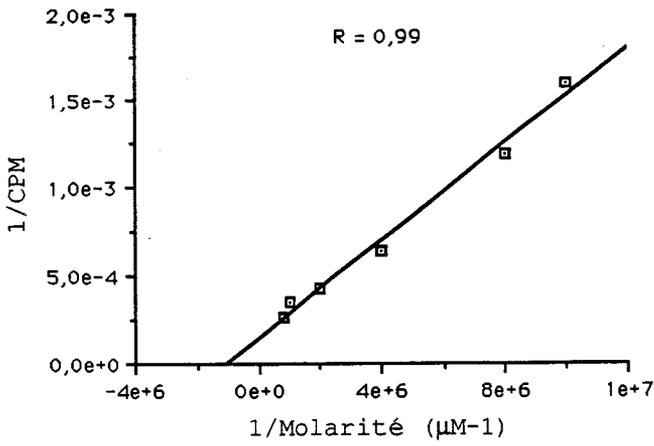
* Activation par les phospholipides

Pour tous les peptides, nous avons observé une phosphorylation importante en absence de phospholipides. De plus, l'addition de phospholipides en concentration importante: 2,5 µg/ml de DAG et 80 µg/ml de PS a un effet inhibiteur sur la phosphorylation. En réduisant cette concentration au dixième, nous avons obtenu le phénomène d'activation, mais elle est beaucoup moins importante que celle qui peut être observée avec les histones. Les taux d'activation moyens obtenus pour 0,25 µg/ml de DAG et 8 µg/ml de PS sont les suivants:

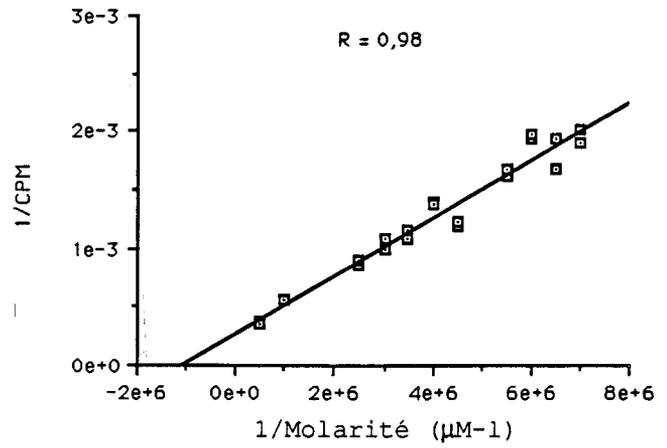
Peptide	Facteur d'accroissement par rapport à la phosphorylation de base
S 1	x 1,7
S 3	x 2
S 4	x 2,2
S 2	x 2,6

Ce phénomène apparemment surprenant a été ultérieurement confirmé par les travaux de FERRARI (1987), qui a remarqué que les substrats dont les résidus sérines étaient insérés entre deux clusters polyarginines, étaient phosphorylés en absence d'activateur. Selon l'auteur, ce phénomène se produirait uniquement dans le cas où les arginines sont présentes des deux côtés de la sérine, et en nombre important. Il est intéressant de remarquer que dans notre cas, l'écart entre la phosphorylation de base et la phosphorylation avec activation, croît avec le nombre d'alanines présents dans la séquence, observation qui va dans le sens de la théorie de FERRARI. Cependant nous n'avons pas étudié

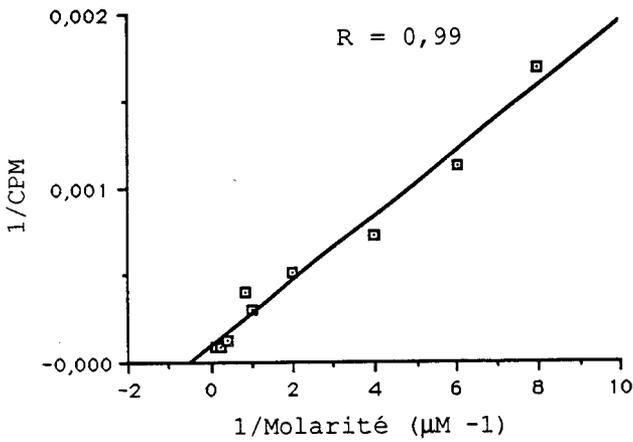
Km des Histones IIIS



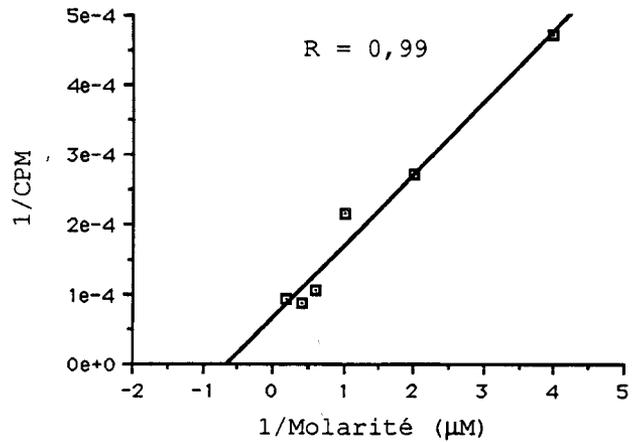
Km de Gly-Ser-Arg6-Tyr



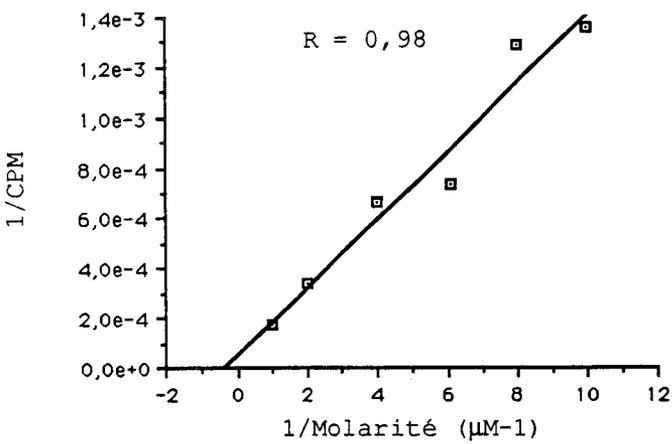
Km de S1



Km de S2



Km de S3



Km de S4

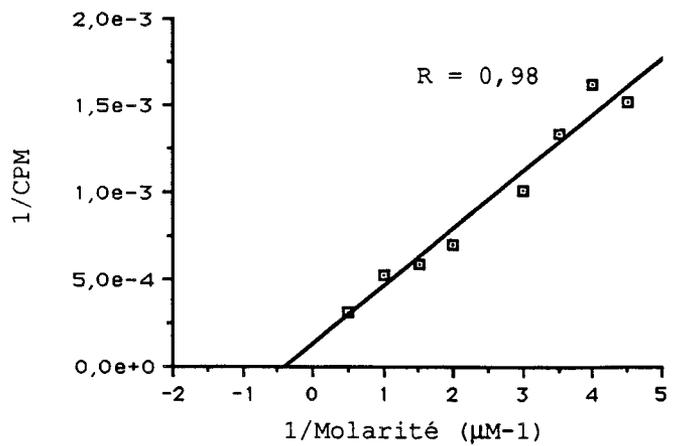


FIGURE 19 Détermination du Km des différents substrats d'après la représentation en double inverse.

suffisamment cette propriété pour généraliser le phénomène.

* Détermination des Km - Conclusions

Afin de comparer nos résultats à ceux publiés par FERRARI (1985) au sujet du peptide Gly-Ser-Arg₆-Tyr, nous avons repris les conditions de dosage qu'il utilisait, c'est à dire activation par PS en absence de DAG. L'auteur utilise une concentration en PS de 80 µg/ml; l'étude réalisée sur nos peptides a montré que l'on obtenait une activation analogue avec une concentration de 10 µg/ml. Le Km des quatre peptides, du peptide Gly-Ser-Arg₆-Tyr et des histones (utilisées comme témoin) a ensuite été déterminé dans ces conditions (Figure 19, Tableau 13).

Substrat	Km (µM)
Histones IIIS	0,5
Gly-Ser-Arg ₆ -Tyr	1,0
S 1	2,0
S 2	1,5
S 3	2,4
S 4	2,4

TABLEAU 14: Valeur de Km des différents substrats

La valeur de Km obtenue pour les histones, en considérant leur masse moléculaire de 16000 d, correspond aux valeurs habituellement données dans la littérature, inférieures à celles publiées par FERRARI (WISE 1982, WOODGETT 1986, KONDO 1987). Nous avons observé cette même différence pour le peptide Gly-Ser-Arg₆-Tyr pour lequel nous avons obtenu un Km de 1,0 µM pour une valeur publiée de 11,6 µM.

Les peptides S 1, 2, 3 et 4 sont de bons substrats de la PKC, mais leur affinité est du même ordre que celle du peptide Gly-Ser-Arg₆-Tyr. Contrairement à notre attente, nous n'avons pas observé de variation significative de l'affinité en fonction de la position des arginines en N-term. Deux hypothèses sont envisageables:

- il n'y a pas pour ces résidus arginines de position critique pour l'affinité
- le nombre d'arginines présentes dans le peptide est trop important pour que la modification d'un seul résidu ait une influence détectable par la méthode utilisée.

L'élément important que l'on peut tirer de ces résultats est que l'addition de résidus arginines en N-term, même en nombre important, ne permet pas d'augmenter l'affinité d'un peptide présentant un cluster d'arginines en C-term.

* Phosphorylation par la PKA

Les quatre peptides ont été étudiés en tant que substrats de la PKA; comme nous l'attendions, ils ne sont pas modifiés par cette enzyme. Il en est de même pour le peptide Gly-Ser-Arg₆-Tyr, résultat déjà publié par FERRARI (1985).

3.4 - Influence de la position des résidus arginines C-terminaux sur l'affinité des peptides

Les travaux de FERRARI ont montré que pour des peptides ne présentant que des résidus arginines C-terminaux, l'affinité était dépendante du nombre de ces résidus. Ainsi Gly-Ser-Arg₆-Tyr présente un Km de 11,6 μM , l'élimination des quatre résidus C-terminaux pour fournir le peptide Gly-Ser-Arg₃ provoque une augmentation du Km à 412 μM .

Afin de nous assurer que la chute d'affinité était bien liée au nombre de résidus arginines et non à leur position, nous avons préparé le peptide Gly-Ser-Ala₃-Arg₃. Contrairement au peptide précédent, ce sont les trois arginines les plus éloignées de la sérine qui sont conservées.

Ce peptide s'est révélé être médiocre substrat de la PKC. Son Km est de l'ordre de 200 μM . Etant données les différences que nous avons observées entre les valeurs de Km publiées par Pinna et celles que nous avons obtenues, nous ne pouvons tirer de conclusion sur la variation d'affinité en fonction de la position des trois arginines. Cependant, il est clair que l'affinité est très fortement augmentée quand on passe de trois à six arginines en position C-terminale.

C) CONCEPTION ET ETUDE D'INHIBITEURS DE LA PKC

1) **ANALOGUES DE SUBSTRATS PEPTIDIQUES SPECIFIQUES DE LA PKC**

1.1-Remplacement de la sérine par un résidu neutre

La première étape dans la conception d'inhibiteurs compétitifs d'un substrat, est de tester l'efficacité d'un analogue de ce substrat ne présentant plus de résidu phosphorylable. Dans ces conditions, les signaux positifs de reconnaissance par l'enzyme sont maintenus; seule l'affinité dépendant du résidu phosphorylable est perdue (formation de liaisons hydrogènes au niveau de la fonction hydroxyle, passage par un état de transition dont l'affinité est supérieure à celle de l'état basal,..).

Nous avons vu précédemment qu'un cluster de six arginines en position C-terminale assurait une bonne reconnaissance par l'enzyme. Nous avons donc gardé ce motif comme structure commune pour la préparation d'inhibiteurs, en outre dans le cadre de la synthèse peptidique en phase solide, la préparation d'analogues à séquence C-terminale identique était beaucoup plus rapide et pratique à réaliser.

Nous avons préparé trois inhibiteurs potentiels polyarginines dans lesquels le résidu phosphorylable était remplacé par une alanine. En position N-terminale, nous avons ajouté des résidus arginines afin d'évaluer si leur influence était analogue à celle observée avec les substrats (c'est à dire plus faible qu'en C-term).

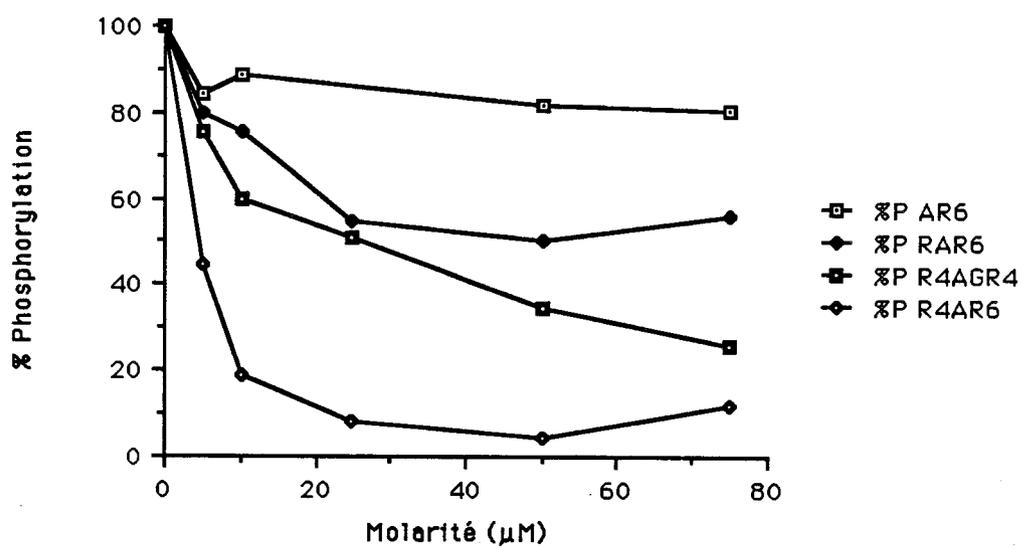


FIGURE 20 Inhibition de la PKC par les peptides polyarginines

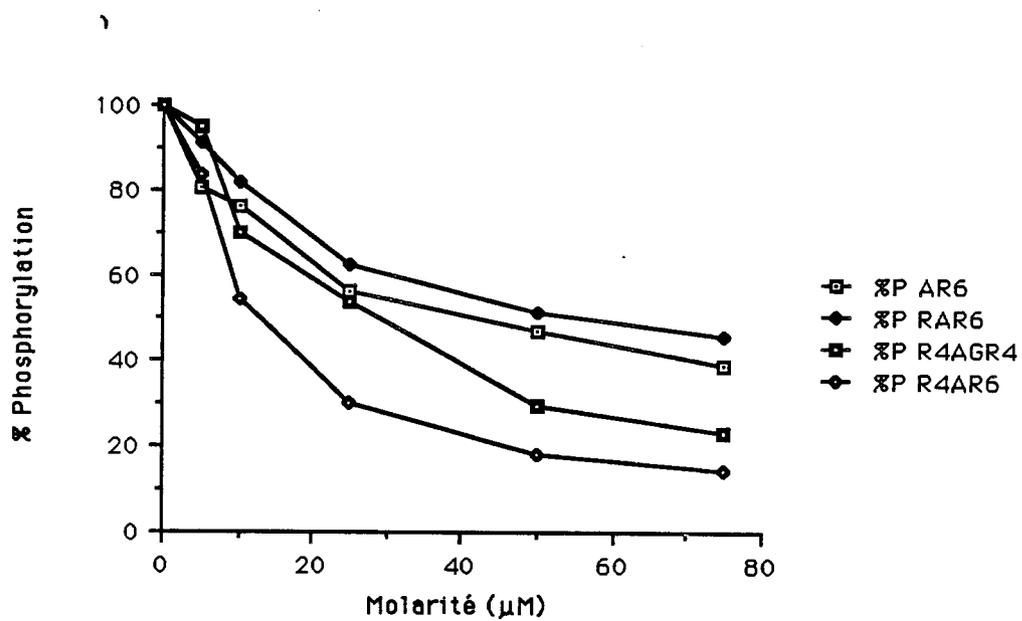


FIGURE 21 Inhibition de la PKA par les peptides polyarginines

Les peptides préparés sont les suivants:

- Ala-Arg₆ (AR6)
- Arg-Ala-Arg₆ (RAR6)
- Arg₄-Ala-Arg₆ (R4AR6)

D'autre part, dans ses travaux sur les peptides polyarginines, FERRARI (1985) mentionnait que le peptide Arg₄-Ala-Gly-Arg₄ (R4AGR4) était un bon inhibiteur de la PKC, mais ne fournissait pas de constantes d'inhibition, Ki ou IC₅₀. Ce peptide a été synthétisé dans un but de comparaison.

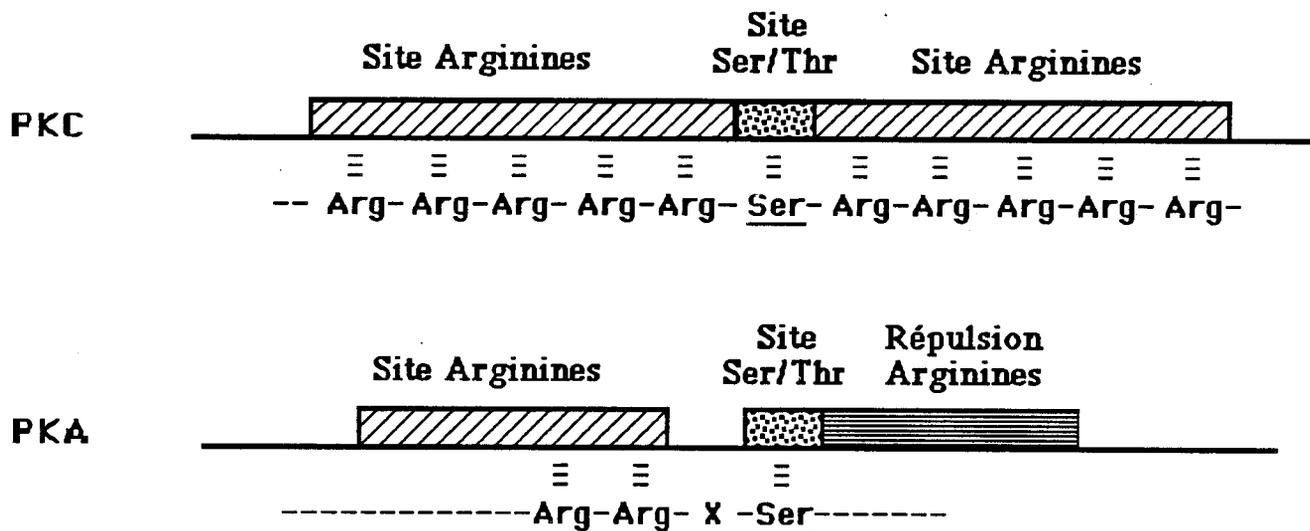
1.1.1- Remarques sur le mode d'évaluation des inhibiteurs

L'activité des différents inhibiteurs a été évaluée vis à vis de la phosphorylation des Histones IIIS pour la PKC, et des Histones IIA pour la PKA. Dans un premier temps les concentrations en Histones utilisées étaient de 240 µg/ml soit 15 µM; par la suite pour augmenter la sensibilité du test, la concentration a été ramenée à 60 µg/ml; par souci d'homogénéité la plupart des résultats sont donnés pour ces conditions. Toutefois, quelques peptides n'ont pas été retestés car la comparaison à un inhibiteur témoin permettait d'évaluer leur faible activité.

1.1.2- Activité comparée des inhibiteurs polyarginines

Nous avons testé l'activité inhibitrice des quatre peptides dans une gamme de concentrations allant de 10 à 100 µM. Chacun d'eux est inhibiteur de la PKC, mais contrairement aux observations que nous avons faites avec les substrats, l'activité est ici dépendante du nombre de résidus arginines (Figure 20).

POSITIONNEMENT D'UN SUBSTRAT



POSITIONNEMENT D'UN INHIBITEUR

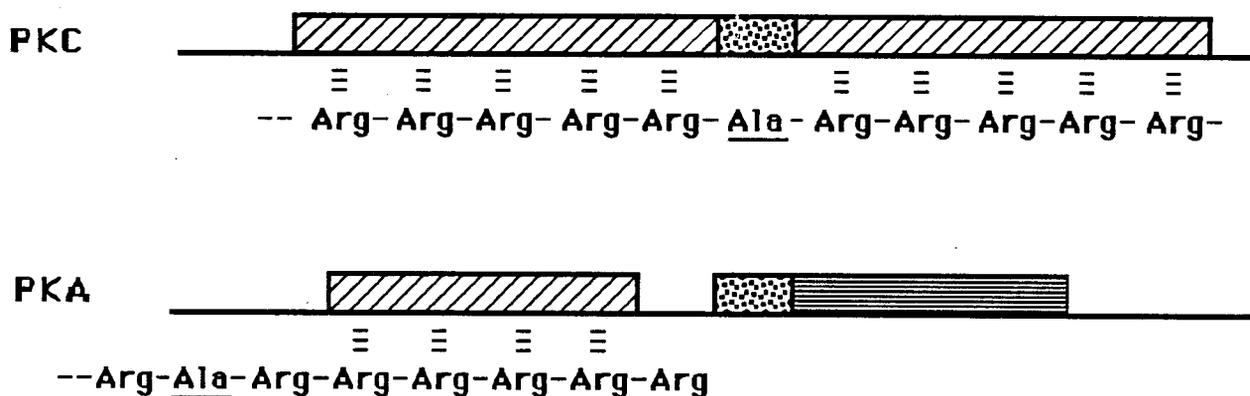


FIGURE 22 Hypothèse de positionnement d'un substrat et d'un inhibiteur dans le site actif de la PKA et de la PKC.

Le peptide offrant la meilleure inhibition est Arg₄-Ala-Arg₆, avec une IC₅₀ de 7 µM.

De façon surprenante, ces peptides testés vis à vis de la PKA ont révélé un pouvoir inhibiteur analogue à celui observé avec la PKC (Figure 21). Le plus actif, Arg₄-Ala-Arg₆ présente une IC₅₀ de 8 µM.

A la lumière de ces résultats, nous nous apercevons qu'il n'est pas possible de transposer le comportement d'un substrat de protéine kinase à celui d'un analogue ne contenant pas de résidu phosphorylable. Dans le cas d'un substrat, la spécificité pour la PKC est totale, et l'affinité du peptide ne croît pas avec l'addition d'arginines à l'extrémité N-terminale. Par contre, un inhibiteur de la PKC peut être reconnu par la PKA bien que son analogue phosphorylable ne soit pas modifié par cette enzyme.

En nous basant sur les déterminants spécifiques de reconnaissance par la PKA et la PKC, nous avons proposé un modèle schématique de leur site actif en accord avec nos observations (Figure 22)

* Dans le cas d'un substrat spécifique de la PKC, tel que les substrats polyarginines étudiés précédemment, nous pouvons imaginer que le peptide se positionne de telle sorte que le résidu sérine soit lié à une structure présentant une affinité pour le groupement hydroxyle, et que les arginines soient liées à leur sites de reconnaissance, par des interactions de type électrostatique.

* Pour un substrat de la PKA, on peut envisager le même type de positionnement dans le site actif, avec une affinité inhérente à la présence de la sérine et des résidus arginines. Nous avons vu que la présence d'arginines en C-term de la sérine interdisait toute phosphorylation par la PKA, et nous pouvons supposer qu'il

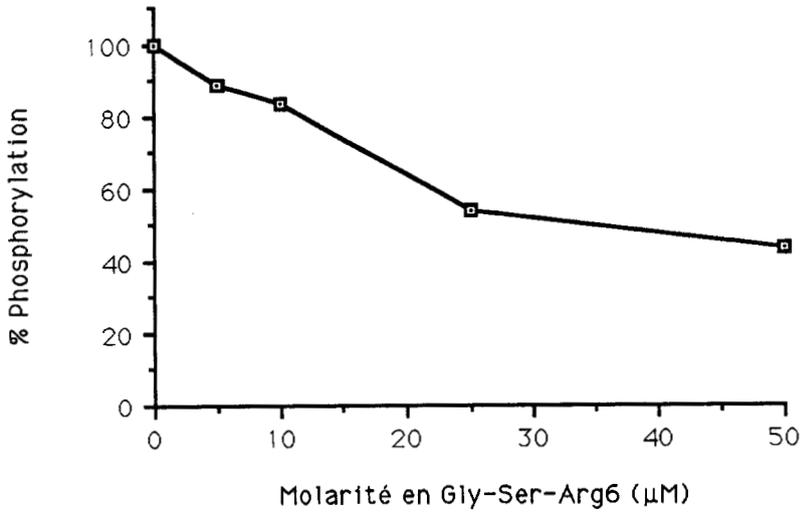


FIGURE 23 Inhibition de la Protéine Kinase A par Gly-Ser-Arg6

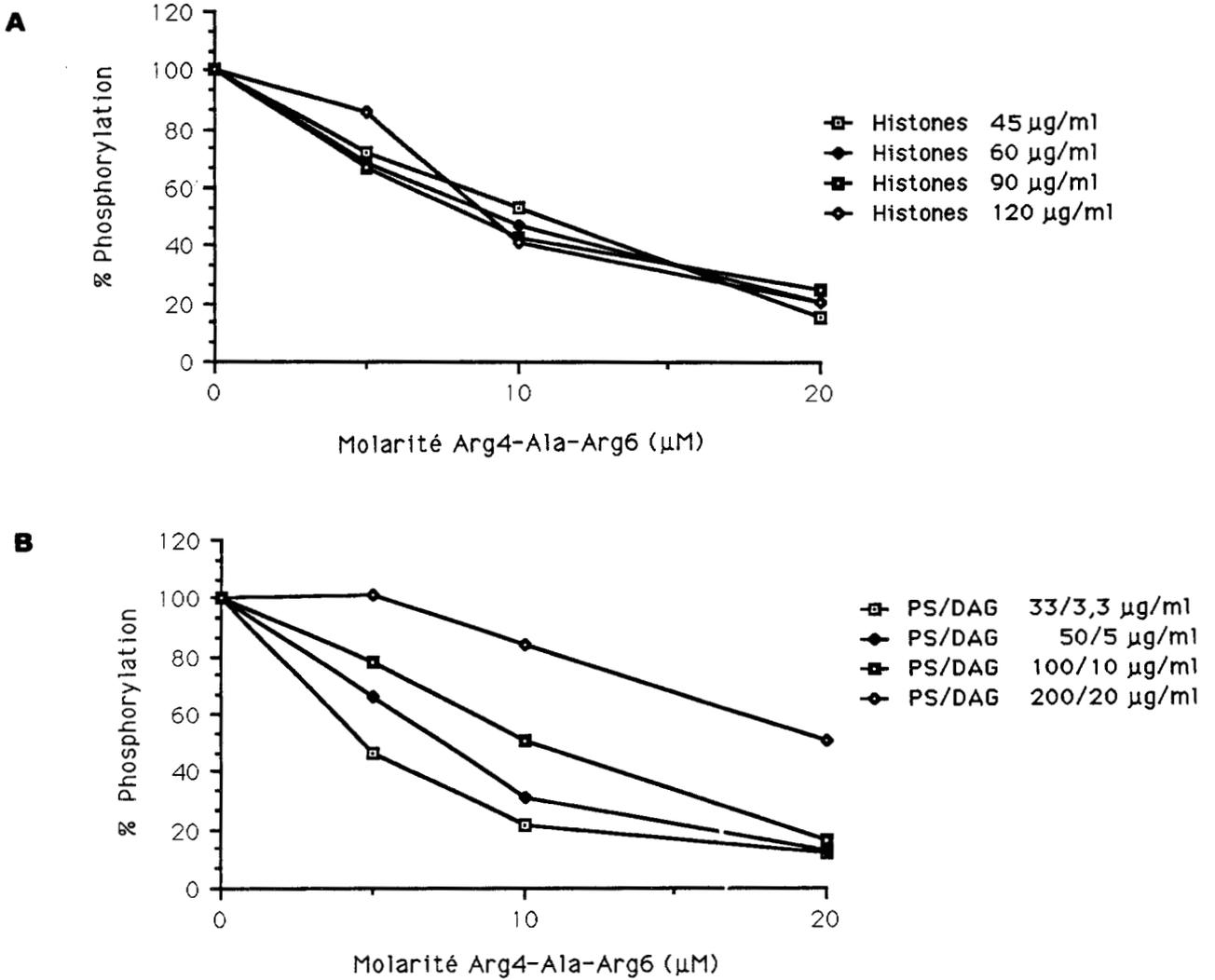


FIGURE 24 Détermination du mode d'inhibition de la PKC par Arg4-Ala-Arg6: (A) Compétition Arg4-Ala-Arg6 / histones, (B) Compétition Arg4-Ala-Arg6 / phospholipides.

existe une zone de répulsion pour les arginines.

* Si nous considérons maintenant un inhibiteur polyarginine de la PKC, celui-ci peut adopter dans le site actif de la PKC la même position que son analogue substrat. Dans le site actif de la PKA, afin d'éviter la répulsion au niveau des arginines C-terminales le peptide peut subir une "translation" qui amène ce cluster d'arginines au niveau du site de reconnaissance liant habituellement les résidus N-terminaux. Ce phénomène expliquerait l'inhibition que nous avons observée.

Cette hypothèse suggère qu'un substrat spécifique de la PKC pourrait être inhibiteur de la PKA. Nous avons donc testé le substrat Gly-Ser-Arg₆, il inhibe la phosphorylation des Histones par la PKA, avec une activité de même ordre que celle de Ala-Arg₆ et Arg-Ala-Arg₆ (Figure 23).

1.1.3- Etude du peptide Arg₄-Ala-Arg₆

Nous avons tenté de définir le mode d'action du peptide Arg₄-Ala-Arg₆. Des études de compétition avec les histones ou les phospholipides ont été envisagées. La représentation en double inverse n'a pas permis de définir le type d'inhibition (compétitive ou non compétitive). Cependant certains arguments illustrés par les Figures 24 A et B permettent d'avancer que le peptide agit essentiellement par interaction avec les phospholipides:

- le taux d'inhibition pour une concentration donnée en inhibiteur est indépendant de la concentration en histones (les concentrations utilisées sont 45/ 60/ 90 et 120 µg d'histones/ml).
- l'accroissement de la concentration en phospholipides provoque une diminution de l'activité inhibitrice du peptide (les

concentrations en phospholipides utilisées sont PS/DAG: 33/3,3; 50/5; 100/10 et 200/20 µg/ml).

Ces arguments ne donnent pas la raison pour laquelle ce peptide inhibe la PKA dont l'action est indépendante des phospholipides.

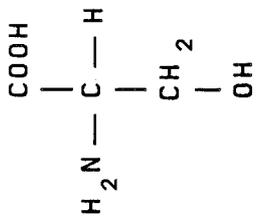
1.2- Remplacement de la sérine par un résidu susceptible d'être reconnu par l'enzyme

Les peptides de type polyarginine dans lesquels un résidu alanine remplace la sérine d'un substrat n'offrent pas de spécificité pour la PKC. L'acquisition de la spécificité pouvait être envisagée selon deux stratégies:

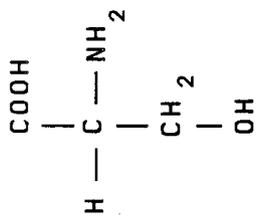
- diminution de la reconnaissance par les autres kinases
- augmentation de l'affinité pour la PKC

La première méthode paraissait difficilement réalisable car le cluster de six arginines indispensable à la reconnaissance par la PKC est aussi reconnu par la PKA. Nous nous sommes donc tournés vers la deuxième solution, et avons recherché un signal positif de reconnaissance positionné de telle sorte qu'il ne soit critique que pour la PKC.

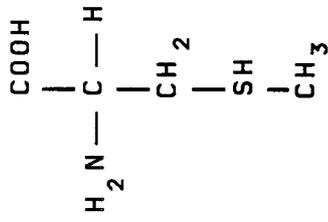
Les substrats polyarginines étudiés précédemment sont spécifiques de la PKC (vis à vis de la PKA) car seul son site actif permet un bon positionnement de la sérine. Le remplacement de la sérine, non plus par un résidu neutre, mais par un résidu présentant des propriétés analogues à celles de la sérine, en particulier la possibilité de fournir une liaison hydrogène, devait accroître l'affinité de façon sélective pour la PKC.



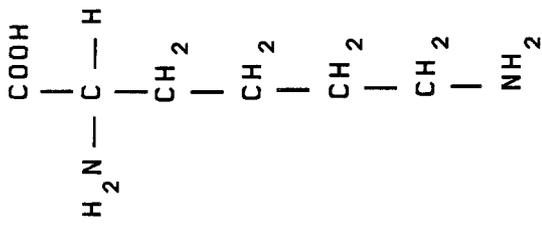
L SERINE



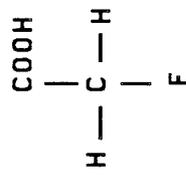
D SERINE



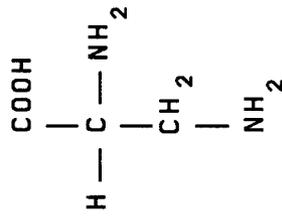
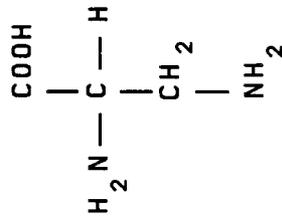
L METHIONINE



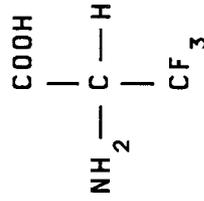
L LYSINE



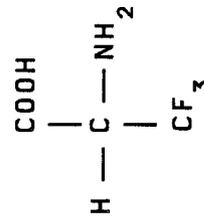
ACIDE FLUORO-
ACETIQUE



ACIDES L et D
DIAMINOPROPIONIQUES



L TRIFLUORO
ALANINE



D TRIFLUORO
ALANINE

FIGURE 25 Structures greffées en N-term de Arg 6

1.2.1- Résidu présentant un doublet électronique libre au niveau de la chaîne latérale

Les molécules utilisées en remplacement de la sérine sont les suivantes (Figure 25):

- D Sérine.

Le remplacement d'un amino-acide par son isomère optique est une substitution fréquemment utilisée pour l'étude des relations structure-activité dans le domaine des hormones peptidiques. Dans le cas présent, bien que la chaîne latérale soit identique et puisse fournir le même type de liaisons avec le site actif, la configuration du carbone alpha devait interdire la réaction enzymatique.

Il faut noter cependant que la présence d'un D amino-acide risquait de modifier la conformation du peptide, et d'induire une diminution de l'affinité pour l'enzyme, comparée à celle du substrat naturel.

- Méthionine
- Acides diaminopropioniques (DAP).

Comme pour les amino-acides précédents, le doublet électronique est situé à la même distance du carbone alpha que celui de la sérine (les isomères L et D n'ont pas été résolus avant leur incorporation).

- Lysine.

Bien que sa chaîne latérale soit beaucoup plus longue que celle de la sérine, nous avons testé cet amino-acide car les chaînons carbonés donnent une grande mobilité à la fonction amine et pouvaient permettre un bon positionnement dans le site actif.

- Trifluoroalanine (F_3 Ala)
- Acide fluoroacétique (FAC)

Sachant que pour les peptides substrats l'addition de résidus arginines en N-term m'améliorait pas la reconnaissance, nous n'avons conservé que les six résidus arginines en N-term. Les peptides synthétisés sont les suivants:

Gly-DSer-Arg₆ (G-DS-R6)

Gly-Met-Arg₆ (G-M-R6)

DAP-Arg₆ (DAP-R6)

Lys-Arg₆ (K-R6)

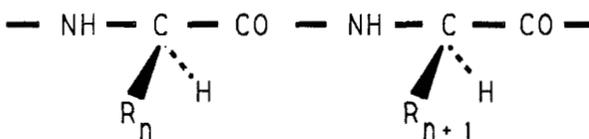
F₃Ala-Arg₆ ((F3)A-R6)

FAC-Arg₆ (FAC-R6)

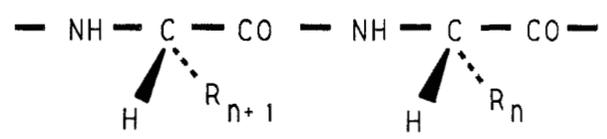
1.2.2- Rétro-inverso peptide

Les rétro-inverso peptides sont des analogues des peptides naturels (enchaînement d'acides aminés de série L), constitués d'acides aminés de série D disposés dans l'ordre inverse de la séquence biologique. Dans ces conditions, une représentation dans l'espace montre que si les chaînes latérales des acides aminés sont alignées sur celles du peptide naturel, l'enchaînement des liaisons peptidiques est inversée.

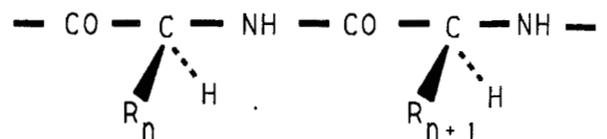
PEPTIDE NATUREL



RETRO-INVERSO PEPTIDE



|||



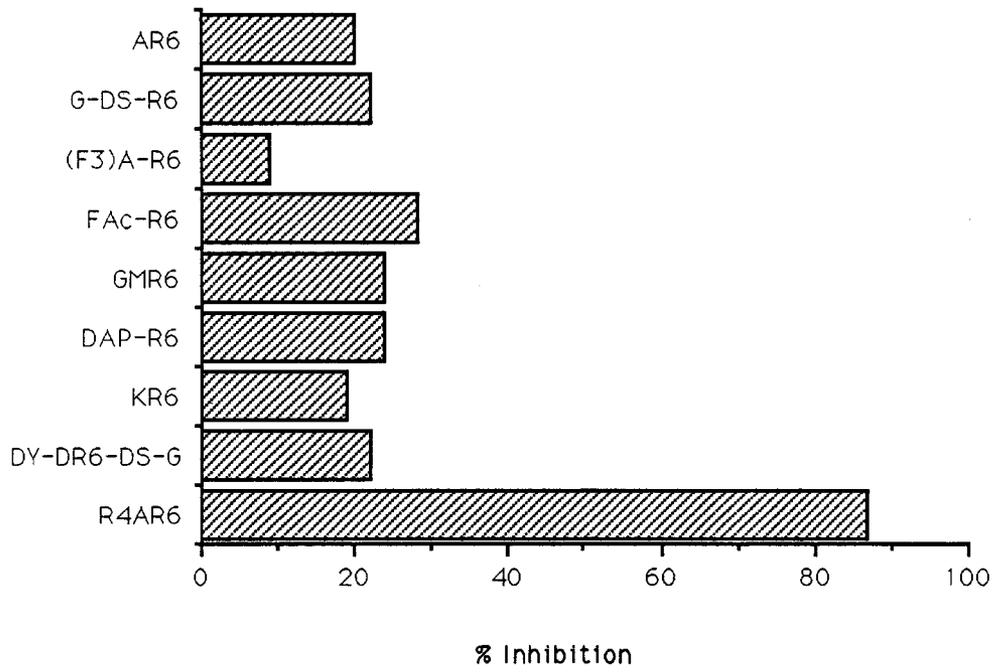


FIGURE 26 Inhibition de la PKC par les analogues (Gly)- X -Arg₆

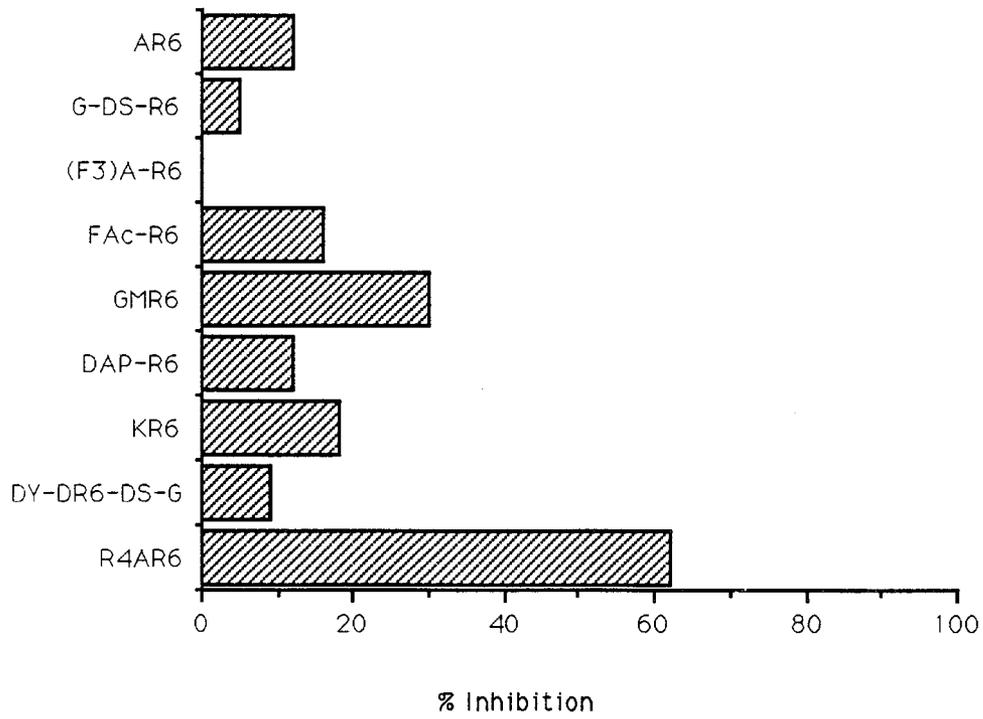


FIGURE 27 Inhibition de la PKA par les analogues (Gly)- X -Arg₆

L'étude d'un rétro-inverso peptide permet d'évaluer l'importance des liaisons peptidiques dans le phénomène de reconnaissance, et le cas échéant dans la réaction de transfert catalysée par l'enzyme. D'autre part, ces peptides constitués d'acides-amino de série D sont résistants aux peptidases et susceptibles de présenter in vivo une demi-vie nettement supérieure à celle des peptides naturels.

Nous avons préparé le rétro-inverso peptide correspondant au meilleur substrat publié par Pinna Gly-Ser-Arg₆-Tyr, c'est à dire: DTyr-DSer-DArg₆-Gly (DY-DR₆-DS-G).

1.2.3-Résultats

Tous les peptides ont été testés en tant qu'inhibiteurs de la phosphorylation des histones (240 µg/ml) par la PKC ou la PKA. Nous avons comparé leur activité à la concentration de 35 µM. Les résultats obtenus sont résumés dans les Figures 26 et 27, ils correspondent à la moyenne obtenue pour trois essais réalisés en triple point.

Tous ces composés, comparés au peptide Arg₄-Ala-Arg₆, ont un faible pouvoir inhibiteur. L'addition d'un résidu "cible" à la séquence Arg₆ ne permet pas de dégager une différence d'activité significative entre les peptides, ni vis à vis de l'analogue contenant un résidu neutre, Ala-Arg₆. La présence de quatre arginines supplémentaires en N-term reste un facteur prépondérant pour l'activité inhibitrice, que ce soit vis à vis de la PKC ou de la PKA.

Nous n'avons pas obtenu l'activité escomptée avec le rétro-inverso peptide. Ce peptide n'est pas phosphorylé par la PKC; nous pouvons en conclure que les liaisons peptidiques interviennent soit dans l'étape de reconnaissance par l'enzyme, soit dans la réaction de tranfert du groupement phosphate. Le fait que ce peptide ne soit pas non plus un bon inhibiteur de l'enzyme est en faveur de la première hypothèse. Cependant, nous avons pu *a posteriori*, grâce à la méthode de TCA précipitation étudier le peptide naturel Gly-Ser-Arg₆, en tant qu'inhibiteur de la phosphorylation des histones. Or ce bon substrat s'est révélé un piètre inhibiteur, avec une IC₅₀ ≥ 70 μM. Cela signifie que l'affinité de l'enzyme pour un substrat n'est pas transposable quand ce substrat est étudié en tant qu'inhibiteur. Ce phénomène est peut être lié au fait que dans les tests d'inhibition, nous faisons entrer en compétition un peptide et une protéine, et il aurait été intéressant d'étudier l'activité inhibitrice de ce substrat sur un autre peptide. Cependant, le mode de séparation utilisé ne nous permettait pas de séparer deux peptides substrats après réaction.

1.3 -Préparation d'analogues du pseudosubstrat

1.3.1- Concepts

Les résultats précédents montrent que le motif polyarginine n'offre pas de spécificité pour la PKC, de plus un minimum de dix résidus est nécessaire pour observer une inhibition appréciable (IC_{50} de 1 à 10 μM). Il semble que l'activité de ces produits soit liée à un effet de charges plutôt qu'à une reconnaissance spécifique au niveau du site actif. De ce fait, nous nous sommes tournés vers une structure moins homogène, celle du pseudosubstrat. Nous avons vu précédemment (Chapitre II.C.3) que cette séquence mise en évidence dans le domaine régulateur de l'enzyme (Figure), était susceptible en absence d'activateurs, de maintenir la PKC à l'état de repos (HOUSE 1987).

Arg¹⁹-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-**Ala**²⁵-Leu-Arg-Gln-Lys-Asn-Val³¹
-His-Glu-Val-Lys-Asn³⁶

FIGURE 28 Séquence du pseudosubstrat de la protéine kinase C

Les peptides synthétiques PKC(19-36) et PKC(19-31), inhibent la phosphorylation du peptide [Ala^{9,10},Lys^{11,12}]GS(1-12) avec un K_i de 147 et 92 nM respectivement. Outre leur affinité élevée, ces inhibiteurs offrent une bonne spécificité: les concentrations nécessaires pour inhiber la PKA ou la MLCK sont au moins 100 fois supérieures à celles utilisées pour la PKC. De plus, le peptide [Ser²⁵] PKC (19-31) est un bon substrat avec un K_m de 0,2 μM . Comparé aux peptides polyarginines, le pseudosubstrat constitue un meilleur modèle puisqu'il associe

forte affinité et spécificité, qu'il s'agisse du substrat ou de l'analogue substitué par une alanine.

Néanmoins, il faut noter que la phosphorylation des histones n'est pas inhibée par les pseudosubstrats (PKC (19-36) ou (19-31)). Actuellement, aucun argument n'a pu justifier ce phénomène; les auteurs précisent simplement que les histones ont un comportement particulier et qu'elles ne devraient pas être le seul substrat utilisé pour l'évaluation d'inhibiteurs.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'étude de rétro-inverso peptides pouvait fournir des informations sur le mode de reconnaissance des substrats par l'enzyme. Bien que nous ayons observé une chute d'affinité lors de l'inversion des chaînes peptidiques, en partant d'une structure présentant un K_i très bas, nous pouvions escompter une affinité résiduelle satisfaisante. Outre le peptide PKC (19-31) utilisé comme témoin, nous avons préparé deux rétro-inverso peptides, analogues de l'inhibiteur et du substrat correspondants:

* PKC (19-31) (P_{Ala}):

Arg-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-**Ala**-Leu-Arg-Gln-Lys-Asn-Val

* Rétro-inverso PKC (19-31) (RIP_{Ala}):

Ac-DVal-DAsn-DLys-DGln-DArg-DLeu-**DAla**-Gly-DLys-DArg-DAla-DPhe
-DArg-NH₂

* Rétro-inverso [Ser²⁵] PKC (19-31) (RIP_{Ser}):

Ac-DVal-DAsn-DLys-DGln-DArg-DLeu-**DSer**-Gly-DLys-DArg-DAla-DPhe
-DArg-NH₂

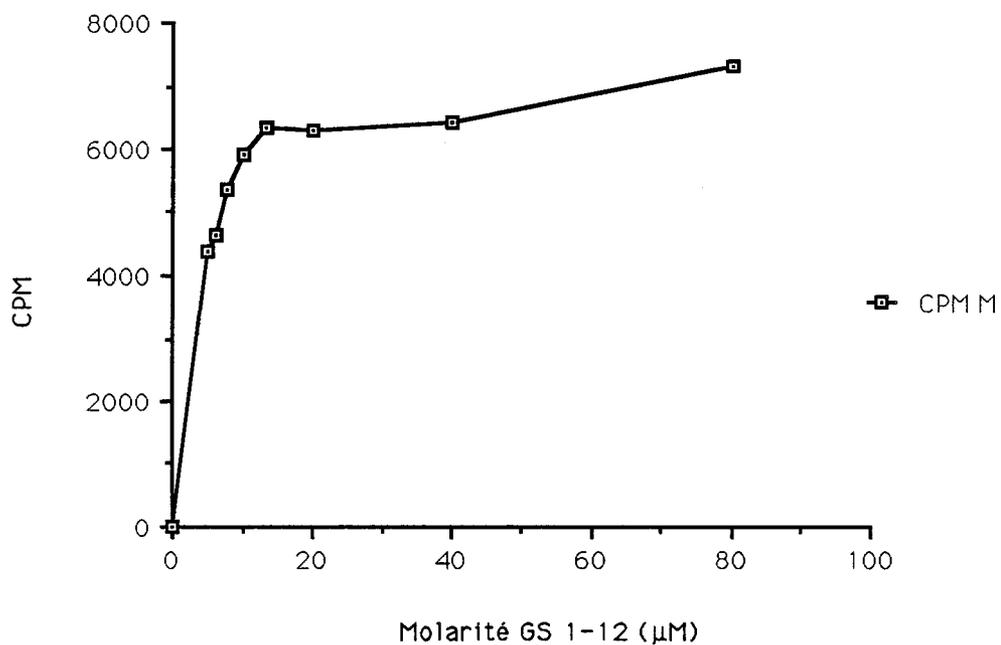


FIGURE 29 Phosphorylation du peptide "GS (1-12)" par la PKC

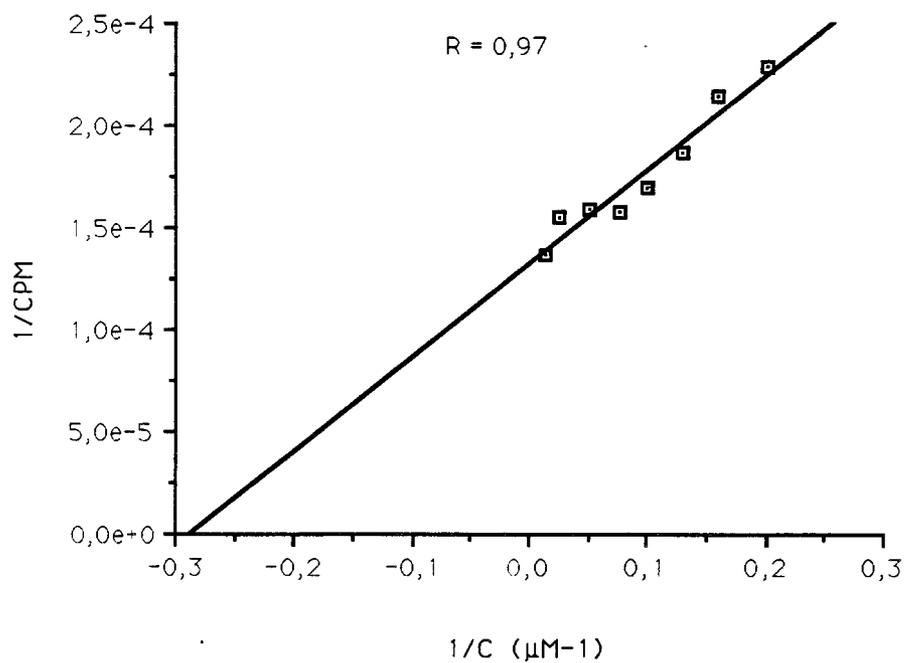


FIGURE 30 Détermination du K_m de "GS (1-12)" vis à vis de la PKC

Les rétro-inverso peptides ont été synthétisés sur benzhydrylamine résine afin d'obtenir une extrémité C-terminale amide, et acétylés en N-term. Dans ces conditions, il n'apparaît pas aux extrémités du peptide, de charges susceptibles d'interférer avec son activité biologique.

La comparaison de l'activité inhibitrice de P_{ALa} et de RIP_{ALa}, devait fournir de plus amples informations sur l'importance des liaisons peptidiques dans la reconnaissance peptide / PKC.

Le peptide RIP_{Ser} pouvait adopter différents comportements:

1- être substrat de la PKC; ce phénomène était peu probable car nous avons vu précédemment que la forme rétro-inverso du meilleur substrat publié par Pinna n'était pas phosphorylée par la PKC.

2- être inhibiteur de la PKC, sans subir de phosphorylation; dans ce cas il devenait intéressant de comparer son activité à celle des deux peptides précédents pour juger, d'une part s'il était possible de reproduire ou de dépasser l'activité du peptide naturel, et d'autre part si le résidu sérine offrait réellement un gain d'affinité par rapport à l'alanine.

3- être inactif.

1.3.2- Etude du substrat [Ala^{9,10}, Lys^{11,12}]GS(1-12)

Afin de tester les peptides dans des conditions analogues à celles publiées par HOUSE (1987), nous avons préparé et étudié le substrat [Ala^{9,10}, Lys^{11,12}] GS(1-12), que nous symboliserons "GS (1-12)".

Séquence: Pro-Leu-Ser-Arg-Thr-Leu-Ser-Val-Ala-Ala-Lys-Lys

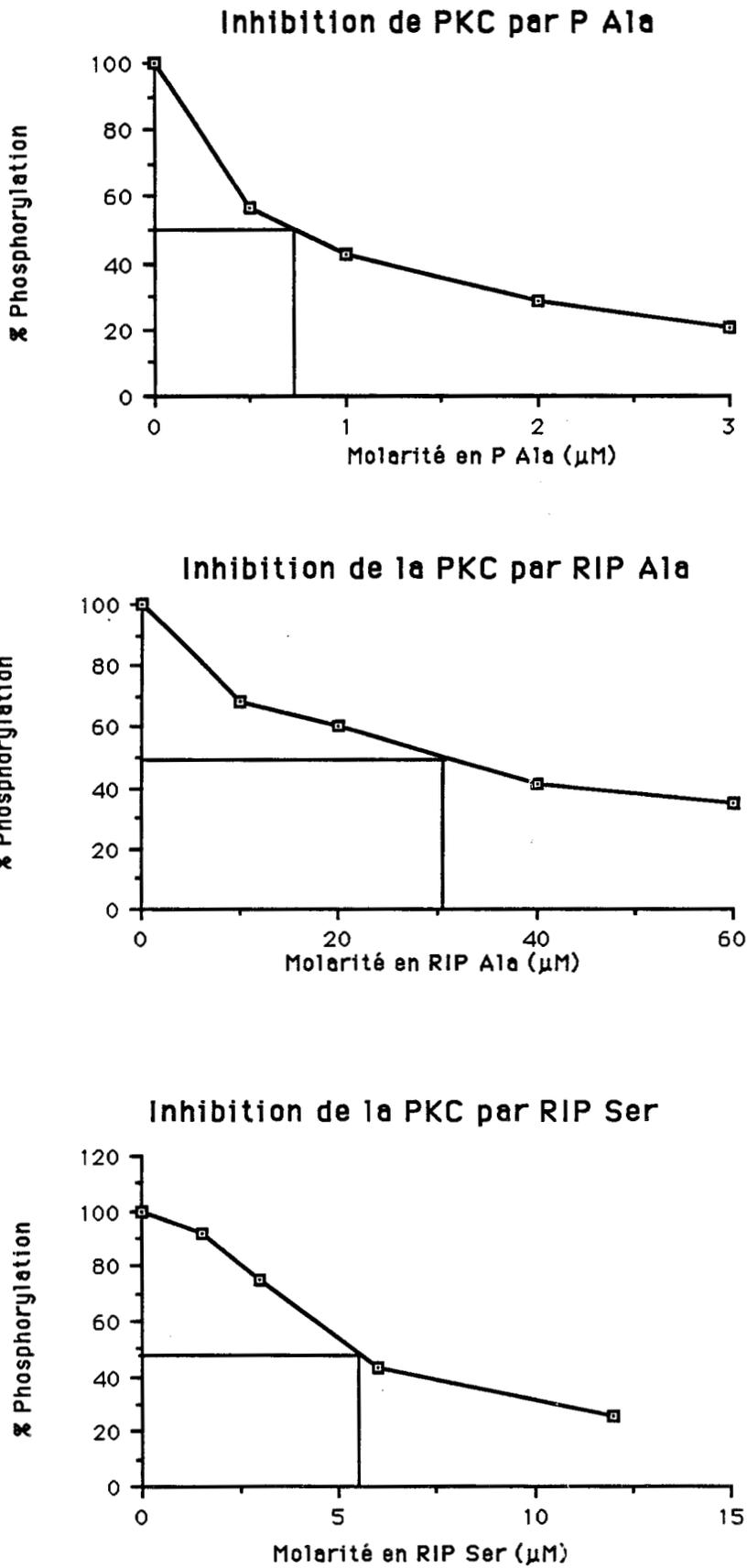


FIGURE 31 Détermination des IC_{50} du pseudosubstrat et de ses analogues rétro-inverso

Ce peptide est phosphorylé par la PKC avec un Km de 3,6 μM (Figures 29 et 30). Pour les tests d'inhibition nous avons utilisé ce peptide à la concentration de 12 μM , compromis entre une concentration permettant une incorporation de phosphate suffisante pour obtenir des valeurs d'inhibition significatives, et une concentration inférieure à la saturation.

1.3.3- Résultats

* Phosphorylation de RIP_{Ser}

Le substrat potentiel RIP_{Ser}, n'est pas phosphorylé par la PKC; cela confirme le phénomène que nous avons observé précédemment: la modification du squelette peptidique par inversion des fonctions amides interdit toute phosphorylation par la PKC.

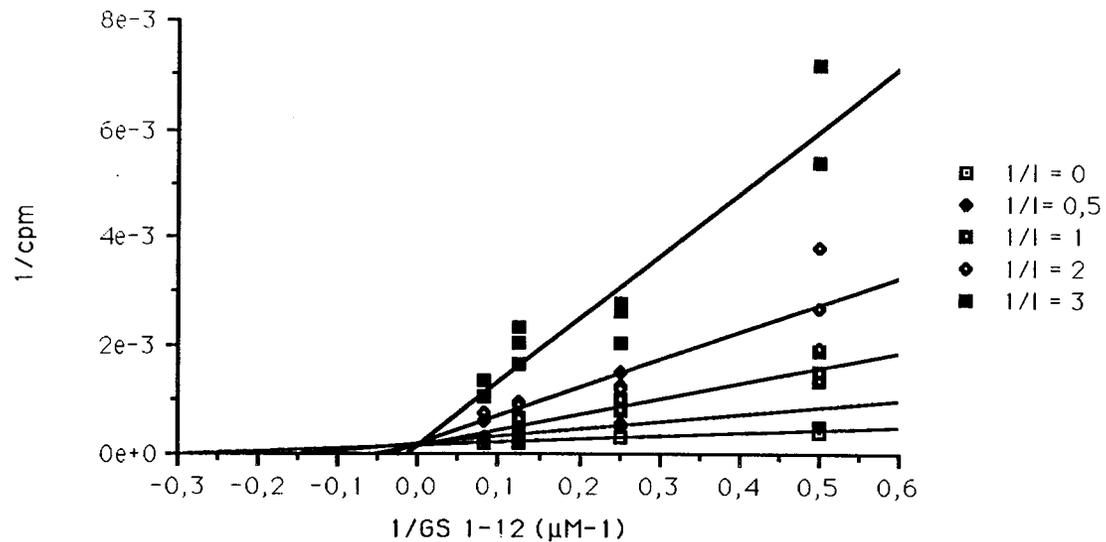
* Activité comparée des trois peptides (Figure 31)

RIP_{Ala} n'étant pas substrat, nous avons pu le tester en tant qu'inhibiteur sans nécessité de séparer après réaction l'inhibiteur et le substrat témoin. Les IC₅₀ des trois peptides évaluées sur "GS (1-12)" sont les suivantes:

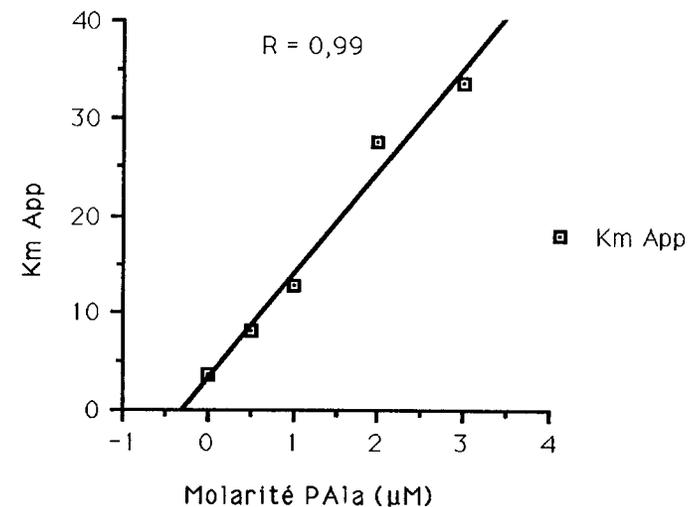
- P_{Ala}: 0,75 μM
- RIP_{Ala}: 31 μM
- RIP_{Ser}: 5,5 μM

La comparaison des activités inhibitrices nous fournit d'autres enseignements sur le mode d'interaction peptide/enzyme: L'activité de RIP_{Ala} est inférieure d'un facteur 40 à celle du

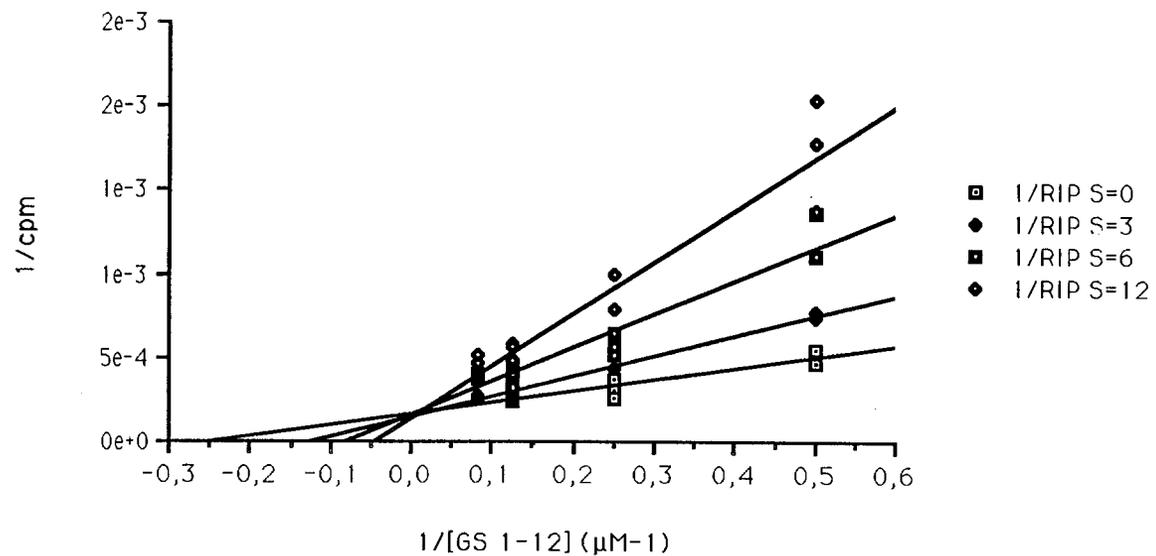
Compétition PAla/GS 1-12



Ki de PAla



Compétition RIPSer/GS 1-12



Ki de RIPSer

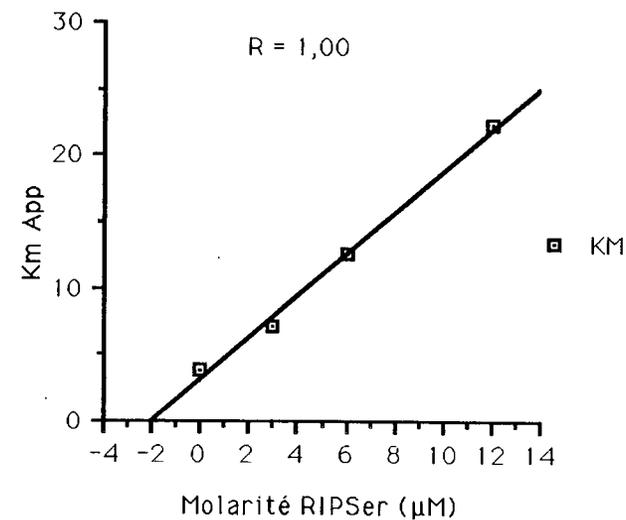


FIGURE 32 Détermination du mode d'inhibition et du K_i des peptides P_{Ala} et RIP_{Ala} par la méthode en double inverse

peptide naturel. Cela signifie que les liaisons peptidiques, en plus de leur intervention dans la réaction de phosphorylation, jouent un rôle fondamental dans la reconnaissance enzyme/peptide. La seule présence d'amino-acides à chaîne latérale basique n'est pas suffisante pour obtenir une bonne affinité.

L'activité de RIP_{Ser} montre que le résidu phosphorylable, même s'il ne peut être modifié par l'enzyme, a une influence notable sur l'affinité; le simple remplacement de l'alanine par la sérine fait chuter l' IC_{50} d'un facteur 6. Toutefois, ce peptide reste moins actif que le peptide naturel.

Comme dans le cas de P_{Ala} , les deux rétro-inverso peptides se sont révélés inactifs sur la phosphorylation des histones par la PKC. De même, nous avons réalisé des tests d'inhibition de la PKA en utilisant un substrat protéique: les histones, ou un substrat peptidique: le Kemptide (KEMP 1977). Nous n'avons observé aucune inhibition quels que soient le substrat et l'inhibiteur étudiés.

* Mode d'inhibition - Evaluation du K_i . (Figure 32)

Nous avons effectué des tests de compétition inhibiteur/GS 1-12.

Le traitement des résultats selon la représentation en double inverse a fourni des courbes caractéristiques d'une inhibition compétitive pour les peptides P_{Ala} et RIP_{Ser} . En dépit de l'inversion du squelette peptidique, le peptide RIP_{Ser} présente donc la capacité d'interagir avec la PKC au même site que l'analogue P_{Ala} . Pour le peptide RIP_{Ala} , nous n'avons pas obtenu de résultat permettant de déduire le mode d'action de cet inhibiteur.

Les valeurs de K_i déduites de ces résultats sont les suivantes:

P_{Ala} 0,27 μM

RIP_{Ser} 2,0 μM

* Résistance enzymatique

Les peptides P_{Ala} et RIP_{Ala} ont subi une digestion enzymatique par la trypsine d'une part, et la pronase d'autre part (mélange d'endo- et d'exopeptidases). Dans les deux cas, alors que le peptide naturel P_{Ala} était dégradé en moins d'une heure, le peptide RIP_{Ala} était toujours intact après 18 heures d'incubation. Ces résultats prouvent que la demi-vie en milieu biologique d'un peptide rétro-inverso est nettement supérieure à celle d'un peptide naturel. Il est donc envisageable d'utiliser ce type d'inhibiteur spécifique de la PKC et compétitif vis à vis des substrats peptidiques, dans des tests sur cellules; l'impossibilité pour une molécule aussi hydrophile de traverser les membranes, devrait être palliée par l'introduction directe du peptide dans la cellule par microinjection.

1.3.4- Conclusion

L'affinité de la PKC pour les peptides est liée à la présence de différents éléments:

- 1 - déterminants positifs de reconnaissance: amino-acides à chaîne latérale basique
- 2 - liaisons peptidiques orientées selon l'ordre biologique
- 3 - résidu phosphorylable

Le premier élément est indispensable à l'apparition de l'affinité enzyme/peptide alors que les deux autres éléments modulent cette affinité.

Ces différents critères doivent être pris en compte pour assurer une bonne affinité, lors de la conception d'inhibiteurs spécifiques. Cependant, la présence des trois éléments favorables à la reconnaissance induit un comportement de substrat. Il faut donc adjoindre à la structure d'un substrat, un élément qui inhibe sa propre phosphorylation. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes tournés vers des inhibiteurs de type bisubstrat, c'est à dire susceptibles de se fixer simultanément sur le site de reconnaissance des peptides (ou protéines) et sur le site de reconnaissance de l'ATP. Un tel inhibiteur serait par conséquent, constitué d'une partie peptidique analogue d'un bon substrat, et d'une partie non peptidique présentant une analogie avec l'ATP. Plusieurs avantages peuvent être tirés de ce type de molécule:

- l'affinité peptide/protéine est optimale car il s'agit d'un substrat réunissant tous les critères de reconnaissance,
- la partie analogue de l'ATP interdit toute phosphorylation du substrat,

- la réunion des deux parties actives devrait accroître l'affinité globale de la molécule pour deux raisons:

- * d'une part un gain d'énergie de liaison,

- * d'autre part une entropie résultante inférieure à la somme des entropies des deux molécules séparées. En effet, la probabilité pour les deux substrats d'être placés de manière favorable est augmentée, cette différence de désordre à l'échelle moléculaire entre bisubstrat et molécules séparées correspond à une économie d'énergie pour le système.

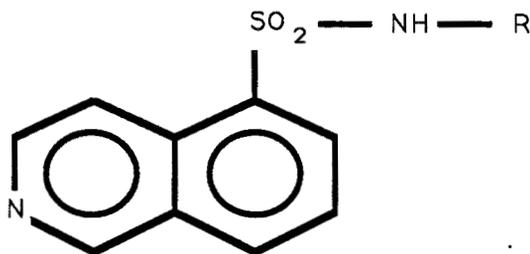
2) ELABORATION DE STRUCTURES BISUBSTRAT

Cette étude a été réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps nous avons repris le modèle d'un inhibiteur de protéine kinase compétitif vis à vis du site ATP (H7), et greffé sur un substrat peptidique une partie de la molécule qui pouvait être facilement fonctionalisée. Cela devait nous permettre d'évaluer si la présence dans le site actif d'une fraction de l'inhibiteur ATP se traduisait par un gain d'affinité. En parallèle, nous avons recherché un analogue de H7 conservant son activité inhibitrice originelle malgré l'introduction d'une fonction carboxylique permettant sa fixation sur le peptide. Cet analogue pourrait alors être greffé sur la structure optimale définie dans la première étape.

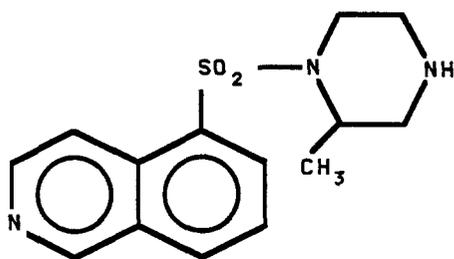
Les composés non peptidiques dérivés de H7 ont été préparés par Christian Sergheraert à l'Institut Pasteur de Lille; leur synthèse est détaillée dans la partie expérimentale.

2.1-Définition du modèle susceptible de se fixer sur le site ATP

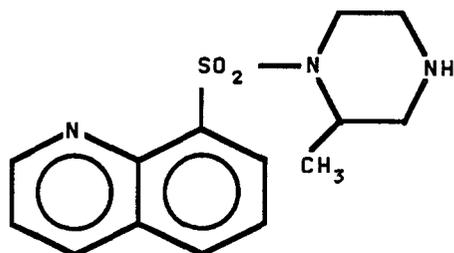
Les inhibiteurs de protéine kinase C actuellement utilisés sont des dérivés 5-isoquinoléine sulfonamide de type:



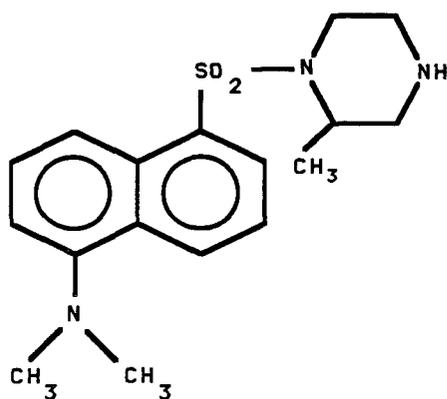
5-isoquinoléine sulfonamide



(5-isoquinoline sulfonyl)-2méthyl pipérazine (H7)



1(8-quinoline sulfonyl)-2méthyl pipérazine



1-Dansyl-2-méthyl pipérazine

FIGURE 33 Structure des analogues de H7

Les dérivés actifs sont caractérisés par une chaîne R présentant une fonction amine séparée du sulfonamide par un chaînon à deux carbones; les composés les plus actifs correspondent à $R = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ et à la structure sulfonylpipérazine (éventuellement substituée) (HIDAKA 1984).

Ces composés sont compétitifs avec l'ATP, mais leur défaut majeur est l'absence de spécificité; leur activité vis à vis de la PKA et la PKG est supérieure à celle observée pour la PKC. Par exemple, le composé H7 1(5-isoquinoléine sulfonyl), 2-méthyl pipérazine est le meilleur inhibiteur de PKC avec un K_i de $6,0 \mu\text{M}$, son K_i vis à vis de PKA et PKG est de $3,0$ et $5,8 \mu\text{M}$ respectivement. Ce manque de spécificité n'est pas surprenant étant donné que la compétition s'effectue vis à vis d'un substrat commun aux trois kinases.

Le noyau isoquinoléine semble régir la spécificité vis à vis de ces protéines kinases. Sa substitution par un chloronaphtalène fournit un bon inhibiteur de la protéine kinase dépendante de la calmoduline, mais qui ne présente plus qu'une faible activité vis à vis des trois kinases précédentes (HIDAKA 1984).

Nous avons préparé deux autres analogues de H7 dans lesquels le noyau 5-isoquinoléine était substitué par une autre structure aromatique (Figure 33):

- * la quinoléine fonctionnalisée en 8 permettait d'évaluer l'influence de la position de l'azote dans le cycle
- * le 5 (diméthylamino) naphtalène permettait de juger si la seule présence d'un azote à l'extérieur du cycle était suffisante pour maintenir l'activité.

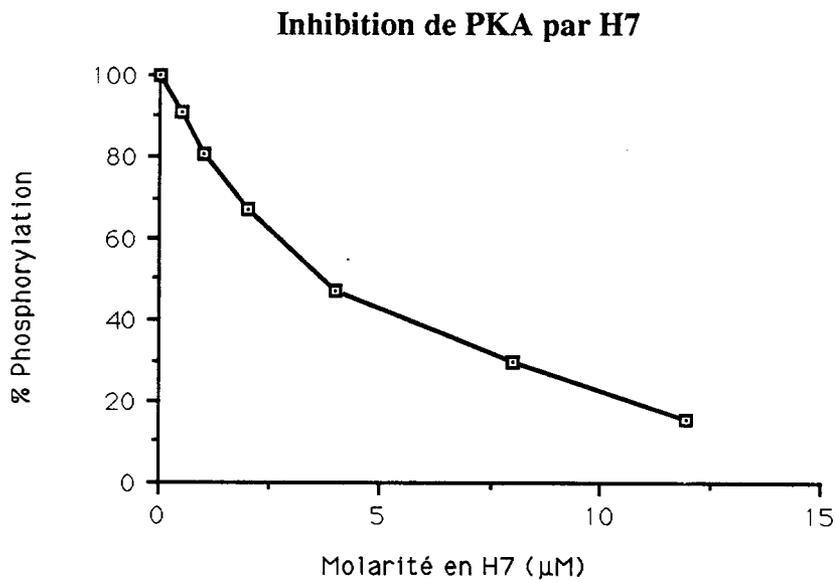
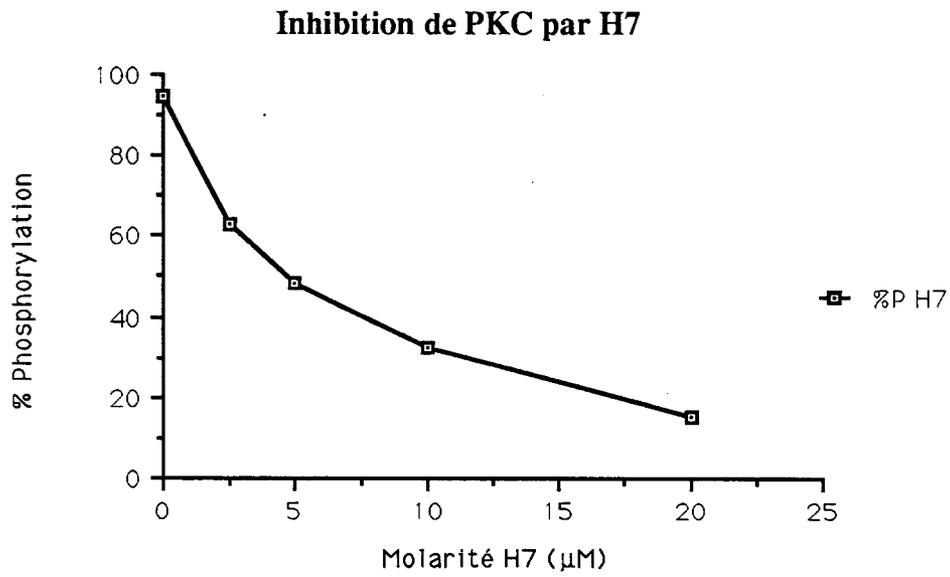


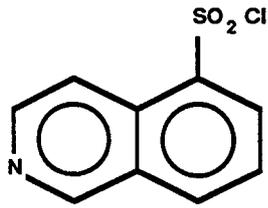
FIGURE 34 Détermination de l'IC₅₀ de l'inhibiteur H7 vis à vis de la PKC et de la PKA

* Activité inhibitrice

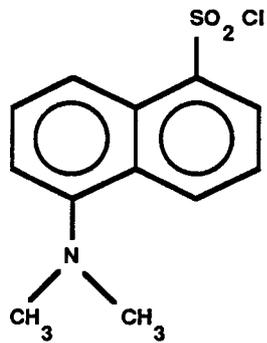
Le témoin H7 présente une IC₅₀ de 6 µM vis à vis de la PKC et de 3,5 µM vis à vis de la PKA (Figure 34). Par contre les deux analogues préparés sont totalement inactifs sur ces deux enzymes. Cela confirme l'importance du noyau 5-isoquinoléine dans l'activité de ces inhibiteurs compétitifs de l'ATP.

2.2- Préparation de structures mixtes 5-isoquinoléine -polyarginine

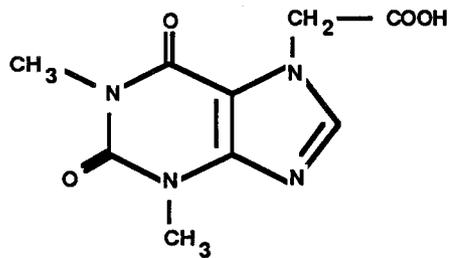
Nous venons de voir que le noyau 5-isoquinoléine était crucial dans l'activité d'un inhibiteur de type H7. C'est pourquoi dans la première partie de notre étude, nous avons utilisé le noyau 5-isoquinoléine sulfonyle en complément d'une structure peptidique répondant aux critères de reconnaissance par la PKC, dans le but d'obtenir un inhibiteur bisubstrat. La fonctionnalisation de l'isoquinoléine sous forme de sulfochlorure, permettait l'accès rapide au sulfonamide par fixation en N-term d'un peptide; de plus la stabilité de ce composé nous permettait de réaliser l'ensemble de la synthèse en phase solide. Le positionnement de la partie peptidique dans le site actif de l'enzyme était susceptible d'amener l'isoquinoléine à proximité du site de fixation de l'ATP et par conséquent d'accroître l'activité inhibitrice.



5-isoquinoléine sulfochlorure



Chlorure de Dansyl



Acide théophylline acétique

FIGURE 35 Structures greffées en N-term de Arg6

2.2.1- Ebauche d'une structure bisubstrat

Le premier modèle peptidique utilisé est l'enchaînement Arg₆. Nous avons greffé en N-term de ce peptide, trois structures bicycliques présentant au moins un atome d'azote:

- la 5-sulfonyl isoquinoléine
- le groupement dansyl (5-diméthylamino naphthalène sulfonyl)
- le noyau théophylline

Ces composés ont été amenés respectivement sous-forme de 5-isoquinoléine sulfochlorure, chlorure de dansyl et acide théophylline acétique (Figure 35) et couplés à la résine P-Arg₆ en phase solide (cf partie expérimentale).

* Activité inhibitrice

Les dérivés 5-isoquinoléine sulfonyl-Arg₆ (Isoq-SO₂-Arg₆) et dansyl-Arg₆ se sont révélés plus actifs que le dérivé théophylline-Arg₆ dont l'IC₅₀ vis à vis de la PKC est supérieure à 80 μM. Nous avons comparé ces deux premiers composés au peptide Gly-Ser-Arg₆. Les IC₅₀ obtenues sont les suivantes:

	PKA	PKC
Isoq-SO ₂ -Arg ₆	34 μM	(67 μM)
Dansyl-Arg ₆	26 μM	45 μM
Gly-Ser-Arg ₆	40 μM	≥ 70 μM

Les deux inhibiteurs substitués par une structure aromatique se

sont révélés un peu plus actifs que le peptide Gly-Ser-Arg₆; cependant l'inhibition était inférieure à celle que l'on pouvait attendre d'un bisubstrat, et nous ne pouvions pas conclure que la structure aromatique avait une réelle influence sur l'activité. D'autre part, nous n'observions aucune ébauche de spécificité, puisque l'inhibition était plus importante sur la PKA. Ces composés constituaient une première approche dans l'étude des bisubstrats, plusieurs éléments restaient à améliorer:

- accroissement de l'affinité et de la spécificité par utilisation d'un substrat peptidique susceptible se positionner de façon plus stricte dans le site actif (présence d'un résidu phosphorylable),
- optimisation de la distance séparant le substrat peptidique du substrat "nucléotidique", de manière à favoriser l'accès simultané des deux substrats à leur site respectif.

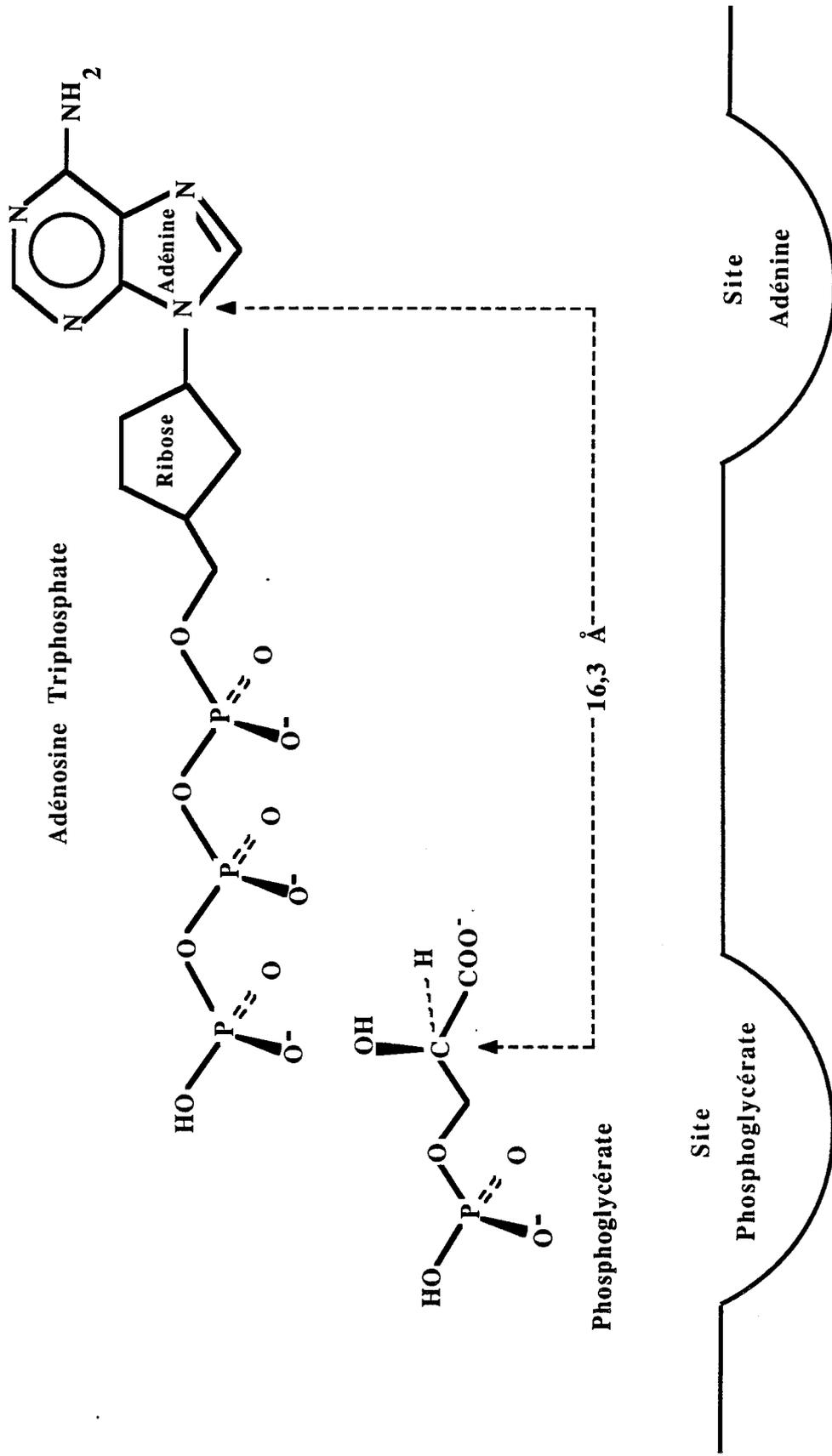


FIGURE 36 Représentation schématique du site actif de la phosphoglycérate kinase

2.2.2- Optimisation de la structure d'un bisubstrat

De façon générale, les enzymes d'une même famille présentent de nombreuses analogies fonctionnelles en dépit de substrats très différents. Nous avons postulé que dans la famille des kinases, lors de la réaction de transfert de phosphate, la distance séparant l'hydroxyle phosphorylable du substrat et la molécule d'ATP était constante. Nous avons utilisé le modèle de la phosphoglycérate kinase, dont la structure cristalline avait été déterminée en présence des deux substrats: phosphoglycérol et ATP (BRYAN 1974). L'étude tridimensionnelle du site catalytique réalisée par modélisation moléculaire dans le Laboratoire de G. Vergoten à la Faculté de Médecine de Lille, a permis d'évaluer la distance séparant le carbone portant l'hydroxyle phosphorylable et l'azote de l'adénine lié au ribose, à environ 16,3 Å (Figure 36). Dans l'optique d'un bisubstrat, il nous fallait donc relier par un bras de cette longueur, le résidu sérine et le noyau isoquinoléine mimant l'adénine. Le bras a été constitué à partir de résidus β alanines (β Ala = $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) dont l'emploi est aisé en synthèse peptidique en phase solide. D'après la modélisation moléculaire, deux de ces résidus devaient nous permettre de couvrir une distance proche de la valeur théorique.

D'après le modèle précédent, le meilleur candidat devenait donc la structure:



Nous avons utilisé le motif $n = 4$ arginines, afin d'évaluer si la présence de l'isoquinoléine à une distance optimale compenserait la perte de deux arginines, et d'autre part dans le but de nous

affranchir à terme de la structure polyarginine.

Nous avons préparé plusieurs analogues dans lesquels nous avons fait varier les paramètres susceptibles d'influencer l'activité inhibitrice:

- structure aromatique bicyclique: 5-isoquinoléine ou dansyl
- distance séparant les deux "substrats" (bras): 2 β Ala ou 4 β Ala
- résidu phosphorylable permettant un bon positionnement du substrat peptidique dans le site actif: Ser ou Ala.
- nombre de résidus arginines: 4 ou 6.

Les composés préparés sont les suivants:



Dansyl — β Ala — β Ala — Ser — Arg-Arg-Arg-Arg

Dansyl — β Ala — β Ala — Ala — Arg-Arg-Arg-Arg

Dansyl — β Ala — β Ala — β Ala — β Ala — Ser — Arg-Arg-Arg-Arg

Isoquinoléine SO₂ — β Ala — β Ala — Ser — Arg-Arg-Arg-Arg

Isoquinoléine SO₂ — β Ala — β Ala — Ala — Arg-Arg-Arg-Arg

Isoquinoléine SO₂ — β Ala — β Ala — β Ala — β Ala — Ser — Arg-Arg-Arg-Arg

Isoquinoléine SO₂ — β Ala — β Ala — Ser — Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

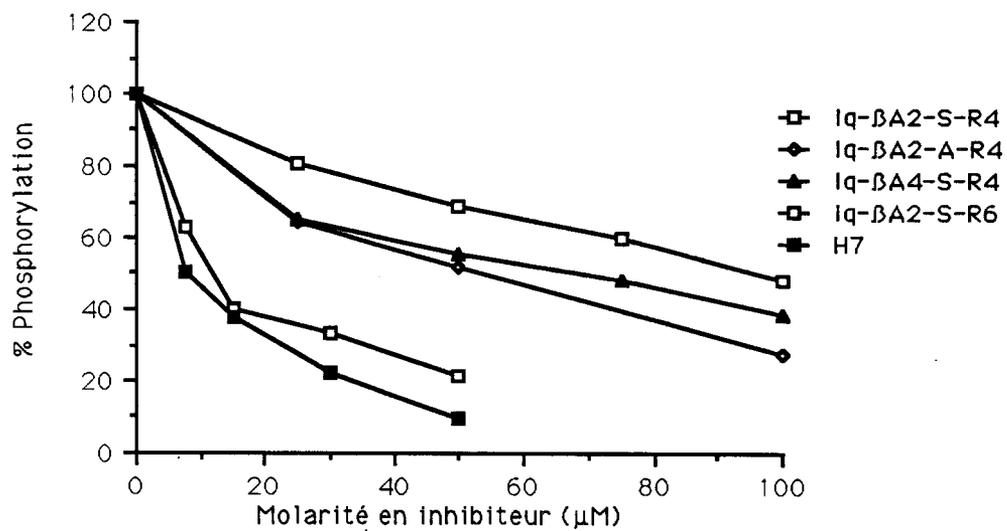


FIGURE 37 Activité inhibitrice comparée de H7 et des bisubstrats potentiels à structure "5-isoquinoléine-sulfonyle" vis à vis de la PKC

RESULTATS

2.2.2.1- Activité comparée des différents analogues

L'activité des analogues a été testée vis à vis de la PKC et de la PKA sur leurs substrats respectifs (histones IIIS et IIA). Les IC₅₀ moyennes obtenues sont détaillées dans le Tableau .

INHIBITEUR	IC ₅₀ (µM)	
	PKC	PKA
Dansyl-βAla ₂ -Ser-Arg ₄	> 75	> 75
Dansyl-βAla ₂ -Ala-Arg ₄	> 75	> 75
Dansyl-βAla ₄ -Ser-Arg ₄	> 75	> 75
Isoq-SO ₂ -βAla ₂ -Ser-Arg ₄	48	1,2
Isoq-SO ₂ -βAla ₂ -Ala-Arg ₄	48	1,2
Isoq-SO ₂ -βAla ₄ -Ser-Arg ₄	> 75	1,2
Isoq-SO ₂ -βAla ₂ -Ser-Arg ₆	7	0,30
H7	6	3,5

TABLEAU 15: IC₅₀ des bisubstrats potentiels et du témoin H7

Contrairement à ce que nous avons observé pour les "bisubstrats" de type Aryl-Arg₆, nous remarquons ici une très nette différence d'activité entre les composés à dansyl et à isoquinoléine. Quelle que soit l'enzyme étudiée, les composés à dansyl sont très peu actifs et leur IC₅₀ est toujours supérieure à 75 µM (gamme de concentration testée), indépendamment du résidu cible et de l'espaceur utilisé.

A l'inverse, la partie peptidique module plus nettement l'activité inhibitrice des composés à isoquinoléine:

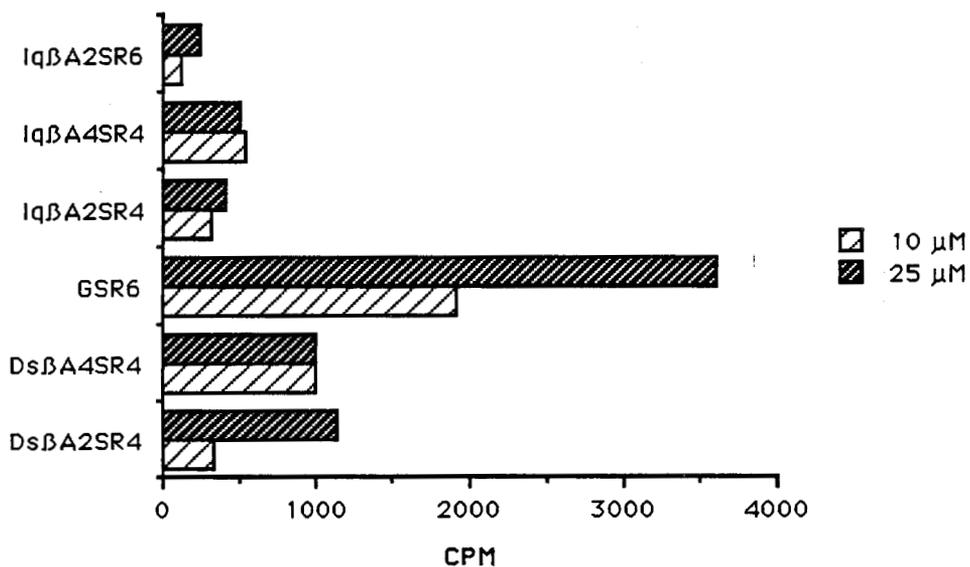


FIGURE 38 Phosphorylation des inhibiteurs contenant une Sérine

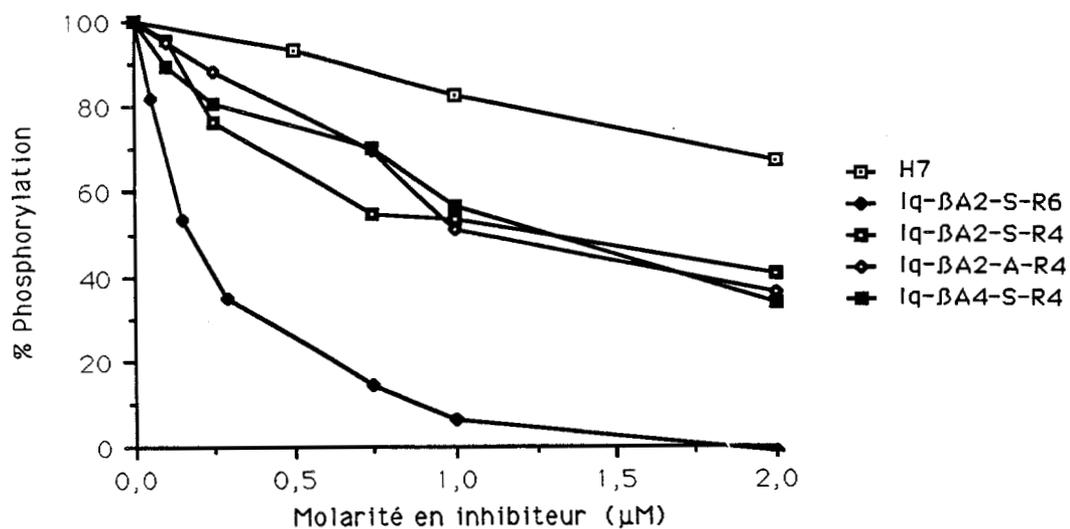


FIGURE 39 Activité inhibitrice comparée de H7 et des bisubstrats potentiels à structure "5-isoquinoléine-sulfonyle" vis à vis de la PKA

* Inhibition de la PKC (Figure 37)

- L'allongement de l'espaceur provoque une augmentation de l'IC₅₀, suggérant que la longueur préalablement déterminée par modélisation moléculaire permet un bon positionnement de l'inhibiteur.
- La nature du résidu cible n'a pas d'influence notable sur l'activité. Ce résultat va à l'encontre de l'observation précédente; en effet si la partie peptidique était bien placée, dans le site actif, la présence d'un résidu phosphorylable devrait comme nous l'avons observé pour les analogues du pseudosubstrat, accroître le pouvoir d'inhibition.
- Le nombre d'arginines reste l'élément le plus déterminant pour l'activité inhibitrice; l'addition de 2 résidus au peptide Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₄ fait chuter l'IC₅₀ de 48 à 7 μM, valeur proche de celle de H7. La séquence βAla₂-Ser-Arg₆ permet donc de compenser l'absence de la méthyl-2-pipérazine présente dans la structure de H7.

Les inhibiteurs présentant une sérine comme résidu cible ont été testés en tant que substrats de la PKC. Comparés au peptide Gly-Ser-Arg₆, il se sont révélés de médiocres substrats (Figure 38). Les dérivés à dansyl montrent une phosphorylation légèrement supérieure à celle des dérivés à isoquinoléine. Cela confirme la supériorité de l'isoquinoléine déjà observée. D'autre part, l'absence de phosphorylation des inhibiteurs prouve que même si leur structure peptidique est reconnue en tant que substrat, la réaction de transfert est inhibée par la seconde partie de la molécule.

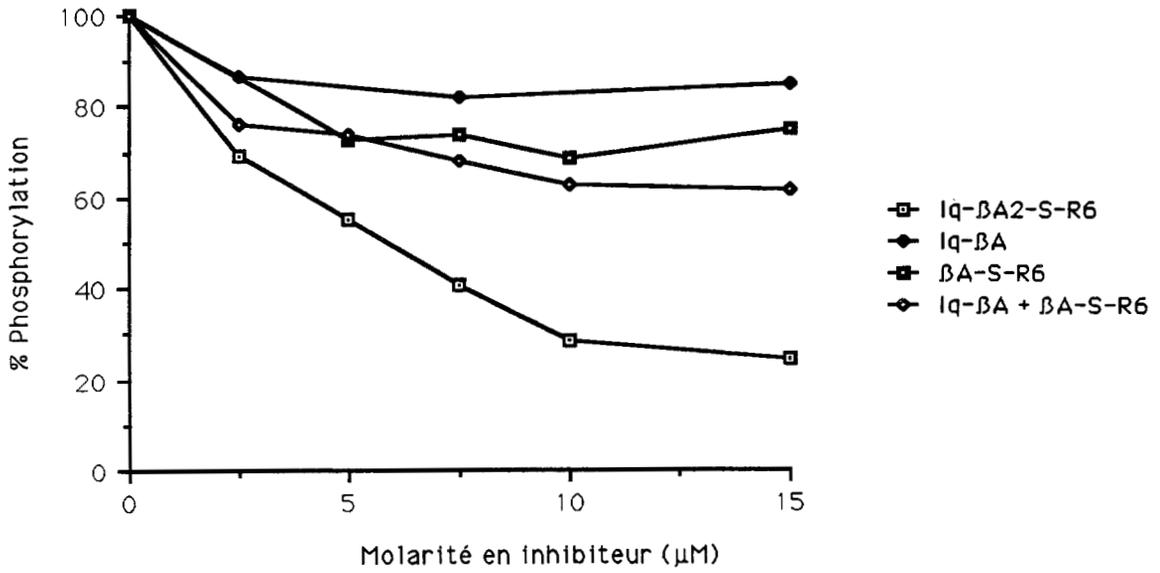


FIGURE 40 Inhibition de la PKC par Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ et les deux demi-molécules Isoq-SO₂-βAla et βAla-Ser-Arg₆, seules ou en mélange

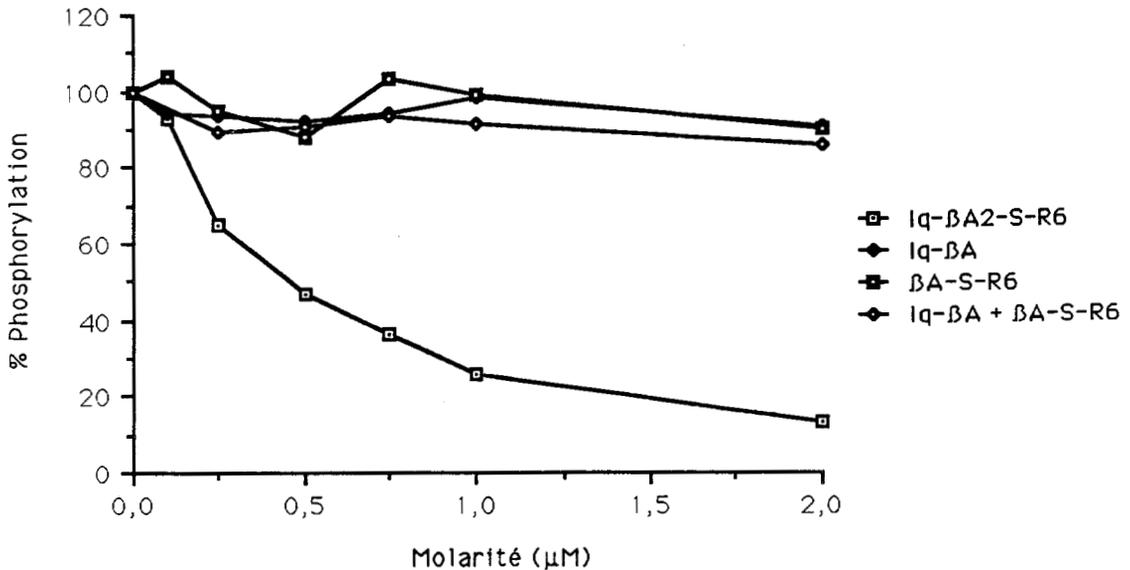


FIGURE 41 Inhibition de la PKA par Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ et les deux demi-molécules Isoq-SO₂-βAla et βAla-Ser-Arg₆, seules ou en mélange

* Inhibition de la PKA (Figure 39)

A notre surprise, les inhibiteurs construits sur le modèle d'un substrat de la PKC, se sont montrés beaucoup plus actifs vis à vis de la PKA, avec des IC₅₀ dans la gamme du micromolaire. Dans ce cas, nous n'avons pas observé de différence entre les trois analogues contenant quatre arginines, mais de même que pour la PKC, l'addition de 2 arginines s'est traduite par un gain d'affinité. Le peptide Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ est beaucoup plus actif que H7, avec une IC₅₀ 16 fois inférieure. Le remplacement de la méthyl-2-pipérazine par βAla₂-Ser-Arg₆ apparaît beaucoup plus favorable pour l'inhibition de la PKA que pour celle de la PKC.

2.2.2.2- Mode d'action de Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ - Evaluation du Ki

Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ étant le composé le plus intéressant de la série, nous l'avons étudié plus en détail. Afin de nous assurer que la réunion des 2 substrats dans une seule molécule était bien responsable de l'inhibition observée, nous avons comparé l'activité de la molécule complète à celle des 2 substrats séparés puis en mélange, pour juger s'il n'y avait pas d'effet synergique entre les 2 molécules. Nous avons testé:

- * Isoq-SO₂-βAla-βAla-Ser-Arg₆
- * βAla-Ser-Arg₆
- * Isoq-SO₂-βAla
- * Isoq-SO₂-βAla + βAla-Ser-Arg₆ (rapport molaire 1/1)

Le composé Isoq-SO₂-βAla a été utilisé sous forme d'ester méthylique afin d'éviter l'ionisation de la fonction carboxylique. Les quatre combinaisons précédentes ont été testées sur la PKC et

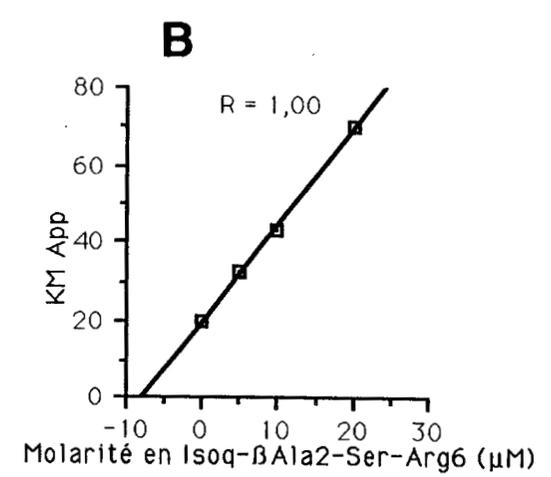
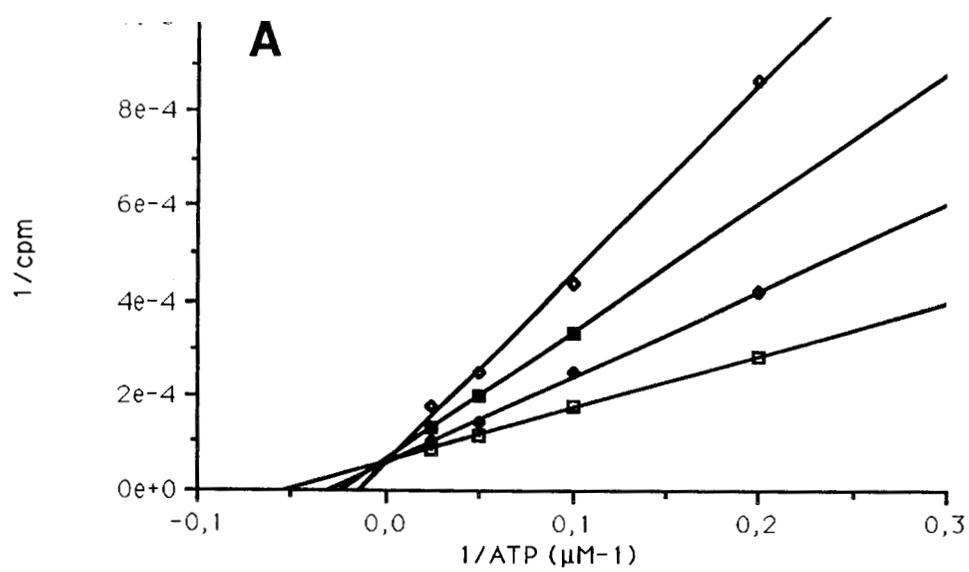


FIGURE 42 Compétition Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆/ATP (A) Détermination du K_i pour la PKC (B)

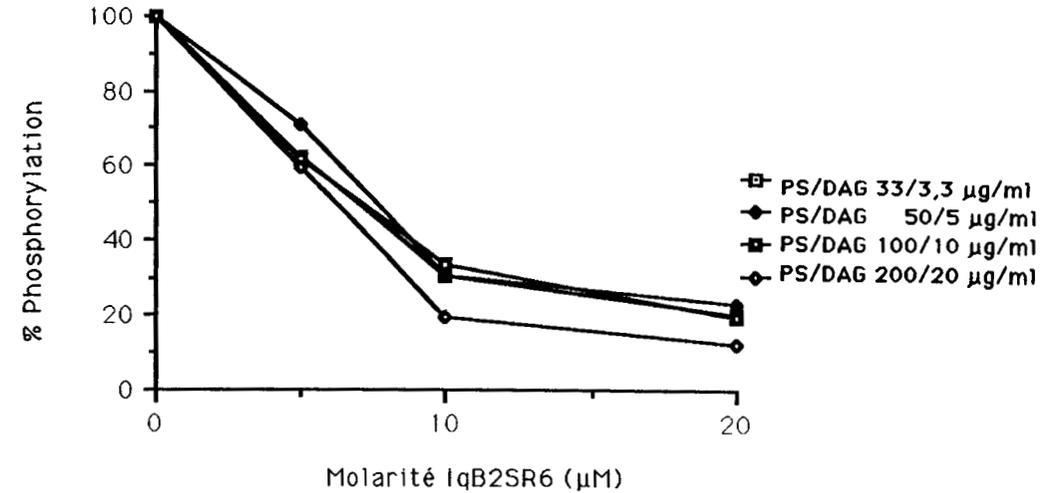
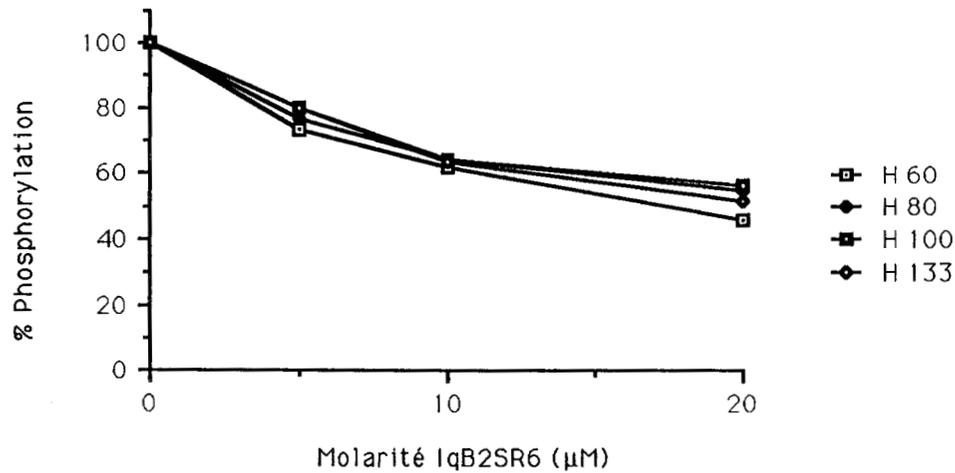


FIGURE 43 Activité inhibitrice de Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ testée pour différentes concentrations en Histones IIIS: 60 / 80 / 100 / 133 µg/ml

FIGURE 44 Activité inhibitrice de Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ testée pour différentes concentrations en phospholipides: PS (DAG) en µg/ml: 30 (3,3) / 50 (5) / 100 (10) / 200 (20)

la PKA. Dans les deux cas les 2 demi-molécules séparées ou en mélange sont très faiblement actives comparées. à Isoq-SO₂-βAla-βAla-Ser-Arg₆ (Figures 40 et 41). La simple liaison colalente entre les 2 molécules permet donc de faire apparaître une activité inhibitrice. Nous avons alors tenté de déterminer le mode d'action de cet inhibiteur.

* Mode d'inhibition de la PKC

Nous avons effectué des compétitions avec les deux substrats de l'enzyme: histones / ATP, et avec les phospholipides.

- La variation de l'inhibition en fonction de la concentration en ATP a été étudiée selon la méthode en double inverse. Nous avons obtenu des courbes caractéristiques d'une inhibition compétitive. (Figure 42) Les différentes valeurs de Km obtenues pour l'ATP en fonction de la concentration en inhibiteur nous ont permis d'évaluer le Ki à 7,5 μM.

- Les résultats obtenus pour la compétition avec le substrat histones sont difficiles à interpréter. La représentation en double inverse n'a pas fourni de courbes caractéristiques. L'augmentation de la concentration en histones n'a pas permis de lever l'inhibition (Figure 43); ceci peut suggérer que l'inhibiteur agit sur un autre site que celui de la fixation des histones. Cependant, il se pourrait que la partie de l'inhibiteur compétitive avec l'ATP le maintienne dans le site actif et masque une réelle compétition avec les histones.

- La compétition avec les phospholipides a été étudiée pour un mélange de phospholipides contenant une proportion PS/DAG constante, de 10/1 (p/p). Cette compétition a montré pour différentes concentrations en inhibiteur que le taux d'inhibition

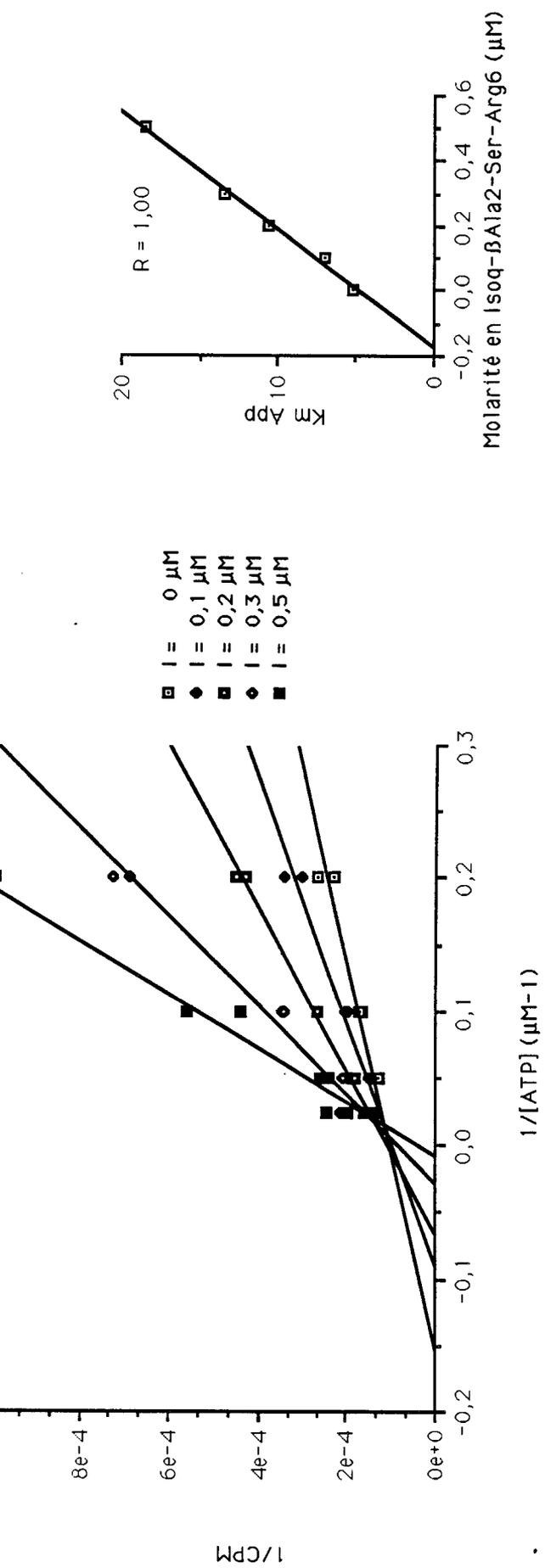


FIGURE 45 Compétition Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆/ATP (A) Détermination du Ki pour la PKA (B)

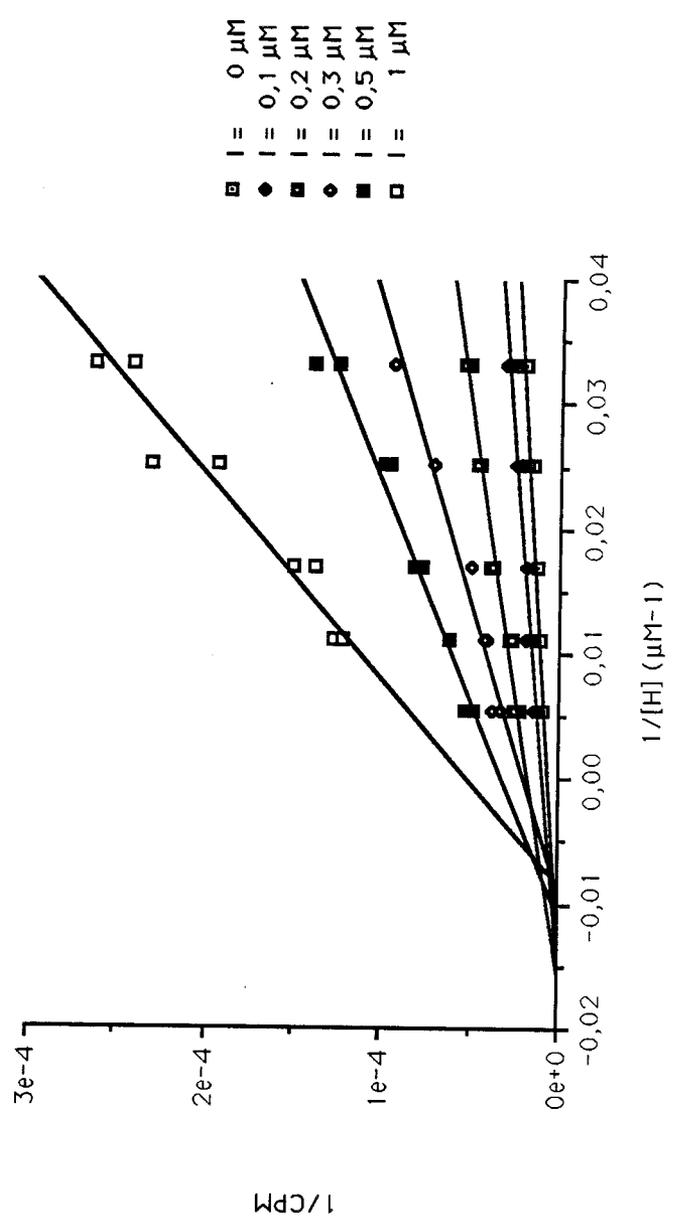


FIGURE 46 Compétition Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆/Histones IIA

était indépendant de la concentration en phospholipides (Figure 44).

* Mode d'inhibition de la PKA

Nous avons réalisé des tests de compétition avec l'ATP et les histones.

- Comme dans le cas de la PKC, l'inhibiteur s'est montré compétitif vis à vis de l'ATP. De la même manière, nous avons évalué le K_i à 170 nM (Figure 45).

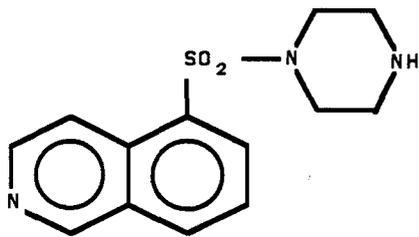
- La compétition vis à vis des histones nous a posé les mêmes problèmes que précédemment. La représentation en double inverse nous a fourni des courbes suggérant une inhibition non compétitive (Figure 46). Cependant, nous devons émettre les mêmes restrictions que pour la PKC, d'autant plus que l'affinité de l'inhibiteur pour le site actif est importante.

* Conclusion

En nous basant sur le concept de bisubstrat, nous avons montré qu'à partir de 2 molécules présentant des critères de reconnaissance par l'enzyme mais une activité inhibitrice faible ou nulle, nous pouvions en les associant par une liaison covalente obtenir un inhibiteur puissant.

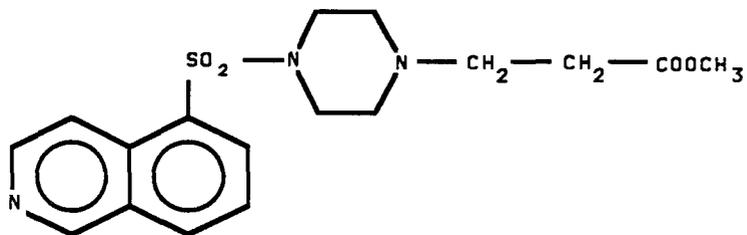
Le meilleur inhibiteur (Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆) a une activité analogue à celle du composé commercial (H7) vis à vis de la PKC et 18 fois supérieure vis à vis de la PKA. Cependant, nous n'avons pu montrer que cet inhibiteur agissait effectivement en tant que bisubstrat; d'autre part bien que le substrat peptidique présent dans sa structure soit spécifique de la PKC, le gain d'affinité

attendu est en fait apparu au niveau de la PKA. L'obtention d'inhibiteur compétitif du site actif de la PKC se heurte au problème incontournable de la spécificité. S'il n'apporte pas d'amélioration pour la PKC, Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ se révèle un bon inhibiteur de la PKA, supérieur à l'ensemble des inhibiteurs actuellement publiés dans la série des isoquinoléines, et il paraissait intéressant de modifier cette structure afin d'accroître la spécificité pour cette enzyme.



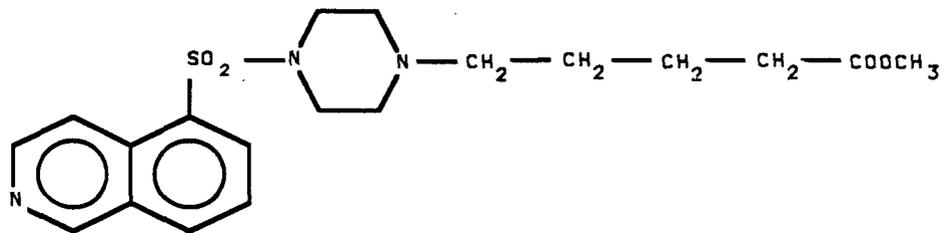
(I₁)

5-isoquinoléine sulfonyl pipérazine



(I₂)

N-(5-isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-méthyl propionate) pipérazine



(I₃)

N-(5-isoquinoléine sulfonyl), N'-(5-méthyl valérate) pipérazine

FIGURE 47 Analogues de la 5-isoquinoléine sulfonyl pipérazine

2.3- Analogues de l'inhibiteur H7 pouvant être greffés en N-term

Pour accroître l'activité de nos inhibiteurs bisubstrats, il était préférable de greffer en N-term d'un peptide une structure de type H7 présentant une activité inhibitrice intrinsèque. Le problème était de fonctionnaliser ce type de molécule pour permettre sa fixation sur un peptide, sans altérer son activité.

2.3.1- Dérivés de la 1(5-isoquinoléine sulfonyl) pipérazine

Cet analogue déméthylé de H7 (symbolisé I₁) est aussi un bon inhibiteur de protéines kinases (GERARD 1986). Nous l'avons fonctionnalisé par incorporation d'un ester méthylique en position N' de la pipérazine. Afin d'évaluer si la longueur du chaînon séparant la fonction ester de l'azote N' pouvait influencer l'activité inhibitrice, nous avons préparé deux analogues (I₂ et I₃) contenant soit un chaînon de deux carbones (groupement propionate), soit un chaînon de quatre carbones (groupement valérate) (Figure 47).

* Activité inhibitrice

Nous avons étudié l'activité de ces composés sur la phosphorylation des histones par la PKC et la PKA.

I₁ présente une IC₅₀ de 12 µM pour la PKC et 6 µM pour la PKA. Par contre les deux analogues I₂ et I₃ substitués en N' sont

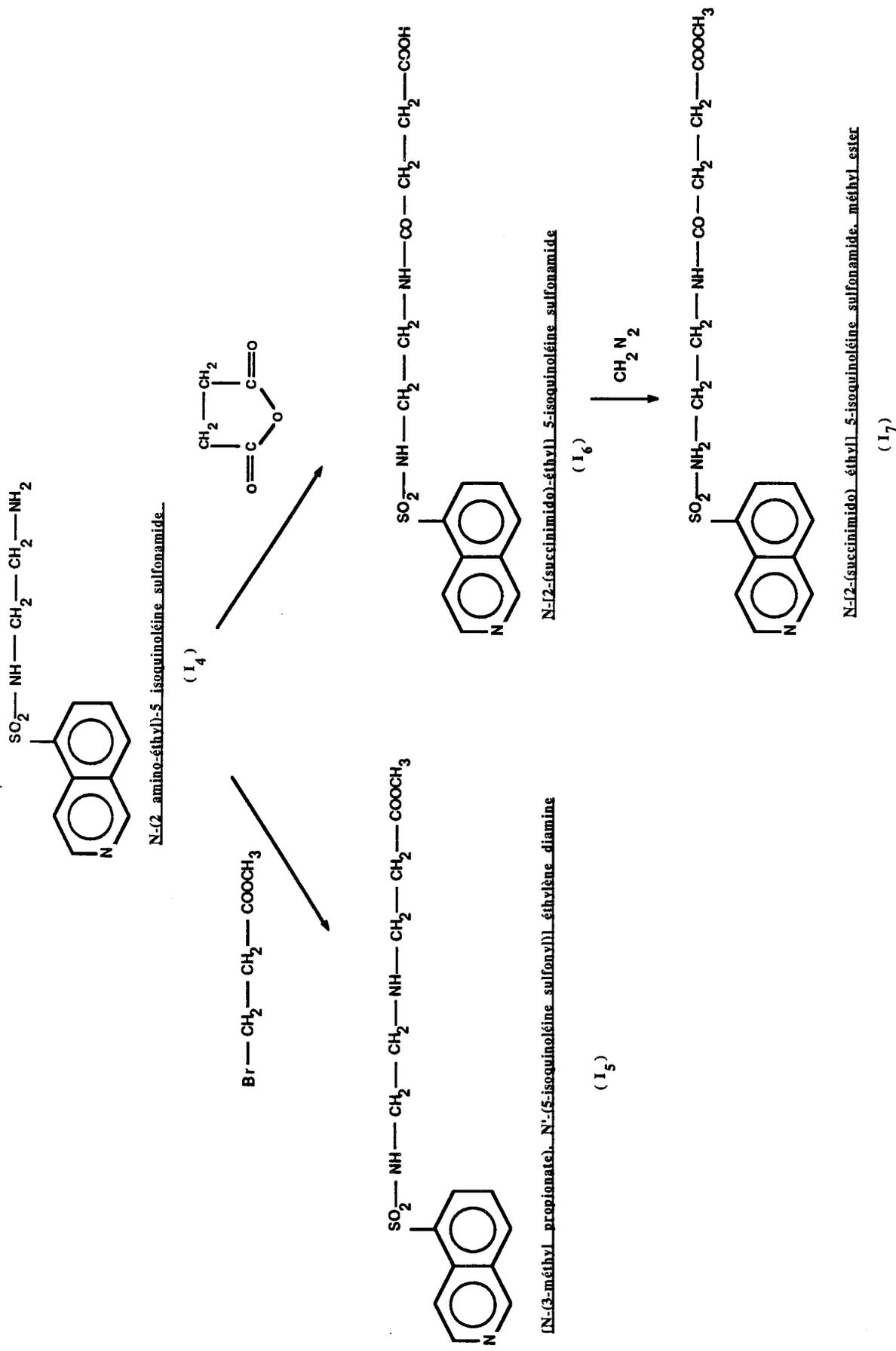


FIGURE 48 Analogues du N-(2-aminoéthyl)-5-isoquinoléine sulfonamide

totalelement inactifs. Il semblait donc que la disparition de l'hydrogène sur l'azote N' soit responsable de la perte d'activité. Comme, il paraissait impossible de fonctionnaliser la 5-isoquinoléine sulfonyl pipérazine sans modifier cette fonction amine, nous avons choisi un modèle présentant une fonction amine primaire afin de conserver la présence d'un hydrogène sur l'azote après substitution.

2.3.2- Dérivés de la N(2-aminoéthyl)5-isoquinoléine sulfonamide

Ce composé (I₄) est un inhibiteur de kinase de la famille d'H7. Son K_i est de 1,9 μM pour la PKA et de 18 μM pour la PKC; son analogue méthylé sur l'amine présente une activité de même ordre avec des K_i respectivement de 1,2 et 15 μM pour les deux kinases (HIDAKA 1984). La substitution de l'amine primaire par un alkyl influence donc peu l'activité inhibitrice de I₄. Nous avons substitué l'amine primaire selon 2 stratégies:

- utilisation d'un dérivé bromé fournissant une amine secondaire
- utilisation d'un anhydride d'acide fournissant une liaison amide.

La comparaison des dérivés obtenus devait nous indiquer si la fonction amine (mono ou disubstituée) était indispensable à l'activité inhibitrice ou si la seule présence d'un groupement N-H était suffisante.

Nous avons utilisé des structures permettant l'incorporation d'un chaînon tricarboné (Figure 48):

- le bromopropionate de méthyle pour fournir le [N(3-méthyl propionate), N'(5-isoquinoléine sulfonyl)] éthylène diamine (I₅),
- l'anhydride succinique pour fournir le N-[2(succinimido) éthyl] 5-isoquinoléine sulfonamide (I₆). Ce dernier composé a été

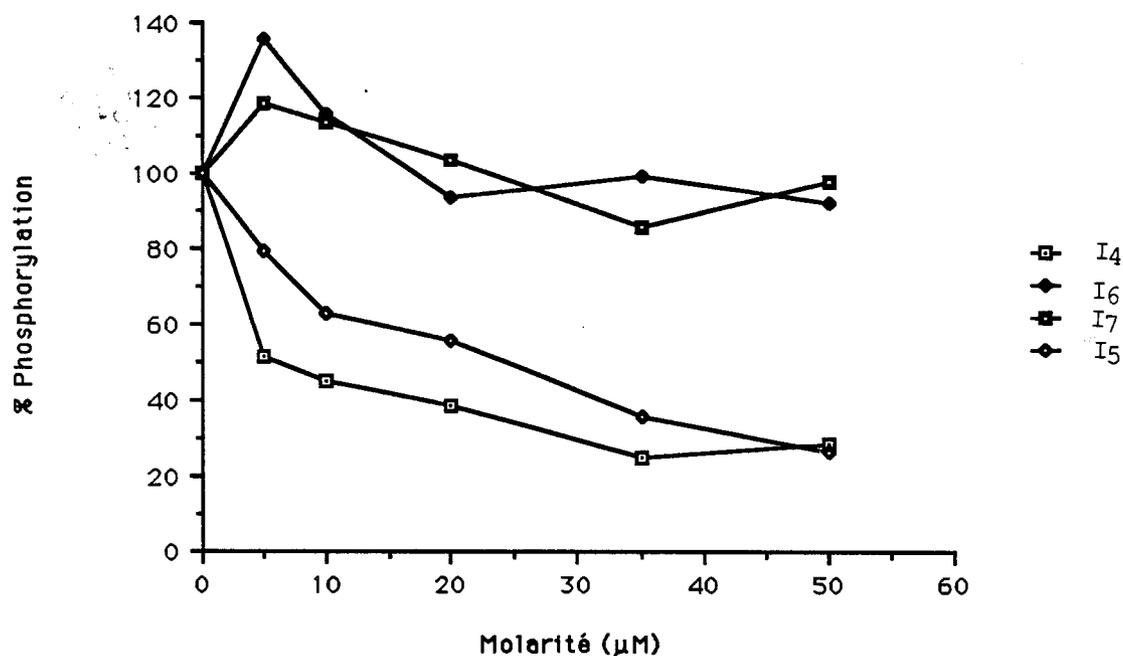


FIGURE 49 Activité comparée du N-(2-amino-éthyl) 5-isoquinoléine sulfonamide (I₄) et de ses analogues vis à vis de la PKC

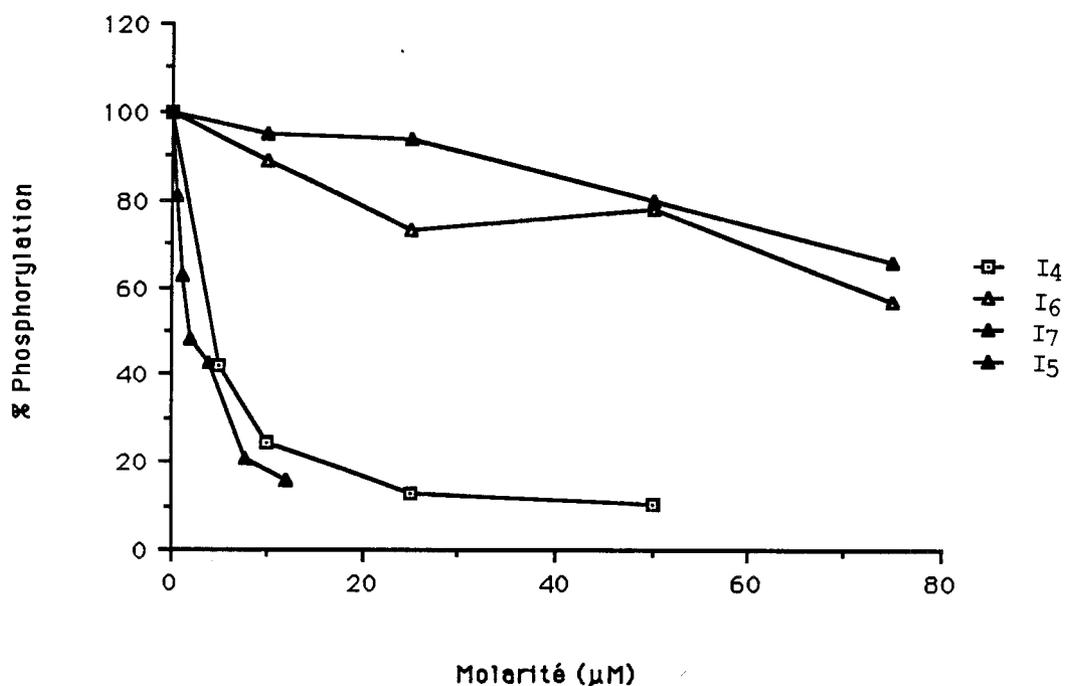


FIGURE 50 Activité comparée du N-(2-amino-éthyl) 5-isoquinoléine sulfonamide (I₄) et de ses analogues vis à vis de la PKA

estérifié (I7) dans le but d'évaluer l'influence de l'ionisation de la fonction carboxylique sur l'activité, et de retrouver une fonction proche de la liaison amide du bisubstrat potentiel.

* Activité inhibitrice



L'activité inhibitrice de ces différents composés a été testée sur de la PKC et de la PKA. Les courbes d'inhibition obtenues sont détaillées dans les Figures 49 et 50.

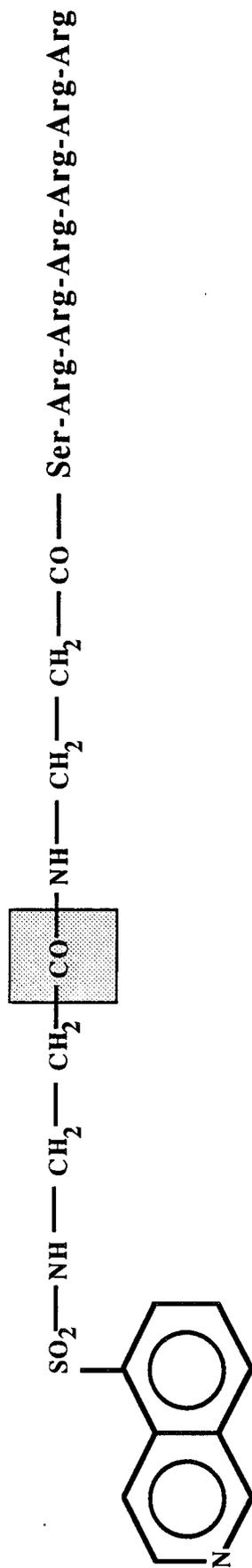
Dans les deux cas, nous remarquons que l'activité des composés est dépendante de la nature de l'azote substitué:

- le composé de départ (I4) dont l'azote est sous forme d'amine primaire est le plus actif avec une IC₅₀ de 7 μM pour la PKC et de 2 μM pour la PKA,
- l'amidification de cet azote par l'acide ou l'ester succinique (I6 et I7) supprime toute activité inhibitrice,
- par contre, la substitution de l'azote par un résidu propylique pour fournir une amine secondaire (I5), est beaucoup moins néfaste sur l'activité, puisque l'IC₅₀ est de 20 μM pour la PKC et 2 μM pour la PKA.

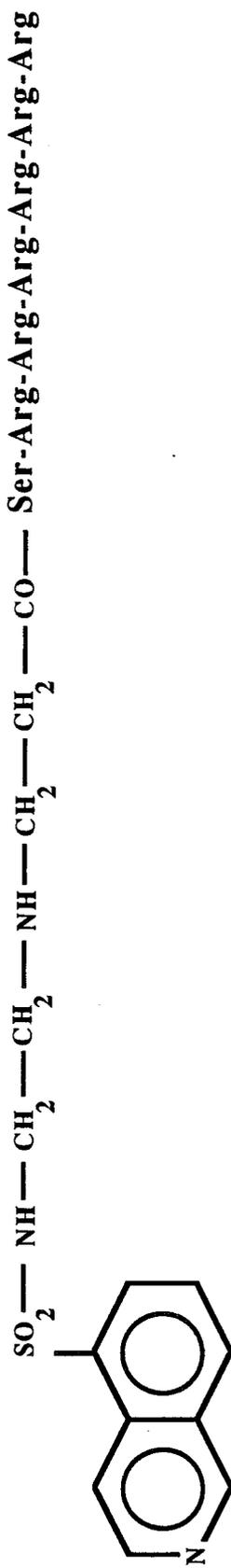
Ces résultats sont en accord avec les observations de HIDAKA (1984) qui avait noté que l'activité inhibitrice augmentait avec le pKA de la fonction amine (c'est à dire le caractère basique). Cet auteur avait suggéré la nécessité d'une charge positive (protonation) distante de 2 carbones de l'atome de soufre du sulfonamide. Dans notre cas, l'implication de l'azote dans une fonction amide interdit toute ionisation, cela pourrait expliquer l'inactivité observée.

En dépit de sa supériorité sur la PKA, cet inhibiteur était un bon candidat pour la préparation d'un bisubstrat, par le fait qu'il présentait à la fois une activité inhibitrice intrinsèque et une fonction réactive autorisant sa fixation en N-term d'un peptide. L'association de cet inhibiteur à un substrat de la PKC était susceptible d'induire deux phénomènes:

- soit un effet synergique des deux parties inhibitrices dû au bon positionnement de la partie peptidique dans le site actif de la PKC, associé à un gain de spécificité pour l'enzyme,
- soit un accroissement de l'activité inhibitrice dans une même proportion pour les deux enzymes, conduisant à un inhibiteur plus actif sur la PKA.



Isoquinoléine sulfonyl- β Ala₂-Ser-Arg₆



N-(isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-propionyl Ser-Arg₆)-éthylène diamine

FIGURE 51 Structure comparée des deux bisubstrats

2.4- Fixation d'un analogue actif de H7 sur un substrat polyarginine

Après hydrolyse de sa fonction ester, l'analogue actif I₅ étudié précédemment, a été greffé en N-term de la séquence Ser-Arg₆ pour fournir le composé N-(5-isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-propionyl-Ser-Arg₆) éthylène diamine, symbolisé "I₅-Arg₆". Dans ces conditions, la distance séparant l'isoquinoléine de la sérine est à peu près la même que dans le composé Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆. La structure de ces deux composés ne diffère que par une fonction carbonyle (Figure 51).

* Activité inhibitrice

- PKC

I₅-Ser-Arg₆ s'est révélé un très bon inhibiteur de la PKC, avec une IC₅₀ de 300 nM. Comparé à l'inhibiteur Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆, la simple disparition de la fonction C=O, accroît l'activité de l'ordre de 16 fois (Figure 52). La nécessité d'une fonction amine primaire ou secondaire observée précédemment pour les analogues de H7, est retrouvée ici pour les composés bisubstrats. La partie isoquinoléique se fixerait donc bien sur le même site dans les deux cas. D'autre part, la partie peptidique joue aussi un rôle important dans l'activité, puisque greffée sur l'inhibiteur I₅, elle fait chuter l'IC₅₀ d'un facteur 67.

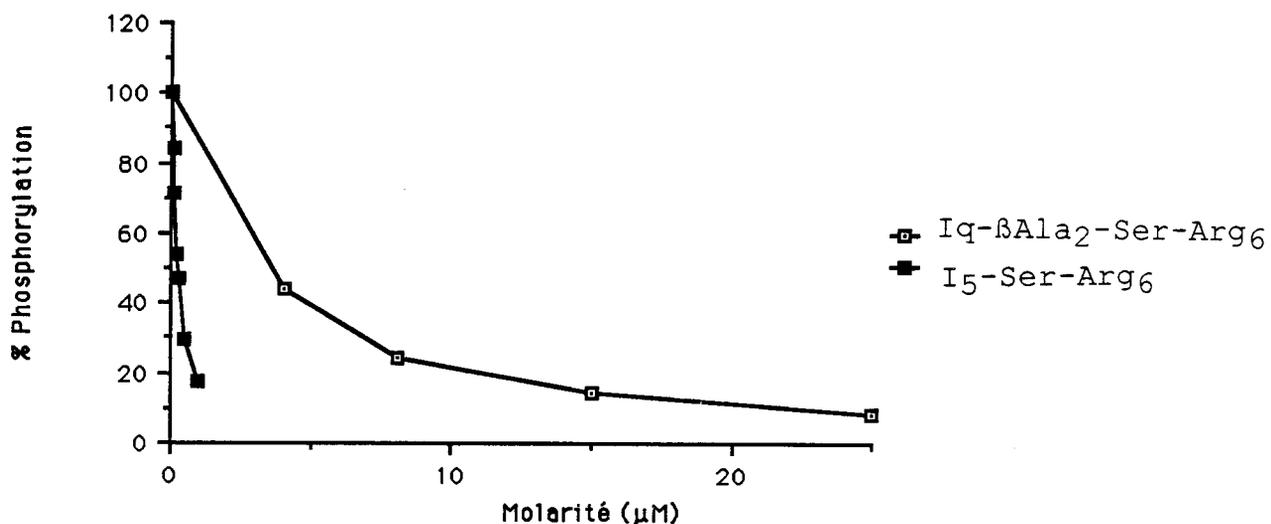


FIGURE 52 Activité comparée de Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ et de I₅-Ser-Arg₆ sur la PKC

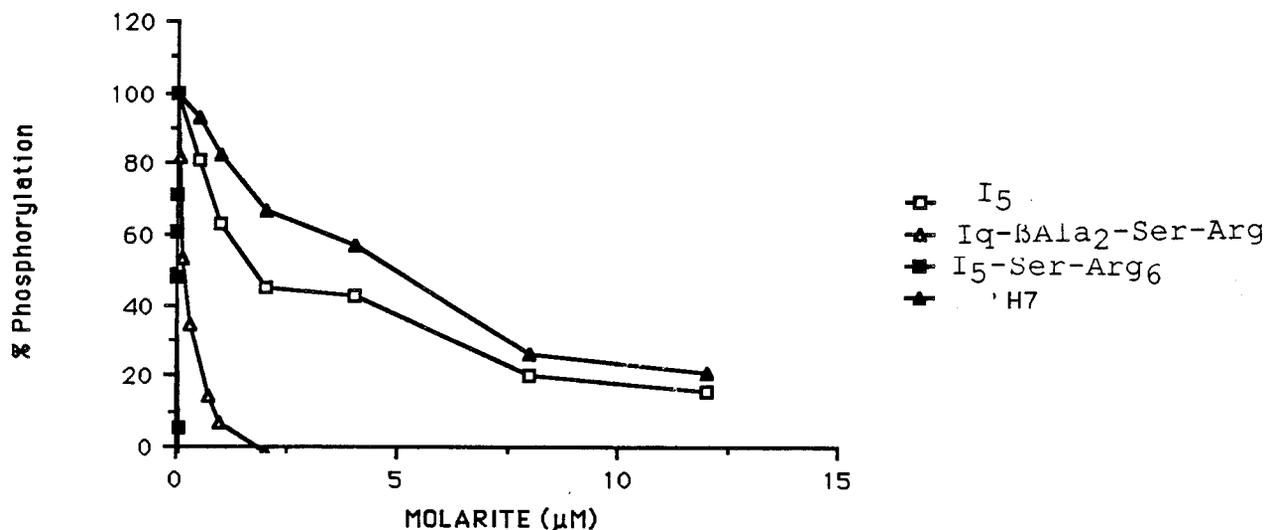
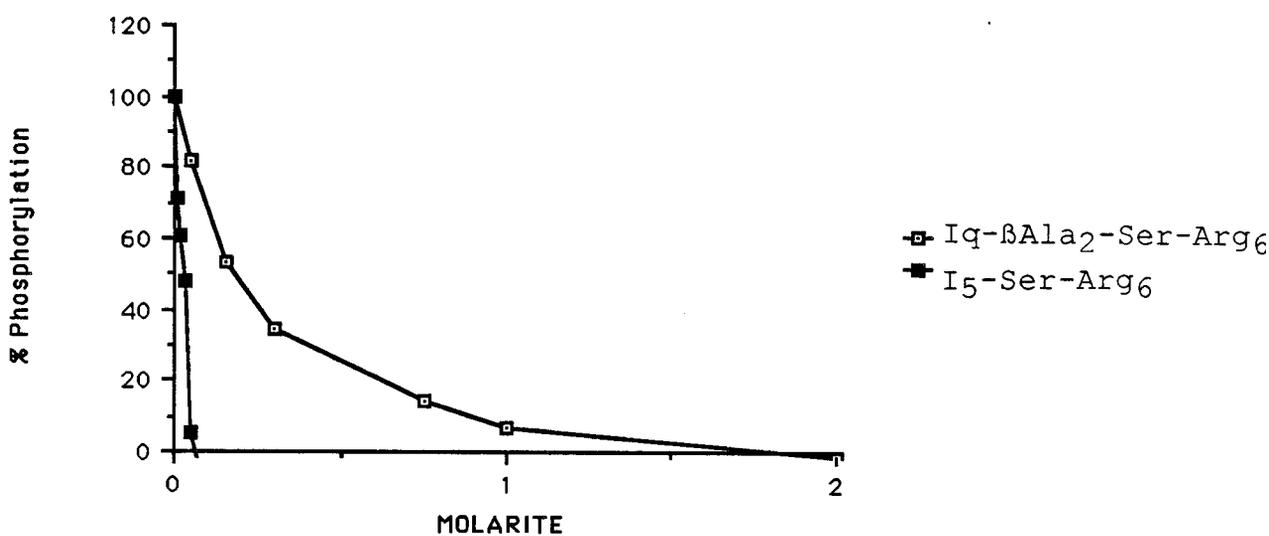


FIGURE 53 Activité comparée de Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆, I₅-Ser-Arg₆, I₅ et H7 sur la PKA

- PKA

Comme dans le cas de Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆, le composé mixte I₅-Ser-Arg₆ a une activité inhibitrice 10 fois supérieure pour la PKA, avec une IC₅₀ de 30 nM (Figure 53). Il est probable que la plus forte affinité pour la PKA du composé greffé I₅, se répercute sur l'activité inhibitrice de la molécule mixte.

Il faut noter que les activités relatives des différents inhibiteurs sont analogues pour les deux enzymes:

- la disparition de la fonction C=O présente dans la structure de Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ (IC₅₀ = 300 nM) accroît l'activité inhibitrice d'un facteur 10.

- l'addition de la partie peptidique Ser-Arg₆ à l'inhibiteur I₅, fait chuter l'IC₅₀ d'un facteur 67.

* Mode d'inhibition

L'activité de I₅-Ser-Arg₆ a été étudiée à différentes concentrations en ATP. Pour les deux enzymes, l'inhibiteur s'est révélé compétitif vis à vis de ce substrat. Les K_i obtenus d'après la représentation des résultats selon la méthode en double inverse sont: 100 nM pour la PKC et 4 nM pour la PKA (Figures 54 et 55).

De même que pour l'inhibiteur Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆, nous n'avons pu mettre en évidence de compétition avec les substrats protéiques ou peptidiques. De plus, il n'a pas été possible de lever l'inhibition en augmentant progressivement la concentration en substrat, ce qui signifierait que substrat et inhibiteur n'interagissent pas avec le même site. Il est donc difficile de conclure à une activité inhibitrice de type bisubstrat. Cependant,

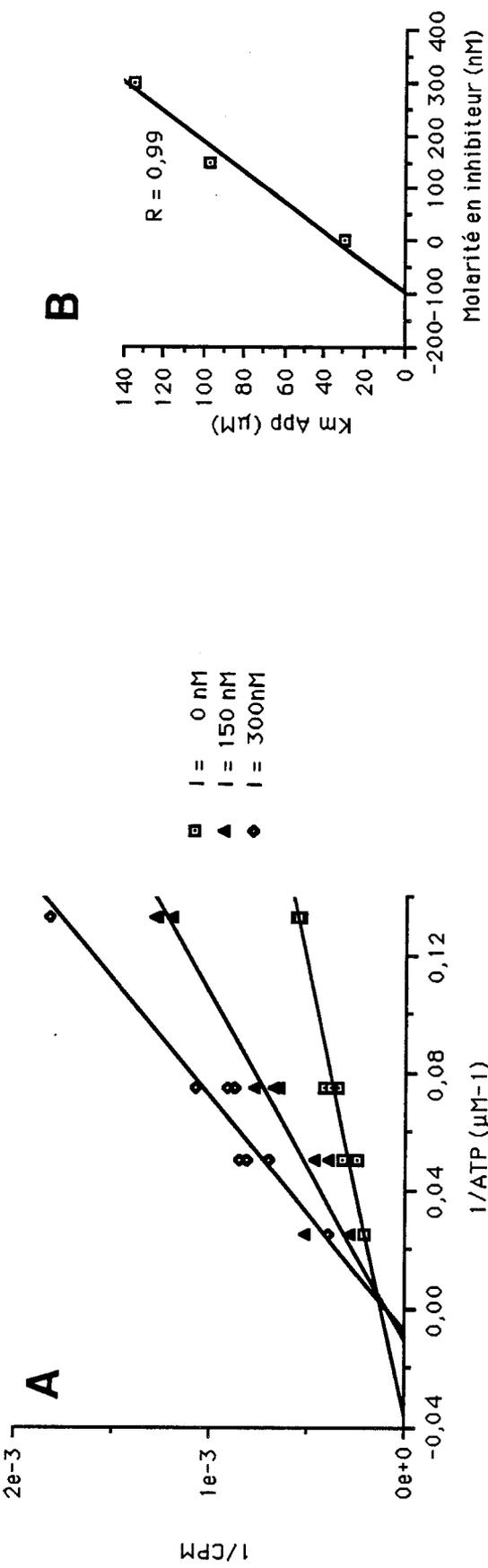


FIGURE 54 Compétition I₅-Ser-Arg6 / ATP (A) Détermination du Ki pour la PKC (B)

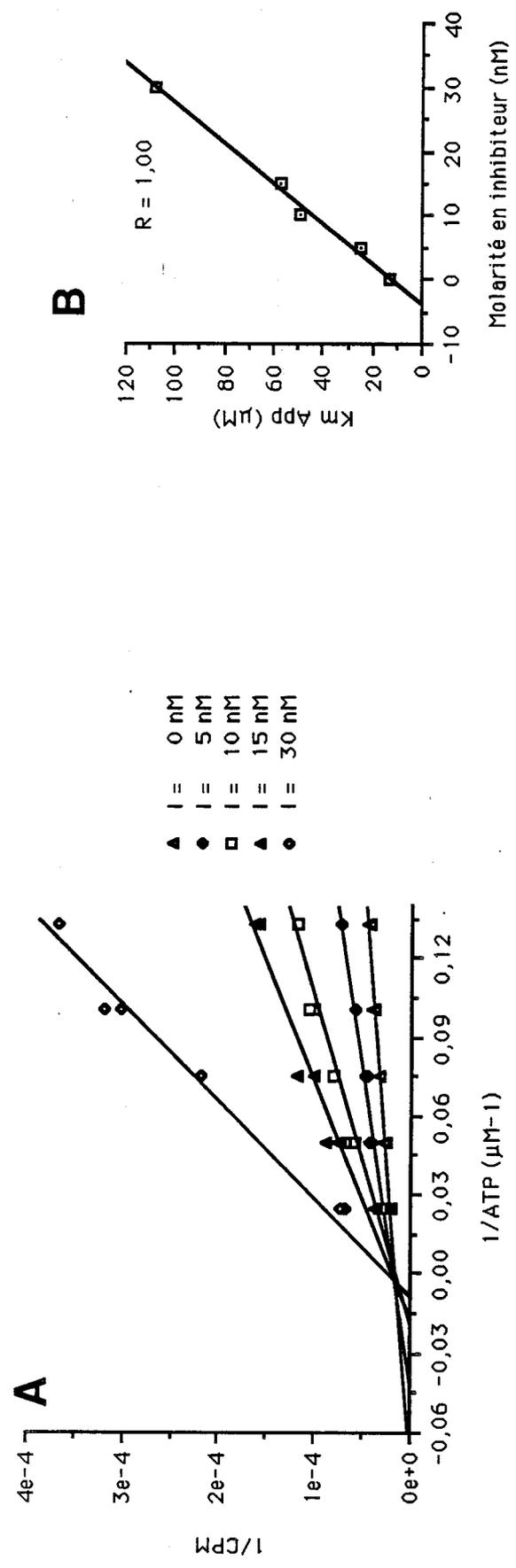


FIGURE 55 Compétition I₅-Ser-Arg6 / ATP (A) Détermination du Ki pour la PKA (B)

ceci ne peut être totalement exclus; en effet, nous l'avons déjà précisé pour l'inhibiteur Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆, l'affinité de la structure isoquinoléique pour le site ATP étant très forte, elle est susceptible de masquer l'affinité plus faible de la partie peptidique pour le site substrat.

* Conclusion

L'association dans une seule molécule, d'un substrat peptidique spécifique de la PKC et d'une structure analogue de l'ATP nous a fourni des inhibiteurs très puissants, dont l'activité est nettement supérieure à celle des composés actuellement publiés dans la série des isoquinoléines. Comparé à l'inhibiteur commercial H7, le composé I₅-Ser-Arg₆ présente un Ki 60 fois inférieur pour la PKC et 750 fois inférieur pour la PKA. Bien que notre étude soit basée sur le concept de bisubstrat PKC, nos composés ont toujours une activité supérieure vis à vis de la PKA. Le fait que les activités relatives PKC/PKA soient de 1/10 quel que soit le composé étudié: Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆, I₅ ou I₅-Ser-Arg₆, n'est pas en faveur d'une inhibition de type bisubstrat. En effet, l'addition de la partie peptidique spécifiquement substrat PKC à la structure de I₅, aurait dû se traduire par un accroissement du pouvoir inhibiteur de façon beaucoup plus nette pour cette enzyme. L'évolution parallèle de l'activité inhibitrice PKA et PKC d'une part, et l'analogie structure/activité de I₅ et de I₅-Ser-Arg₆ d'autre part (pouvoir inhibiteur lié à la présence d'une fonction amine secondaire en γ du sulfonamide), suggère que ces deux composés agissent selon le

même mécanisme c'est à dire compétition stricte avec l'ATP, que ce soit pour la PKC ou la PKA.

D'autre part, bien que la partie peptidique Ser-Arg₆ ne semble pas se fixer sur le site substrat peptidique, sa présence accroît l'activité d'un facteur 67 pour les deux enzymes; nous avons déjà observé pour Isoq-SO₂-βAla₂-Ser-Arg₆ que la suppression de 2 résidus arginines se traduisait par une diminution du pouvoir inhibiteur. Il est donc probable que les deux enzymes possèdent à proximité du site ATP, une zone de forte affinité pour les résidus arginines, différente du site de reconnaissance des substrats. Dans le cas de la PKC, en dépit de la présence d'un résidu phosphorylable, la conformation ou la configuration de l'inhibiteur privilégierait la fixation simultanée sur le site ATP et sur ce site arginines plutôt que sur le site de reconnaissance des substrats peptidiques. Différents phénomènes peuvent expliquer ce comportement:

- la distance site ATP/site substrat évaluée d'après la structure de la phosphoglycérate kinase est inférieure à la distance séparant réellement ces deux sites pour la PKC; dans ces conditions les deux substrats ne pourraient atteindre simultanément leur site respectif.

- en dépit d'une distance site ATP/site substrat correcte, la configuration de l'inhibiteur n'autorise pas un bon positionnement dans le site actif. En effet, la structure isoquinoléique placée en position N-terminale du peptide, peut ne pas s'orienter correctement dans le site actif par rapport au résidu Sérine.

- le mode de fixation des substrats sur le site actif ne permet pas l'accès du substrat peptidique en absence d'ATP. En effet, WHITEHOUSE (1983 a,b) a suggéré que la fixation des substrats sur le site actif de la PKA s'effectuait selon un mécanisme ordonné:

la fixation de l'ATP sur l'enzyme provoquerait un changement conformationnel, autorisant l'accès du substrat peptidique au site actif. En absence d'ATP la fixation du substrat sur l'enzyme serait impossible. Ce phénomène n'a pas été démontré pour la PKC, mais ces deux enzymes présentant de nombreuses analogies, il est possible que leur mécanisme réactionnel soit proche. Dans ce cas, si les analogues d'ATP utilisés ne présentent pas les déterminants structuraux induisant le changement conformationnel indispensable à la fixation du substrat, la partie peptidique ne peut pas accéder au site substrat.

Pour les deux premières hypothèses, l'étude d'autres bisubstrats potentiels pourrait nous fournir des éléments de réponse. D'une part, l'allongement de l'espaceur (distance amine secondaire/fonction carboxylique d'ancrage sur le peptide) dans des structures de type I₅-Ser-Arg₆ devrait nous indiquer si l'absence d'activité bisubstrat est liée à une mauvaise évaluation de la distance séparant les deux sites ciblés. D'autre part, il serait intéressant d'étudier l'activité de structures peptidiques substituées par des molécules telles que I₅, non plus en position N-terminale, mais sur la chaîne latérale d'un acide aminé de telle sorte que son orientation par rapport au squelette peptidique soit différente. Dans ces conditions, le peptide et la structure isoquinoléique devrait présenter une configuration plus proche de celle adoptée par les substrats naturels dans le site actif.

**PREPARATION D'ANTICORPS SPECIFIQUES
DES DIFFERENTS SOUS-TYPES DE PKC**

A) CHOIX DES SEQUENCES

Lorsque nous avons entrepris la préparation d'anticorps anti-PKC, seuls trois sous-types étaient clonés: α , β et γ . Nous avons utilisé en référence les séquences issues du cerveau de rat (source d'enzyme utilisée au laboratoire) publiées par KNOFF (1986) (Figure 56). La forme α n'ayant pas encore été clonée chez le rat, nous nous sommes référés à la séquence bovine publiée par PARKER (1986) (Figure 57).

```

PKC-I      10          20          40          80
MAGLPGGGD  SEG-GPRPLF CRKCALRQKV VHEVKSHKFT ARFFKQPTFC SHCTDFIWCI GKQGLQCQVC SEVVHRCIHE FVTFECPGAG KGPQTDDPRN KHKFRLHSYS
:          :          :          :          :          :          :          :          :          :          :
PKC-II     MADPAAGPPP  SEGEESTVRF ARKCALRQKN VHEVKNHKFT ARFFKQPTFC SHCTDFIWGF GKQGFQCQVC CFVVHRCIHE FVTFSCPGAD KGPASDDPRS KHKFKIHTYS
10          40          80
PKC III → 100

120          160          200
SPTFCDHCGS LLYGLVHQGM KCSCEMNVH RRCVRSVPSL CGVDHTERRG RLQLEIRAPT SDEIHITVGE ARNLIPMDPN GLSDPYVKLK LIPDPRNLTK QTKTKVKATL
:          :          :          :          :          :          :          :          :          :          :
SPTFCDHCGS LLYGLVHQGM KCDTGMMSVH RRCVMNVPSL CGTDHTERRG RIYVQAHIDG CVLVVVVRDA K-NLVPMDPN GLSDPYVKLK LIPDPKSESK QTKTKIKCSL
120          160          200
I          N K S          I R E I

230          260          300          320
NPFVNETVVF NLKPGDVERR LSVEIWDWR TSRNDFMGAM SFGVSELLKA PVDGWYKLLN QEEGEYYNVP YADADNCSLL ---QKFEACN YPLELYERVN MGPSSSPIPS
:          :          :          :          :          :          :          :          :          :          :
NPEVNETFRF QLKESDKDRR LSVEIWDWL TSRNDFMCSL SFCISELQKA GVDGWFKLLS QEEGEYFNVP VFPEGSEGNE ELRQKFERAK IQGQTKAPE KTANTISKFD
240          280          320

360          400
PSPSPDTSKR CFFGASPGRL HISDFSLVM LGKGSFGKVM LAERRGSDLE YAIKILKQDV IVQDDVDCT LVEKRVLALG GRGPGGRPHF LTQLHSTFQT PDRLYEVMEY
:          :          :          :          :          :          :          :          :          :          :
LNQNRD AKL T-----DFNFLVM LGKGSFGKVM LSEKGTDEL YAVKILKQDV VIQDDVVECT MVEKRVLALP GKPP-----F LTQLHSCFQT MDRLYFVMEY
340          380          400          410
← PKC-III          PKC-III →

440          490          510          540
VTGGDLMYHI QQLGKFKEPH AAFYAAEIAI GLFFLHNQCI IYRDLKLDNV MLDAEGHIKI TDFGMCKENV FPGSTTRTFC GTPDYIAPEI IAYQPYGKSV DWNSFGVLLY
:          :          :          :          :          :          :          :          :          :          :
VNGGDLMYHI QQVGRFKEPH AVFYAAEIAI GLFFLQSKGI IYRDLKLDNV MLDSECHIKI ADFGMCKENI WDGVTTKTFC GTPDYIAPEI IAYQPYGKSV DWAFQVLLY
440          480          510

570          590          620
EMLAGQPPFD GEDEEELFQA IMEQVTYTPK SLSREAVAIC KGFLTKHPGK RLGSGPDGEP TIRAHGFFRW IDWERLERLE IAPPFRPRPC GRSCGENFDKF FTRAAPALTP
:          :          :          :          :          :          :          :          :          :          :
EMLAGQAPFE GEDEDELQFS IMEHNVAYPK SMSKEAVAIC KGLMTKHPGK RLCGPEGER DIKEHAFFRY IDWERLERKE IQPPYKPKAC GR/AENFDRF FTRHPVPLTP
540          580          610          R DKRDT KF Q
S I E

660          690
PDRVLASID QADFGQFTYV NPDFVHEDAR SPTSPVVPVPM
:          :          :          :          :
PDQEVIRNID QSEFEGFSFV NSEFLKPEVK S
T KLF L N A Y T P VINV
660

```

Figure 56 Séquences d'acides-amino des isoformes de protéine kinase C de rat déduites des séquences de cDNA.

PKC I correspond à l'isoforme γ , PKC II et III aux isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$.

Afin d'assurer une bonne spécificité, la longueur des séquences utilisées pour la préparation d'anticorps est généralement de l'ordre de 15 amino-acides; cependant certains auteurs obtiennent aussi de bons résultats avec des peptides plus courts (DOOLITTLE). Les séquences sont choisies de préférence aux extrémités de la protéine, qui présentent deux avantages: ces segments sont souvent mobiles et exposés à la surface dans la protéine native, donc plus accessibles aux anticorps; d'autre part, après fixation sur une protéine porteuse le peptide se trouve dans une situation analogue à celle qu'il adopte sur la protéine. Lorsque les séquences N ou C-terminales ne peuvent être utilisées, il faut avoir recours à différents critères basés sur la séquence en amino-acides de la protéine, pour sélectionner des zones susceptibles d'être exposées en surface.

Dans notre cas le choix de séquences était beaucoup plus restreint puisqu'il était limité à des séquences présentant le minimum d'homologie entre elles. De plus, les séquences issues d'épissage alternatif, différenciant les formes β_1 et β_2 , présentent une homologie trop importante pour être discriminantes. Le sous-type β a de ce fait été considéré globalement.

Nous avons vu dans le chapitre des généralités que les trois sous-espèces de PKC diffèrent par cinq régions hypervariables intitulées V1 à V5. Seules trois de ces régions ont une longueur suffisante pour être envisagées comme cible pour des anticorps spécifiques:

- la partie N-terminale V1,
- la partie C-terminale V5,

- la zone V3, la plus longue des séquences hypervariables qui présente un caractère très hydrophile chez les trois sous-espèces et correspondrait au site de clivage par la calpaïne.

* Le segment C-terminal V5, sélectionné pour la sous-espèce γ (Rat I), était un peptide de choix: cette zone variable est en effet beaucoup plus courte pour les sous-espèces α et β .

* Le segment N-terminal V1 n'a pas été retenu comme séquence cible.

- Dans le cas du sous-type α , 8 des 16 acides aminés de la séquence sont hydrophobes: 5 alanines, 2 valines et 1 phénylalanine. La faible solubilité en milieu aqueux du peptide correspondant aurait été un obstacle à sa purification et son utilisation en tant qu'haptène.

- Dans le cas du sous-type β , (II et III du rat) ce segment de 19 résidus présente 5 amino-acides communs avec la sous-espèce γ (type I du rat) et nous avons préféré opter pour une zone ne présentant aucune homologie entre sous-espèces.

* Le segment V3 était le meilleur candidat pour α et β . Dans les deux cas nous avons sélectionné la partie C-terminale de cette zone hypervariable, qui présente le moins d'homologie entre sous-espèces.

Les séquences retenues sont les suivantes (séquences encadrées dans les figures 58) :

α : PKC α (boeuf) [320-333]

Pro-Ser-Glu-Asp-Arg-Arg-Gln-Pro-Ser-Asn-Asn-Leu-Asp-Arg

FORME ALPHA

PKC Alpha EL R Q K F E K A K L G P A G N K V I S **P S E D R - - - Q P S - - - N N L - - D R** V K L T D F N F L M V L G
 PKC Béta EL R Q K F E R A K I G Q - G T K - - A P - E E K T A N T I S K F D N N G N R D R M K L T D F N F L M V L G
 COMMUN EL R Q K F E A K G G K P E S N N D R K L T D F N F L M V L G

PKC Alpha EL R Q K F E - - - - - - - - - K A K L G P A G N K V I S **P S - - - - E D R R - - - - - Q P S N N L D R** V K L T D F N
 PKC Gamma - L - - K F E A C N Y P L E L Y E R V R M G P S S S P I P S P S P S P T D S K R C F F G A S P G - - - - R L H I S D F S
 COMMUN L K F E G P S P S R P R D F

FORME BETA

PKC Béta EL R Q K F E R A K I G Q - G T K - - A P - E **E K T A N T I S K F D N N G N R D R** M K L T D F N F L M V L G
 PKC Alpha EL R Q K F E K A K L G P A G N K V I S P S E D R R Q P - - - S - - - N N L - - D R V K L T D F N F L M V L G
 COMMUN EL R Q K F E A K G G K P E S N N D R K L T D F N F L M V L G

PKC Béta EL R Q K F E - - - - - - - - - R A K I G Q G T K A - P E **E K T A N T I S K - - - F D N N - G N R D R** M K
 PKC Gamma - L - - K F E A C N Y P L E L Y E R V R M G P S S S P I P S P S P S P T D S K R C F F G A S P G - - - - R L H
 COMMUN L K F E R G P T S K F G R

FORME GAMMA

PKC Gamma R L V L A S I D Q A D F Q G F T Y V N P D F V H **P D A R S P T S P V P V P V M**
 PKC Alpha Q L V I A N I D Q S D F E G F S Y V N P Q F V H P I L Q S A V - - - - -
 COMMUN L V A I D Q D F G F Y V N P F V H P S

PKC Gamma L V L A S I D Q A D F Q G F T Y V N P D F V H **P D A R S P T S P V P V P V M**
 PKC Béta 1 E V I A N I D Q S E F E G F S F V N S E F L K P E V K S - - - - -
 COMMUN V I D Q F G F V N P S

PKC Gamma P D R L - V - - L A S I D Q A D F Q G F T Y V N P D F V H **P D A R S P T S P V P V P V M**
 PKC Béta 2 T D K L F I R N L - - - D Q N E F A G F S Y T N P E F V I N V V K S - - - - -
 COMMUN D L L D Q F G F Y N P F V S

FIGURE 58 Alignement des séquences sélectionnées avec la zone hypervariable correspondante des autres sous-espèces.

β : PKC II/III (rat) [319-336]

Glu-Lys-Thr-Ala-Asn-Thr-Ile-Ser-Lys-Phe-Asp-Asn-Asn-Gly-Asn
-Arg-Asp-Arg

γ : PKC I (rat) [683-697]

Pro-Asp-Ala-Arg-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Val-Pro-Val-Pro-Val-Met

L'alignement de chacune de ces séquences avec la zone hypervariable correspondante des autres sous-espèces, montre que même l'introduction de gaps ne révèle pas d'homologie significative (Figure 58); des anticorps dirigés contre ces séquences ne devraient présenter aucun risque de reconnaissance croisée.

Par contre l'homologie entre les différentes espèces animales est très élevée: elle est au minimum de 93 % pour α , 89 % pour β et 87 % pour γ (Figure 59). Les anticorps spécifiques pourront de ce fait être utilisés pour la caractérisation de protéine kinase C issue d'espèces différentes.

A L P H A	
BOEUF	P S E D R R Q P S N N L D R
RAT	P S E D R K Q P S N N L D R
LAPIN	P S E D R K Q P S N N L D R
B E T A	
RAT	E K T A N T I S K F D N N G N R D R
BOEUF	E K T T N T I S K F D N N G N R D R
LAPIN	E K T T N T I S K F D N N G N R D R
HOMME	E K T T N T V S K F D N N G N R D R
G A M M A	
RAT	P D A R S P T S P V P V P V M
BOEUF	P D A R S P I S P T P V P V M
HOMME	P D A R S P I S P T P V P V M

FIGURE 59 Homologie entre espèces animales des séquences peptidiques sélectionnées.

B) UTILISATION DES PEPTIDES EN TANT QU'IMMUNOGENES

En règle générale les petites molécules ne sont pas immunogènes et sont considérées comme des haptènes; c'est à dire qu'elles peuvent être reconnues par les anticorps mais ne sont pas capables de déclencher une réponse immunitaire. Un haptène acquiert le pouvoir immunogène lorsqu'il est fixé sur une protéine.

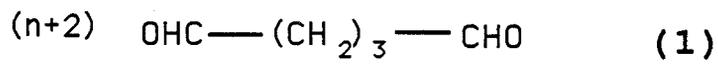
Les peptides ont une taille limite pour être considérés comme immunogènes et nous avons préféré les coupler à une protéine porteuse. Les protéines les plus utilisées sont l'anatoxine tétanique, la sérum-albumine bovine (BSA), l'ovalbumine, la thyroglobuline, l'hémocyanine de patelle (KLH).

Le peptide PKC β , a été couplé à l'anatoxine tétanique selon un couplage au glutaraldéhyde. Pour les peptides α et γ nous avons ajouté une cystéine en position N-terminale de la séquence afin d'utiliser un mode de couplage plus fiable, par le 6-maléimidocaproate de N-hydroxysuccinimide (MCS). Ces peptides ont été greffés sur la BSA dont le coût est inférieur à celui de l'anatoxine tétanique.

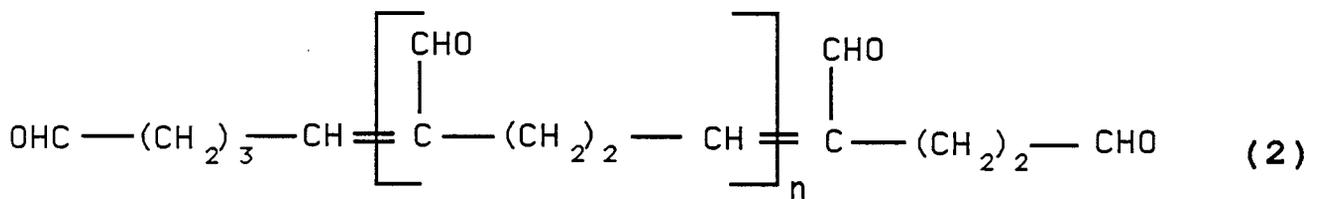
1) MODES DE COUPLAGE

1.1- Couplage au glutaraldéhyde (AVRAMEAS 1969, 1978)

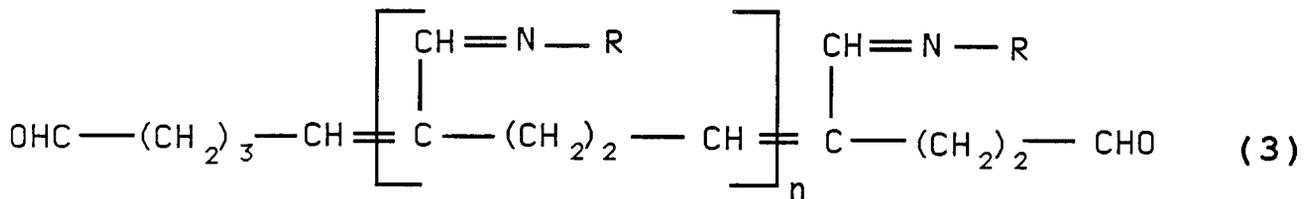
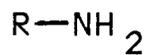
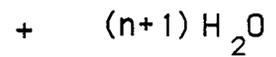
C'est le mode de couplage le plus couramment utilisé pour l'obtention de conjugués. Cet agent homobifonctionnel réagit avec les fonctions amines:



monomère



forme polymérisée



conjugué

FIGURE 60 Structure du glutaraldéhyde en solution et du conjugué peptide-protéine formé

- fonctions ε des lysines pour la protéine porteuse
- fonctions ε des lysines et N-terminale pour le peptide.

La stabilité des produits de réaction est satisfaisante mais le mode de liaison que forme le glutaraldéhyde avec les fonctions amines n'a pas encore été clairement établi. Selon la théorie de MONSAN (1975), le glutaraldéhyde en solution à pH neutre existerait essentiellement sous forme polymérisée (2) résultant d'une condensation aldolique des monomères (1) (Figure 60). Les fonctions aldéhydes du polyglutaraldéhyde réagiraient ensuite avec les fonctions amines du peptide ou de la protéine pour former une liaison imine. Cette fonction imine serait stabilisée par conjugaison avec la double liaison éthylénique en α.

Ce mode de réaction n'est pas spécifique et peut aussi bien intervenir entre une molécule de protéine et une molécule de peptide pour fournir le conjugué désiré, qu'entre deux molécules de même nature conduisant à des formes polymérisées de peptide ou de protéine. L'inconvénient majeur du couplage au glutaraldéhyde est le manque de reproductibilité et l'impossibilité de caractériser avec précision le conjugué obtenu.

1.2- Couplage à l'acide maléimidocaproïque

Les acides maléimidiques sont des agents hétérobifonctionnels très utilisés pour réaliser la liaison entre deux molécules, telles que peptide et protéine. Ils jouent aussi le rôle d'espaceur dont la longueur est définie par la nature de l'acide greffé. Ces composés réagissent spécifiquement avec un groupement aminé d'une part et un groupement thiol d'autre part (KELLER 1975).

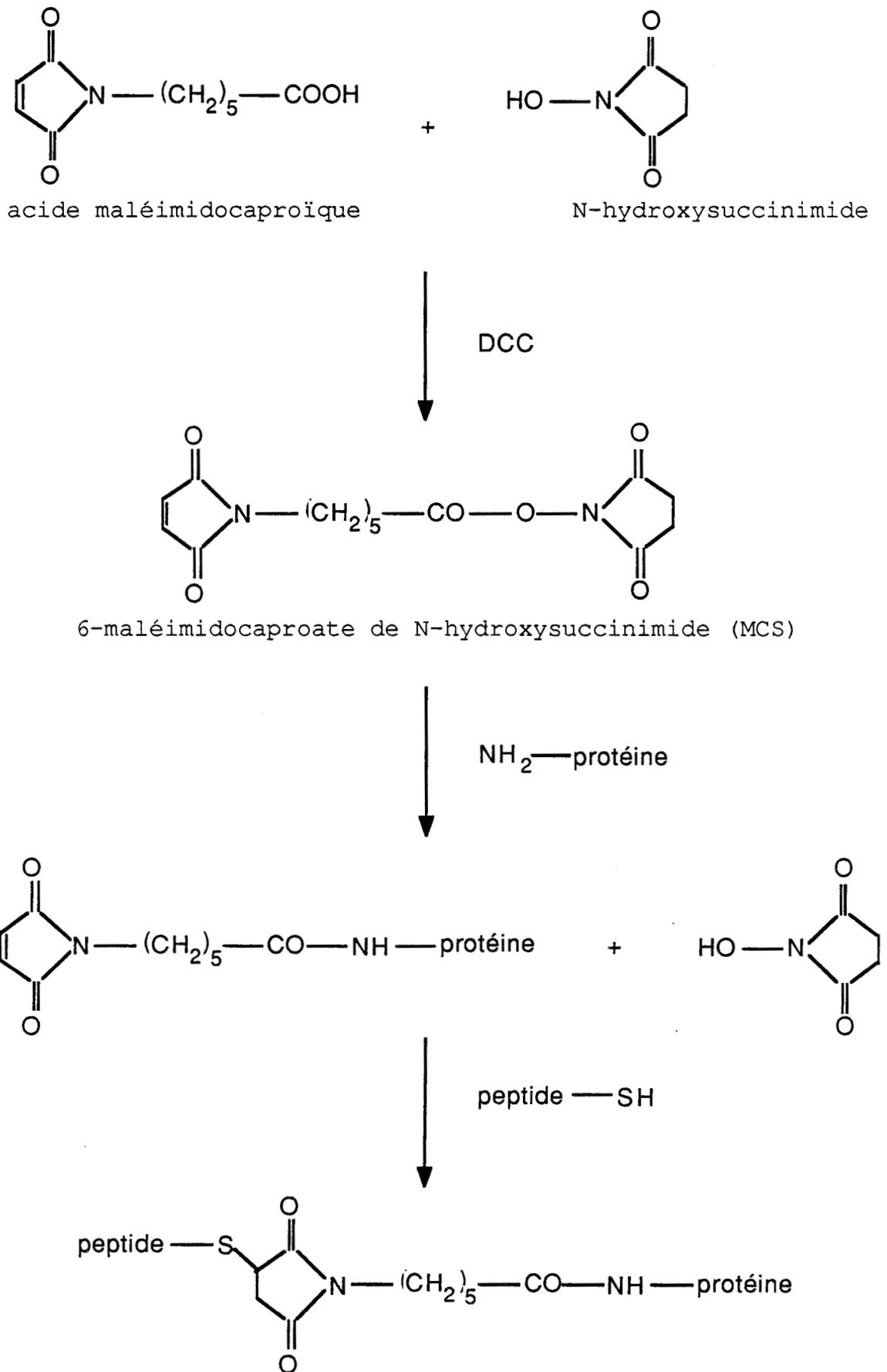


FIGURE 61 Couplage peptide-protéine portée par le 6-maléimidocaproate de N-hydroxysuccinimide

- La proportion de MCS utilisé pour l'activation de la protéine permet de définir approximativement le rapport molaire peptide/protéine.
- La quantité de groupements maléiques fixés sur la protéine activée peut être évaluée avant le couplage du peptide, par un dosage de la capacité de fixation en cystéine (Dosage d'Ellman). Ceci permet de calculer la quantité exacte de peptide nécessaire pour la réaction.
- La quantité de peptide fixé sur la protéine porteuse peut de la même façon être évaluée par le dosage de la capacité résiduelle de fixation de la protéine après couplage.
- Les conjugués obtenus par couplage au MCS sont reproductibles et de nature bien définie.

* Réduction des peptides

Avant couplage, les peptides doivent être réduits afin de régénérer les fonctions thiols oxydés. Deux agents réducteurs ont été utilisés, le dithiotréitol (DTT) et la tributylphosphine.

La réduction par le DTT, décrite pour la première fois par CLELAND (1964), est la méthode la plus utilisée en chimie des peptides et des protéines. Le potentiel redox du DTT est de - 0,33 V à pH 7 et 25 °C, alors que celui de la cystéine est de - 0,22 V.

La réduction s'effectue en deux étapes, formation d'un composé mixte, DTT-peptide avec libération d'une molécule de peptide réduit, puis libération d'une deuxième molécule de peptide réduit et formation d'un dérivé cyclique du DTT. La deuxième réaction est pratiquement totale car la formation du disulfure

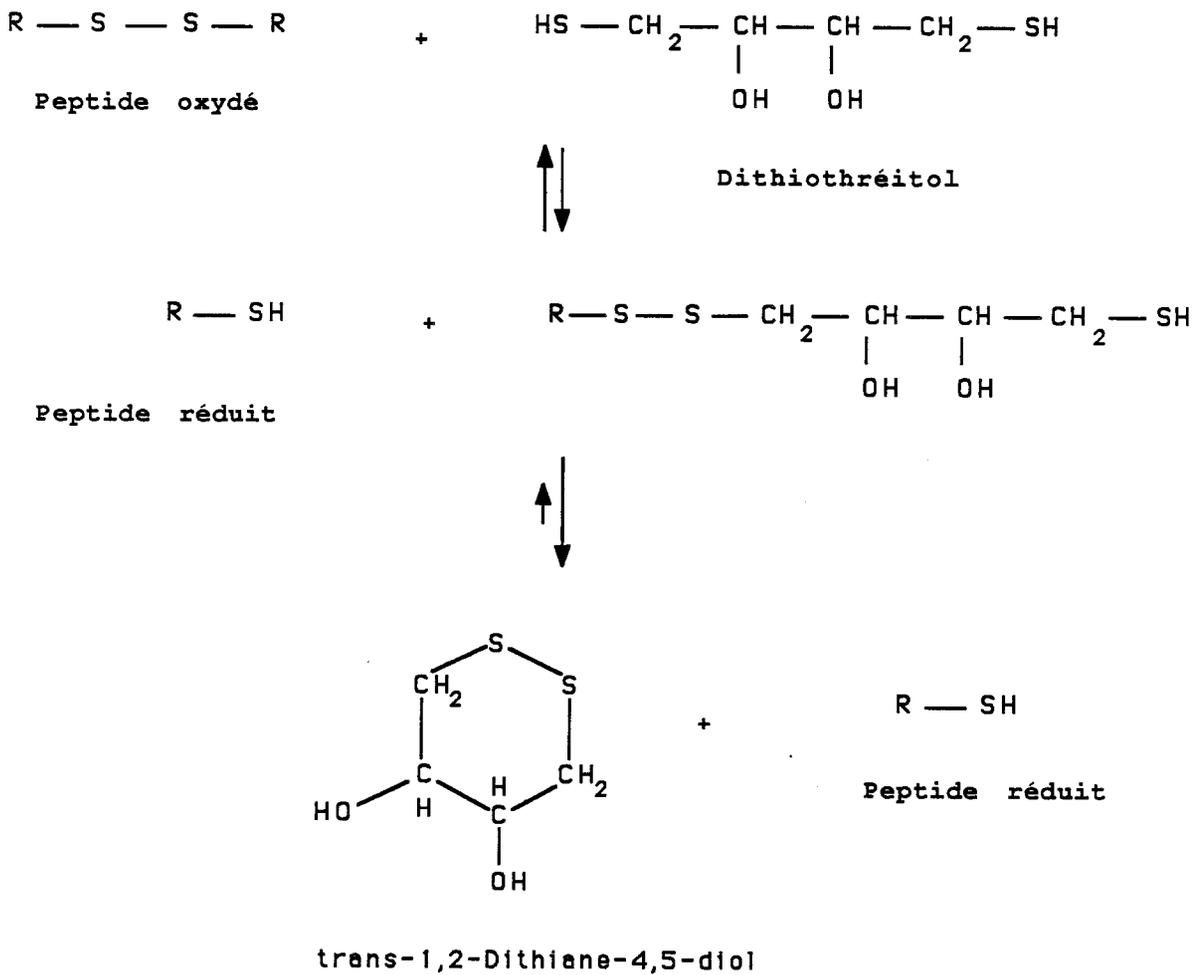


FIGURE 62 Réduction des peptides par le dithiothréitol

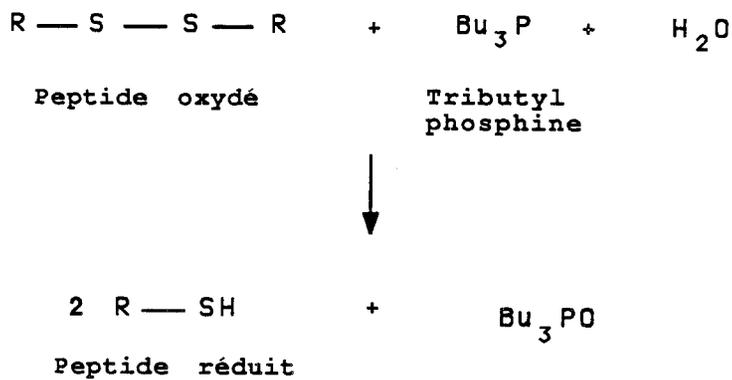


FIGURE 63 Réduction des peptides par la tributylphosphine

cyclique à 6 sommets est énergétiquement favorisée (Figure 62). En pratique, la réduction est opérée à pH 8, la quantité de DTT employée est de 10 à 50 équivalents par rapport aux ponts disulfures.

La tributylphosphine est un agent spécifique de clivage des ponts disulfures. Elle est fréquemment utilisée pour la réduction de protéines avant alkylation (RUEGG 1977, FONTANA). La spécificité de la réaction permet de n'utiliser qu'un faible excès molaire par rapport aux ponts disulfures (Figure 63). La réduction est effectuée de préférence à pH neutre ou alcalin, la vitesse de transformation étant beaucoup plus faible en milieu acide.

2) CARACTERISATION DU CONJUGUE

Après couplage et purification il est nécessaire de connaître la composition du conjugué qui sera utilisé comme immunogène.

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées:

- Dosage de la protéine par la méthode de Folin, associé à un dosage indirect du peptide couplé.

Le peptide non couplé, récupéré après dialyse du milieu réactionnel est quantifié par analyse d'acides aminés; on en déduit ainsi la quantité de peptide impliqué dans la formation du conjugué. Connaissant la quantité de protéine et de peptide on peut calculer le taux de fixation et le rendement de couplage.

- Analyse d'acides aminés quantitative du conjugué.

C'est cette deuxième méthode, de type direct, que nous avons préféré utiliser. Deux analyses d'acides-amino sont réalisées en parallèle, l'une sur l'anatoxine tétanique (AT) de départ, l'autre sur le conjugué. L'analyse de l'AT nous indique les concentrations relatives d'acides-amino qui constituent la protéine. En se basant sur la quantification d'un ou plusieurs acides-amino n'appartenant pas à la séquence du peptide couplé, on peut évaluer la part d'acides-amino de la protéine qui entre dans la composition du conjugué. En retranchant dans l'analyse du conjugué, les valeurs correspondant à la protéine on en déduit la quantité de peptide fixé présent dans l'échantillon. De même que précédemment on peut alors évaluer le taux de fixation et le rendement de couplage.

3) IMMUNISATIONS

Les animaux utilisés pour la production d'anticorps sont des lapins de type New Zealand dont la masse sanguine importante permet des prélèvements d'un volume satisfaisant.

Les conjugués sont employés en mélange avec un adjuvant dont le rôle est d'augmenter le pouvoir immunogène. L'adjuvant le plus utilisé pour l'immunisation animale est l'adjuvant complet de Freund (FCA), constitué d'une suspension de mycobactéries dans un mélange d'huiles minérales. Le FCA associe deux propriétés:

- de par son caractère hydrophobe, il reste au point d'injection et retarde la diffusion du conjugué,
- d'autre part, les mycobactéries provoquent une stimulation non spécifique du système immunitaire, augmentant ainsi la réponse au conjugué.

Le solvant d'injection utilisé est une émulsion huile dans eau 1/1 (v/v) de FCA et de conjugué en solution dans du sérum physiologique stérile.

La quantité injectée est exprimée en μg de peptide couplé. L'immunisation est réalisée de façon régulière, à intervalles de quinze jours selon le protocole suivant:

- deux injections de 400 μg en sous-cutané sur le dos rasé du lapin
- injections suivantes, 200 μg en intra-musculaire dans le fessier.

Les prélèvements sanguins sont effectués environ six semaines après la première injection, puis tous les quinze jours en alternance avec les immunisations.

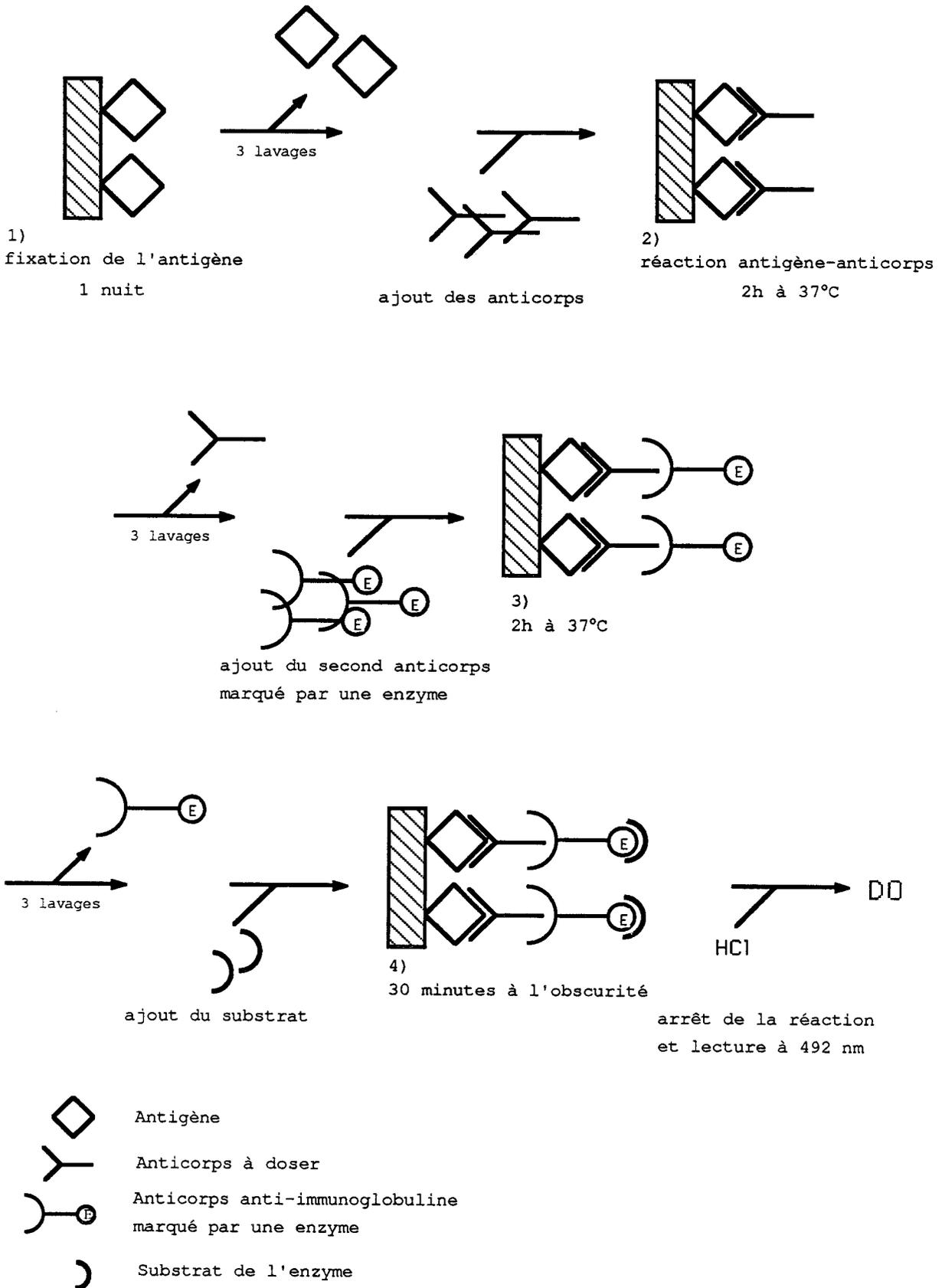


FIGURE 64 Dosage des immunosérums par la technique ELISA

C) TESTS IMMUNOLOGIQUES

1) *TITRATION DES IMMUN-SERUMS*

1.1- Principe

Le dosage des sérums antipeptides est réalisé selon la méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Cette méthode est caractérisée par l'emploi d'un anticorps lié de façon covalente à une enzyme. L'enzyme est choisie de telle sorte que la transformation de son substrat fournit un produit facilement quantifiable, le plus souvent un produit coloré.

Dans la méthode que nous avons utilisée, l'anticorps lié à l'enzyme reconnaît spécifiquement les immunoglobulines de lapin et permet de quantifier le complexe antigène-anticorps formé lors du contact peptide/immun-sérum de lapin (Figure 64).

1.2- Dosage ELISA sur microplaque

Le dosage ELISA est effectué sur des microplaques qui permettent la réalisation simultanée de 96 points. Chaque ajout de réactif est précédé d'un lavage par le solvant d'incubation afin d'éviter la formation de complexes parasites qui interféreraient avec le dosage.

- La première étape correspond à l'immobilisation de l'antigène sur le support grâce à des liaisons de type hydrophobe. Le peptide doit saturer tous les sites de la plaque afin d'éviter ultérieurement la fixation non spécifique d'autres réactifs. Si la saturation n'est pas satisfaisante on peut procéder à une

saturation de sécurité par une protéine différente de la protéine porteuse, ou le Tween 20.

- Différentes dilutions des sérums à doser sont ensuite ajoutées. Après incubation et lavage, seuls les anticorps liés spécifiquement au peptide sont retenus sur la plaque.

- La troisième étape consiste en l'addition de l'anticorps anti-immunoglobuline de lapin. Pour notre étude nous avons utilisé un anticorps de chèvre marqué à la peroxydase.

- L'addition des substrats de l'enzyme, peroxyde d'hydrogène et l'orthophénylène diamine, provoque le développement d'une réaction colorée dont l'évolution est stoppée par l'acide chlorhydrique.

- L'absorbance est ensuite lue à 492 nm.

Le titre ELISA est exprimé par le degré de dilution du sérum qui donne une absorbance égale à l'unité.

1.3- Résultats: Evolution des titres antipeptide

Pour la production d'anticorps anti-PKC nous avons dans un premier temps immunisé cinq lapins par sous-type d'enzyme, référencés de L1 à L15. Ultérieurement, seuls les individus présentant une bonne réponse aux conjugués ont été conservés. Les immunisations ont été interrompues après quelques mois, puis reprises pour les nécessités des études immunologiques.

SERUMS ANTI-PKC α

Date	L 11	L 12	L 13	L 14	L 15
4/2/88	400	720	460	130	180
2/3/88	500	1 000	1 050	130	140
9/3/88	560	2 500	2 220	320	500
20/5/88	13 180	16 600	17 780	3 980	2 240
31/5/88	10 000	112 000	14 450	2 000	5 600
17/6/88	6 310	100 000	15 850	5 010	2 510
20/7/88	7 940	22 390	38 020	†	†
//					
7/12/88	†	15 850			
9/1/89		15 850	7940		
3/3/89		19 950	15 850		

SERUMS ANTI-PKC β

Date	L 1	L 2	L 3	L 4	L 5
26/9/87	2510	790	1 000	2 500	1 800
8/10/89	6 310	1 780	3 160	6 310	5 010
24/10/88	1 580	< 1 000	1 260	1 000	< 1 000
23/11/88	1 260	520	660	700	760
//					
20/5/88	17 780	4 680	15 140	5 620	19 060
31/5/88	19 950	4 470	66 070	7 940	33 890
17/6/88	15 850	3 980	95 500	5 010	17 780
20/7/88	60 256	†	123 0230	†	38 900
//					
7/12/88	7 950		†		†
13/1/89	19 953				
3/3/89	24 000				

SERUMS ANTI-PKC γ

Date	L 6	L 7	L 8	L 9	L 10
23/3/88	< 2 000	< 2 000	< 2 000	< 2 000	< 2 000
24/4/88	9 500	24 000	7 500	7 900	22 400
20/5/88	10 00	79 430	30 200	7 080	31 620
31/5/88	19 950	72 440	25 120	12 590	30 200
17/6/88	12 590	69 180	17 780	7 940	25 700
19/7/88	†	34 670	34 670	†	35 480
//					
7/12/88		†			11 220
9/1/89			100 000		15 850
3/3/89			74 130		21 878

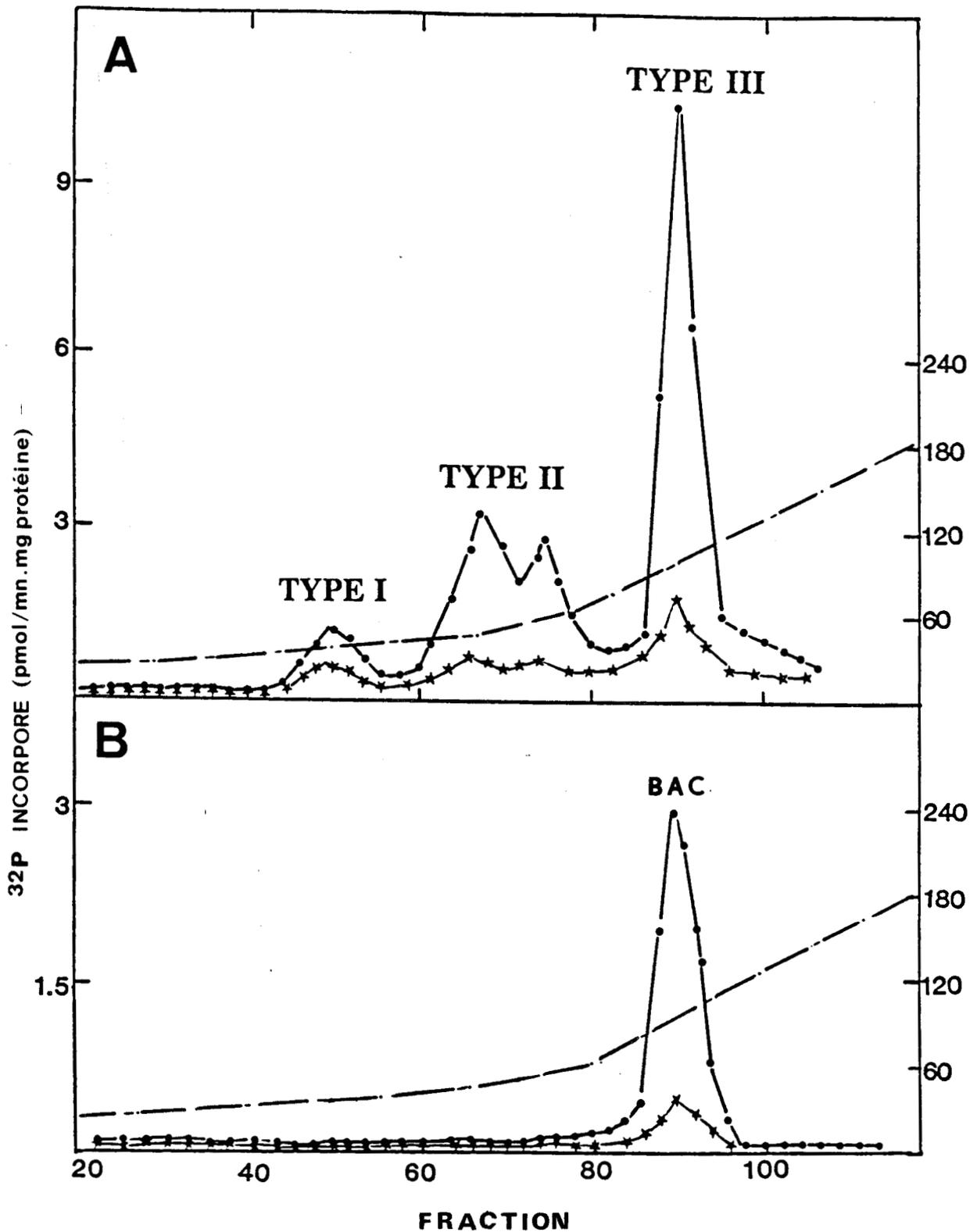


FIGURE 65 Activité kinasique des fractions issues de la purification par HPLC sur hydroxyapatite de PKC de cerveau de rat (A) ou de surrénales de boeuf (B).

Elution: gradient linéaire de 10 à 180 mM de phosphate de potassium. (— · —)
 Activité PKC vis à vis des histones en absence (— * —) ou en présence (— • —) du mélange PS/DAG/Ca²⁺. Les isoformes sont désignées d'après leur ordre d'éluion Type I, II et III pour la PKC de cerveau de rat, et BAC pour la PKC de surrénales de boeuf.

2) CARACTERISATION DES SOUS-TYPES DE PKC PAR LES ANTICORPS

La spécificité des immun-sérums vis à vis des différents sous-types de PKC a été étudiée par J.M. PELOSIN dans le laboratoire de Biochimie des Régulations Cellulaires Endocrines dirigé par le Pr. E. CHAMBAZ, à Grenoble.

2.1- Purification de la PKC - Séparation des isoformes (PELOSIN 1987)

La PKC extraite de cerveau de rat a été purifiée jusqu'à homogénéité apparente en trois étapes:

- chromatographie sur DEAE cellulose
- gel filtration sur ACA 44
- chromatographie sur phényl sépharose.

La séparation des isoformes est obtenue lors d'une quatrième étape de purification par HPLC sur hydroxyapatite. Le chromatogramme d'éluion (Figure 65) révèle la présence de quatre isoformes, dont deux ne sont pas totalement résolues. En nous reportant à la publication de KIKKAWA (1987a), qui a identifié chaque sous-type après leur séparation dans des conditions analogues, il est raisonnable d'avancer que les formes successivement éluées correspondent au:

- Type I codé par le gène γ
- Type II, contenant les deux formes codées par les gènes $\beta 1$ et $\beta 2$
- Type III codé par le gène α

Les mêmes étapes de purification appliquées à la PKC issue du cortex surrénal de boeuf n'a permis d'isoler qu'un seul pic dont l'élution est analogue à celle du pic III.

2.2- Caractérisation des isoformes par Western-Blotting

2.2.1- Principe

Le Western Blotting associe les techniques d'électrophorèse, d'électrotransfert et d'immunochimie.

La première étape correspond à une migration sur gel d'électrophorèse, de l'antigène susceptible d'être reconnu par l'immun-sérum (ou les anticorps purifiés). La protéine est dissoute ou diluée dans un tampon qui lui confère une charge négative. Elle est ensuite déposée sur le gel et soumise à un courant électrique; dans ces conditions sa vitesse de migration est directement proportionnelle à sa masse moléculaire. Cette étape permet une bonne séparation des différents constituants protéiques, si l'antigène utilisé n'a pas été préalablement purifié. De plus, l'utilisation de témoins de masse moléculaire permet d'évaluer si la protéine reconnue par les anticorps correspond bien à la protéine recherchée.

La deuxième étape consiste à transférer les constituants du gel sur un support utilisable pour la réaction immunologique, le plus souvent la nitrocellulose. Le gel est mis en contact avec le support et le transfert est obtenu par action d'un courant électrique.

FIGURE 66

Avant d'ajouter l'immunsérum, les sites de fixation restés libres sont saturés afin d'éviter une fixation non spécifique. La feuille de nitrocellulose est alors mise en contact avec une dilution des sérums à tester, puis les complexes antigène-anticorps formés sont révélés par un second anticorps anti-immunoglobuline marqué (enzyme, élément radioactif, chromophore).

2.2.2- Résultats

Conditions d'analyse:

- Les antigènes utilisés pour le Western Blotting sont les trois sous-types I, II et III ainsi que la PKC issue du cortex surrénal (BAC = Bovine Adrenal Cortex).
- L'électrophorèse a été réalisée en milieu dénaturant (Dodécyl Sulfate de Sodium).
- La faculté de reconnaissance et la spécificité des anticorps anti-PKC α , β et γ a été évaluée à partir des sérums bruts.
- L'anticorps permettant de révéler les immuncomplexes est un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin, marqué à la peroxydase.
- Cette méthode est sensible pour des quantités de protéines de l'ordre du nanogramme.

Chaque sérum a permis de visualiser spécifiquement une protéine présentant une masse moléculaire égale à celle de la PKC (Figure 66). Aucune réaction croisée n'a été observée entre les différents sérums qui reconnaissent respectivement:

anti- α : le type III et la PKC "BAC"

anti- β : le type II

anti- γ : le type I.

La spécificité des anti-sérums vis à vis des sous-types confirme les identités que nous avons suggérées précédemment.

2.3- Conclusion

Nous avons pu grâce à des immunogènes synthétiques, produire des anticorps reconnaissant spécifiquement les trois principaux sous-types de PKC dans les tests de Western Blotting. Notons cependant que cette étude réalisée sur des isoformes dénaturées ne prouve pas que les protéines natives soient reconnues. L'utilisation de ces anticorps doit être élargie à des études sur cellules dans des tests d'immunofluorescence ou d'immunocytochimie. Ils devraient constituer de bons outils pour la caractérisation des sous-types de PKC dans les tissus, et éviter les étapes de purification habituellement nécessaires, irréalisables sur de faibles quantités de protéine.

CONCLUSION

Nos travaux basés sur la chimie des peptides nous ont permis d'aborder l'étude de la PKC et de ses différents sous-types selon deux thèmes: d'une part la préparation d'anticorps spécifiques des différentes isoformes, et d'autre part la recherche d'inhibiteurs spécifiques de l'enzyme.

Des zones non homologues ont été sélectionnées dans la séquence des différents sous types de PKC, et reproduites par synthèse peptidique. Greffés sur une protéine porteuse ces peptides ont été utilisés comme immunogènes et ont induit la production d'anticorps. Ces anticorps reconnaissent spécifiquement en western-blotting, les isoformes purifiées correspondantes α , β ou γ sans réaction croisée. Leur utilisation pour la caractérisation de PKC d'origines différentes est autorisée par la très forte homologie retrouvée entre sous-espèces animales.

L'étude des protéines et peptides substrats décrits dans la littérature nous a permis d'ébaucher des règles régissant la reconnaissance par la PKC. Les résidus phosphorylés, sérines et dans une moindre mesure thréonines, sont situés dans un environnement basique constitué d'arginines ou de lysines. Ces résidus peuvent être situés en position C-terminale, N-terminale ou des deux côtés du résidu phosphorylable. L'affinité croît avec le nombre de résidus basiques. Nous avons recherché la spécificité vis à vis de la PKA, kinase pour laquelle les règles de reconnaissance sont plus strictes, et qui phosphoryle sérines ou thréonines incluses dans la séquence Arg-Arg-X-Ser/Thr.

L'étude de peptides synthétiques préparés au laboratoire nous a permis de mieux cerner les critères de reconnaissance par

la PKC: l'affinité d'un peptide substrat présentant un cluster de 6 arginines en position C-terminale du résidu phosphorylable, n'est pas accrue par l'addition d'arginines en position N-terminale où par contre, la présence de résidus acides réduit fortement l'affinité d'un substrat, même si sa séquence comprend de nombreux résidus basiques.

Nous avons observé que la spécificité de la PKC pour ses substrats ne pouvait être appliquée à des molécules inhibitrices. Le remplacement du résidu sérine d'un substrat polyarginine spécifique de la PKC, par un résidu alanine fournit un inhibiteur dont la spécificité est perdue puisqu'il inhibe la PKA dans la même gamme de concentrations; d'autre part, contrairement aux substrats, l'affinité est accrue lorsque l'on passe de 6 à 10 résidus arginines dans la séquence.

La modification d'inhibiteurs polyarginines par incorporation d'un résidu susceptible de mimer la sérine et de restaurer la spécificité perdue, ne nous a pas fourni les résultats escomptés. Une autre possibilité d'inhibition du site substrat de l'enzyme était offerte grâce au pseudosubstrat, séquence incluse dans la partie régulatrice de toutes les sous-espèces de PKC et supposée responsable de l'inhibition de la PKC en absence d'activateur. L'étude de rétro-inverso peptides correspondant à cette séquence nous a montré que l'affinité de la PKC pour les substrats était aussi liée à la structure du squelette peptidique (enchaînement d'acides aminés de série L), et à la présence d'un résidu phosphorylable. Nous avons obtenu un inhibiteur spécifique de la PKC, le rétro-inverso [Ser²⁵] PKC (19-31) ($K_i = 4 \mu\text{M}$), résistant à l'action des enzymes protéolytiques et devant présenter une durée de vie satisfaisante pour les expérimentations cellulaires.

Les résultats obtenus avec les substrats et les inhibiteurs nous ont montré que l'affinité était maximale pour une structure de substrat réunissant: un squelette peptidique naturel, des résidus à chaîne latérale basique et un résidu phosphorylable. A partir de ces éléments nous avons développé le concept d'inhibiteur bisubstrat, associant dans une même structure un substrat peptidique spécifique de la PKC et un analogue d'ATP interdisant la réaction de phosphorylation. Nous avons utilisé en tant qu'analogue d'ATP, la structure 5-isoquinoléine sulfonamide commune à une famille d'inhibiteurs de kinases, et avons recherché en parallèle des composés à structure isoquinoléique présentant à la fois une activité inhibitrice intéressante et une fonction permettant leur ancrage en position N-terminale d'un peptide. Nous avons pu d'après cette étude déduire que l'activité de ces analogues d'ATP dépendait de la présence d'une fonction amine primaire ou secondaire en γ de la fonction sulfonyle portée par l'isoquinoléine.

L'ancrage de ces analogues d'ATP en position N-terminale d'un peptide substrat de type Ser-Arg₆, nous a fourni de bons inhibiteurs.

- L'addition d'une structure isoquinoléique inactive à un substrat peptidique a fait apparaître une activité inhibitrice nettement supérieure à la somme des activités des molécules séparées. Le meilleur composé de la série, Isoq-SO₂- β Ala₂-Ser-Arg₆ présente une activité analogue à celle du meilleur composé commercial (H7) vis à vis de la PKC, et nettement supérieure pour la PKA.

- L'ancrage sur la même structure peptidique d'un analogue d'ATP présentant une activité inhibitrice intrinsèque, nous a fourni un inhibiteur 10 fois plus actif sur ces deux enzymes (I₅-Ser-Arg₆),

avec un K_i dans la gamme du nanomolaire pour la PKA.

Ces résultats prouvent que l'association covalente de deux structures inactives ou faiblement actives peut conduire à de puissants inhibiteurs. Cependant, dans le cadre de ce travail, nous n'avons pu prouver que ces composés agissaient réellement en tant que bisubstrats. La réunion d'un substrat spécifique de la PKC et d'un analogue d'ATP a conduit à un gain d'affinité, mais dans une proportion plus importante pour la PKA. L'analogie de relations structure-activité observée pour les analogues de l'ATP (structures à isoquinoléine-sulfonyle) et les composés bisubstrats qui en sont issus, suggère que ces derniers n'agissent que par interaction avec le site ATP des deux protéines kinases. Bien que le concept de bisubstrat nous ait fourni des molécules très actives, le mode d'action n'est pas celui escompté, et le gain d'affinité lié à la présence de la partie peptidique semble correspondre à une interaction peptide/site ATP.

Nous n'avons pu expliquer pourquoi ces composés ne se comportaient pas en tant que bisubstrat. Il est possible que leur structure ne permette pas l'accès simultané des deux demi-molécules à leur site respectif. Deux hypothèses sont envisageables:

- la distance séparant les deux substrats est insuffisante. Dans ce cas, l'allongement de l'espaceur reliant les deux substrats devrait accroître fortement l'affinité pour la PKC sans modifier de façon sensible l'affinité pour la PKA.

- la configuration du bisubstrat potentiel n'est pas adaptée à la structure du site actif. Les molécules que nous avons préparées sont obtenues par ancrage de l'analogue d'ATP en position N-terminale du peptide. Il serait intéressant d'étudier des composés dans lesquels l'analogue d'ATP est greffé sur la chaîne

latérale d'un amino-acide (par exemple une lysine), de telle sorte que son orientation par rapport au squelette peptidique soit différente. L'acide aminé porteur pourrait être placé en remplacement du résidu sérine ou à proximité de ce résidu. Ces conditions permettraient peut être une meilleure disposition relative des deux substrats.

Dans ce cadre, l'utilisation non plus du substrat peptidique Ser-Arg₆, mais de la séquence du pseudosubstrat de la PKC, pourrait favoriser l'apparition d'une spécificité pour la PKC. En effet contrairement à la structure Ser-Arg₆, dont la spécificité de substrat PKC est perdue quand elle est testée en tant qu'inhibiteur, le pseudosubstrat n'a aucune activité inhibitrice vis à vis de la PKA. La bonne affinité que présente le pseudosubstrat pour la PKC, associée à la spécificité d'inhibition pourraient être mises à profit pour la préparation de bisubstrats, dans lesquels l'analogue d'ATP est incorporé au niveau d'une chaîne latérale d'acide aminé.

L'intérêt à terme, d'inhibiteurs de la PKC est leur utilisation en milieu biologique en particulier cellulaire. Pour cela deux propriétés sont essentielles: la possibilité de traverser les membranes, et la stabilité au métabolisme cellulaire. Les analogues rétro-inverso du pseudosubstrat répondent à la seconde condition, par contre leur caractère hydrophile les rend inaptes à pénétrer dans les cellules. L'association d'une structure de ce type résistant à la protéolyse, à un analogue de l'ATP contenant un noyau isoquinoléine hydrophobe, pourrait constituer un bon compromis résistance enzymatique, caractère lipophile et spécificité PKC.

PARTIE EXPERIMENTALE

A) METHODES GENERALES

1) PREPARATION DES REACTEURS

La résine a tendance à adhérer aux parois des réacteurs, ce qui diminue le contact avec les réactifs et provoque des pertes lors des transferts de récipients. Pour éviter ce phénomène, la vaisselle de verre est préalablement silanisée selon les étapes suivantes:

- lavage à l'acide nitrique concentré
- lavage 15 minutes à la lessive de soude
- contact une nuit avec une solution de dichloro-diméthylsilane à 5 % dans le chlorure de méthylène.
- rinçage au chlorure de méthylène, à l'isopropanol puis à l'acétone.

2) FIXATION DU PREMIER AMINO-ACIDE SUR UNE RESINE CHLOROMETHYLEE (GISIN 1973)

Le tBoc-amino-acide à greffer, utilisé avec un excès de 1,2 par rapport à la charge de la résine, est mis en solution dans un mélange éthanol/eau (4/1). Le pH est ajusté à 7 par le carbonate de césium à 20 % dans l'eau. Le sel de césium du tBoc-amino-acide est ensuite séché sous vide et repris trois fois dans le toluène. L'eau résiduelle est ainsi éliminée par distillation azéotropique. Le résidu d'évaporation est dissous dans le DMF (Gold Label) et ajouté à la résine chlorométhylée. Le mélange est maintenu 24 heures sous agitation à 50°C.

En fin de réaction la résine est lavée par filtration selon le protocole suivant:

DMF	3 x 3'
DMF/Eau (1/1)	3 x 3'
DMF/Ethanol (1/1)	3 x 3'
Ethanol	3 x 3'
Méthanol	3 x 3'

Les sept premiers lavages sont conservés et évaporés afin d'effectuer un dosage des chlorures libérés.

3) DETERMINATION DE LA CHARGE D'UNE AMINO-ACYL RESINE

3.1- Dosage des chlorures selon la méthode de Charpentier-Vohlard

Après fixation du premier amino-acide sur une résine chlorométhylée, les eaux de lavage de la résine sont évaporées et reprises par 100 ml d'eau distillée.

A un volume précis de cette solution (5 ml pour une masse habituelle de 10 g de résine), sont ajoutés:

- 25 ml d'AgNO₃ 0,05 N
- 10 ml d'HNO₃ 6 N
- 1 ml de nitrobenzène

L'excès d'AgNO₃ est dosé en retour par le thiocyanate de potassium (KSCN 0,05 N) en présence d'alun de fer ammoniacal (1 ml). Connaissant la quantité d'acide aminé fixé sur la résine et donc la prise de poids, on peut calculer la charge réelle exprimée en mEq/g.

3.2- Dosage des fonctions amines libres

Le dosage des fonctions amines libres est utilisé à différents stades de la synthèse peptidique:

- En début de synthèse pour la détermination de la charge d'une benzhydrylamine résine (préalablement neutralisée), ou d'une résine chlorométhylée (après fixation du premier acide aminé).
- En cours de synthèse, pour évaluer la quantité réelle de peptide en élongation, en particulier après incorporation d'acides aminés difficiles à coupler ou susceptibles de provoquer un arrêt de croissance de la chaîne.

Dans les deux derniers cas, c'est à dire lorsque un ou plusieurs acides aminés sont déjà présents sur la résine, les fonctions amines sont préalablement régénérées par élimination du groupement tBoc, selon le protocole suivant:

Déprotection

TFA 50 %	dans CH ₂ Cl ₂	1 x 1,5'
TFA 50 %	dans CH ₂ Cl ₂	1 x 20'

Neutralisation

CH ₂ Cl ₂	2 x 3'
DIEA 5 % dans CH ₂ Cl ₂	3 x 3'
CH ₂ Cl ₂	2 x 3'

3.2.1- Dosage à l'acide picrique selon la méthode de GISIN (1972, HANCOCK 1975)

Cette méthode permet de quantifier les fonctions amines grâce à la fixation spécifique de l'acide picrique, ensuite déplacé par une base forte, la diisopropyléthylamine (DIEA).

100 à 200 mg de résine pesée avec précision sont déposés sur un fritté et traités par les réactifs suivants:

acide picrique 0,1 M dans CH ₂ Cl ₂	3 x 3'
CH ₂ Cl ₂	2 x 3'
DIEA 5 %	3 x 3'
CH ₂ Cl ₂	2 x 3'

Les filtrats contenant le picrate de DIEA (8 derniers lavages) sont recueillis et amenés à un volume final de 100 ml. L'absorbance de la solution est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 358 nm.

Connaissant le coefficient d'extinction molaire du picrate de DIEA ($\epsilon_{\max} = 14000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) on peut calculer la charge de la résine en fonctions amines.

3.2.2- Dosage à la ninhydrine selon la méthode de KAISER (SARIN 1981)

La ninhydrine est un réactif spécifique des fonctions amines primaires, qui fournit à chaud un chromophore bleu-noir.

Ce dosage nécessite la préparation des solutions suivantes:

Solution A = solutions 1 + solution 2 (1/10)

- Solution 1: phénol à 4 g/ml dans l'éthanol absolu.

- Solution 2: 2 ml de KCN 10^{-2} M dans l'eau distillée, ajusté à 100 ml dans la pyridine distillée.

Solution B: solution de ninhydrine à 50 mg/ml dans l'éthanol absolu.

Solution C: chlorure de tétraéthylammonium 0,5 M dans le chlorure de méthylène distillé.

La réaction est effectuée dans un tube de verre, sur 2 à 5 mg de peptidyl-résine pesée avec précision. Les volumes de réactifs et de solvants utilisés sont adaptés à la quantité de fonctions amines à doser:

- de 0 et 0,1 μ moles

La résine est additionnée de 100 μ l de solution A et 25 μ l de solution B. Après 10 minutes de chauffage à 100°C la réaction est stoppée sous un courant d'eau froide.

Après addition de 1 ml d'éthanol à 60 % dans l'eau, le mélange est filtré sur laine de verre et lavé deux fois par 200 μ l de solution C. Le volume est ensuite amené à 2 ml avec l'éthanol à 60 %.

- de 0,1 à 2 μ moles

Après chauffage la résine est reprise dans ce cas par 2 ml d'éthanol à 60 %. La résine filtrée est lavée deux fois par 500 μ l de solution C, le filtrat est amené à 25 ml avec l'éthanol à 60 %.

L'absorbance des échantillons mesurée à 570 nm permet de déduire la charge en fonctions amines de la résine (coefficient d'extinction molaire du chromophore $\epsilon = 1,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4) ELONGATION DE LA CHAÎNE PEPTIDIQUE

Les peptides sont préparés à l'aide de synthétiseurs automatiques ou semi-automatiques assistés par ordinateur. Connaissant la séquence à préparer et la quantité de résine mise en jeu, un logiciel mis au point au laboratoire permet de préparer un cahier de synthèse qui indique pour chaque couplage la quantité d'acide-amino et le mode d'activation à utiliser. Un extrait du cahier de synthèse du peptide PKC Alpha est donné dans le chapitre B.3.1.

L'addition de chaque amino-acide est réalisée selon le protocole suivant:

déprotection et neutralisation

CH ₂ CL ₂	2 x 2'
TFA 50 % dans CH ₂ Cl ₂	1 x 2'
TFA 50 % dans CH ₂ Cl ₂	1 x 30'
CH ₂ CL ₂	4 x 2'
DIEA 5 % dans CH ₂ CL ₂	3 x 2'
CH ₂ CL ₂	3 x 2'

contrôle de la déprotection (test de Kaiser ou Christensen)

couplage

lavages après couplage

DMF	3 x 2'
CH ₂ CL ₂	3 x 2'

contrôle du couplage (test de Kaiser ou Christensen)

Si la réaction est toujours incomplète après deux couplages successifs, les fonctions amines n'ayant pas réagi sont acétylées par l'anhydride acétique (Ac-O-Ac) en présence de DIEA:

CH ₂ Cl ₂	2 x 2'
AcOAc 5 %, DIEA 2,5 % dans CH ₂ Cl ₂	1 x 10'
CH ₂ Cl ₂	3 x 2'

4.1- Activation de l'acide aminé

Les agents de couplage utilisés, DCC et HOBt nécessitent une purification préalable. L'HOBt est recristallisé dans le méthanol et conservé à l'abri de la lumière; la DCC est dissoute dans l'éther éthylique, filtrée et séchée.

Pour le couplage, l'HOBt faiblement soluble dans le chlorure de méthylène est dissous dans le DMF; la DCC est dissoute dans le solvant de couplage, chlorure de méthylène ou DMF. La quantité de réactifs employée est de 2,5 équivalents par rapport à la charge de la résine.

4.1.1- Formation d'un ester activé d'HOBt

La solution de DCC, et la solution d'HOBt additionnée de 2,5 Eq d'acide-amino à coupler, sont préincubées séparément 10 minutes à 0 °C, puis mélangées et incubées de nouveau 10 minutes à 0°C. La solution filtrée afin d'éliminer la dicyclohexylurée (DCU) formée, est ensuite ajoutée à la peptidyl-résine.

4.1.2- Formation d'anhydride symétrique

La solution de DCC (2,5 Eq), et une solution de 5 Eq d'acide-amino dans le chlorure de méthylène sont préincubées 10 minutes à 0°C puis mélangées. Après élimination de la DCU, le solvant est évaporé sous vide, l'anhydride symétrique est repris par le DMF et ajouté à la peptidyl-résine.

4.2- Contrôles après déprotections et couplages

4.2.1- Test de KAISER (1970)

Ce test est effectué dans des tubes de verre sur quelques mg de peptidyl-résine; un témoin ne contenant pas de résine est toujours préparé en parallèle.

Il nécessite la préparation de trois solutions:

Solution 1: phénol à 4 g/ml dans l'éthanol absolu.

Solution 2: cyanure de potassium 10^{-3} M (dans l'eau) à 2 % dans la pyridine distillée.

Solution 3: ninhydrine à 50 mg/ml dans l'éthanol.

Les tubes sont additionnés de 3 gouttes de chaque solution et incubés 5 minutes à 110°C. Le développement d'une couleur bleue dans la suspension traduit la présence sur la résine, d'amines primaires dont la concentration est proportionnelle à l'intensité de la coloration.

Après déprotection ce test doit être positif, donc bleu foncé; après couplage ce test doit être négatif c'est à dire que la suspension reste jaune.

4.2.2- Test de CHRISTENSEN (1979)

Ce test permet de révéler la présence de fonctions amines primaires ou secondaires. Sa sensibilité étant inférieure à celle du test de Kaiser on ne l'utilise qu'après déprotection et couplage sur une proline.

A quelques grains de peptidyl-résine, sont ajoutés:

- 200 μ l d'acétone (remplacés par 200 μ l d'acétaldéhyde pour la détection d'amines primaires)

- 50 μ l de 2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone (chloranil) solution saturée dans le toluène.

La suspension est agitée 5 minutes à température ambiante. La présence d'amines secondaires est révélée par la coloration des grains de résine en bleu-vert, la solution restant jaune. Le test est négatif si aucune coloration n'apparaît sur la résine.

5) INCORPORATION D'UNE STRUCTURE ARYL-SULFONYLE EN POSITION N-TERMINALE D'UN PEPTIDE

Les structures aromatiques utilisées lors de nos travaux, dansyl et 5-isoquinoléine sulfonyl, sont amenées sous-forme de sulfochlorure et greffées en phase solide dans des conditions analogues à celles d'une synthèse peptidique classique. Seul l'agent de couplage utilisé est différent: le sulfochlorure est activé par un équivalent de triéthylamine. Le couplage est réalisé dans le chlorure de méthylène avec 2,5 excès de réactifs par rapport à la charge de la peptidyl-résine. L'évolution de la réaction est suivie par le test de KAISER à la ninhydrine.

6) COUPURE DE LA LIAISON PEPTIDE-RESINE

La coupure est réalisée grâce à l'action du fluorure d'hydrogène anhydre (HF). Ce composé toxique pour le manipulateur et très corrosif pour le verre, est employé dans une installation de téflon, isolée sous une hotte de plexiglass.

Les quantités de réactifs utilisés sont, pour 1 gramme de peptidyl-résine:

10 ml d'HF,

1 ml de para-crésol ou d'anisole,

1 ml de diméthylsulfure si la séquence comporte un amino-acide oxydable (Méthionine ou Tryptophane).

L'HF gazeux est congelé en présence de fluorure de cobalt dans un premier réacteur plongeant dans l'azote liquide. Après retour à température ambiante, l'HF est distillé et congelé dans un deuxième réacteur contenant la peptidyl-résine, le para-crésol et

éventuellement le diméthylsulfure. La température est ensuite ramenée et maintenue à 0°C. Après une heure d'agitation, l'HF est chassé sous vide et piégé dans la chaux sodée.

Le peptide est précipité à l'éther éthylique, et le mélange peptide/résine est lavé sur fritté par l'éther puis l'acétate d'éthyle afin d'éliminer le maximum de p.crésol. Le peptide est ensuite solubilisé par des solutions aqueuses d'acide acétique (5 à 50 % selon son caractère hydrophobe) et lyophilisé pour fournir le "peptide brut".

7) ANALYSE D'ACIDES AMINES

L'analyse d'acides aminés est réalisée en deux étapes:

- hydrolyse acide totale du peptide, qui réalise la coupure de toutes les liaisons amides,
- analyse du mélange d'amino-acides obtenu, par comparaison à un mélange standard.

Les quantités d'amino-acides mises en jeu étant faibles (environ 10 µg de peptide), afin d'éviter toute contamination les manipulations sont réalisées avec des gants dans de la verrerie pyrolysée.

Selon l'échantillon à analyser, différents protocoles d'hydrolyse sont utilisés, mais les conditions sont identiques:

- l'hydrolyse est réalisée dans un tube présentant une ouverture latérale pour la mise sous-vide, fermé à son sommet par un bouchon vissé.
- après addition des réactifs, le mélange est successivement mis sous azote puis tiré sous-vide afin d'éliminer les traces d'oxygène. Cette opération est réitérée deux fois, puis le milieu

est maintenu sous-vide pendant toute la durée de l'hydrolyse.

7.1- Hydrolyse sur résine

L'analyse sur peptidyl-résine permet de s'assurer en cours de synthèse que le peptide en élongation ne présente pas une séquence aberrante: délétion ou excès d'un amino-acide.

A 0,5 mg de peptidyl-résine sont additionnés:

- 1 ml d'HCl 12 N
- 1 ml d'acide propionique.

Le mélange est porté à 130°C pendant 2 heures.

7.2- Hydrolyse des peptides

Selon la quantité de peptide disponible, l'hydrolyse peut être réalisée selon deux protocoles différents.

* hydrolyse en phase liquide

Dans un tube à hydrolyse on ajoute:

- 0,5 mg de peptide
- 0,5 ml d'eau ultra-pure
- 0,5 ml d'HCl 12 N
- quelques gouttes de phénol qui évite l'oxydation des amino-acides.

Le mélange mis sous vide est porté à 110°C pendant 24 heures ou éventuellement 72 heures si le peptide contient un enchaînement d'acides aminés hydrophobes.

* hydrolyse phase gaz

Une solution de 10 nmoles de peptide est déposée dans un microtube de verre et additionnée de 10 µl de phénol. Le mélange est séché sous-vide; le microtube est ensuite introduit dans un tube à hydrolyse contenant 10 µl d'acide thioglycolique et 200 µl d'HCl 5,6 N. Le tout est porté 24 heures à 110 °C sous vide.

Cette hydrolyse peut aussi être réalisée en série sur une vingtaine de tubes. Comme précédemment, le peptide en solution et le phénol sont préalablement séchés dans un microtube. Tous les microtubes sont placés dans un dessiccateur, sur le fond duquel est posé un bécher contenant 2 ml d'HCl 5,6N et 150 µl d'acide thioglycolique. Après mise sous-vide, le dessiccateur est placé dans une étuve à 110°C pendant 24 heures.

7.3- Analyse d'acides aminés

L'hydrolysate est d'abord évaporé sous-vide, puis repris par un volume précis d'eau ultra-pure (milli-Q). Une fraction de la solution contenant environ 5 nanomoles d'acides aminés est alors injectée sur une colonne échangeuse d'ions. Les acides aminés séparés sont quantifiés en sortie de colonne après couplage à la ninhydrine. Les résultats obtenus sont exprimés en nanomoles d'acide-amino.

L'appareillage utilisé au laboratoire est un analyseur Beckman system 7300.

8) CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les chromatographies sont réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'une fine couche de silice (Merck).

Les solutions de peptide sont déposées en spot au bas de la plaque (à environ 1 cm du bord) et évaporées. On réalise toujours en parallèle le maximum de témoins permettant de localiser le peptide recherché: peptide au stade de purification précédent, réactifs susceptibles de contaminer le peptide, etc..

Le solvant de migration le plus couramment utilisé est le système APAW: acide acétique, pyridine, acétate d'éthyle, eau (1/1/1/1). Les proportions et la composition sont bien entendu adaptées en fonction de la séquence peptidique à analyser.

Après migration les plaques sont séchées et révélées.

8.1- Révélation par masquage de fluorescence

Ce type de révélation nécessite l'utilisation de gel de silice contenant un composé fluorescent à 254 nm. Exposée à un rayonnement UV de longueur d'onde appropriée, la plaque acquiert un aspect vert pâle luminescent, la présence du peptide ou de tout autre composé se traduit par une tache sombre.

Cette technique est utilisable avant migration, et permet d'évaluer la quantité de peptide à déposer. Elle ne nécessite pas de révélateur spécifique, de ce fait elle ne différencie pas avec certitude le peptide d'un contaminant non peptidique.

8.2- Révélation à la ninhydrine

La ninhydrine réagit spécifiquement avec les fonctions

amines, elle permet donc de localiser les peptides présentant une fonction N-terminale libre, ou contenant un ou plusieurs résidus lysines.

On pulvérise sur la plaque la solution suivante:

- ninhydrine: 1 g
- éthanol: 375 ml
- acide acétique: 75 ml
- collidine: 15 ml

La plaque est ensuite chauffée 3 minutes dans une étuve à 110°C, les fonctions amines sont révélées par l'apparition de taches bleues.

8.3- Révélation par le réactif de Reindel-Hoppe (VON ARX 1976)

Le réactif de Reindel-Hoppe permet une détection spécifique des fonctions amides. Ce test est plus sensible que le test à la ninhydrine, il peut être utilisé pour les peptides dont la fonction N-terminale est bloquée.

La révélation est réalisée selon le protocole suivant:

- pulvérisation d'hypochlorite de sodium à 8 %
- neutralisation de l'excès par l'acide acétique à 20 %
- chauffage 1 minute à 110°C
- pulvérisation du mélange suivant en proportion 1/1 (v/v)
 - * tétraméthylldiaminodiphénylméthane (TDM) à 5 % (p/v) dans l'acide acétique à 20 %
 - * iodure de potassium à 5 % dans l'eau distillée.

9) TESTS DE PHOSPHORYLATION

Les réactifs suivants ont été obtenus chez SIGMA: Histones IIIS et IIA, phosphatidylsérine, diacylglycérol, unité catalytique de la protéine kinase A (ne nécessitant pas la présence d'AMPC). La protéine kinase C utilisée est un mélange non résolu des différentes isoformes; la première partie de nos travaux a été réalisée avec la PKC de cerveau de rat purifiée par Isabelle VILGRAIN (Laboratoire de Régulations Cellulaires et Endocrines, CEN de Grenoble), nous avons ensuite utilisé la PKC de cerveau de boeuf purifiée par Thierry GRAND-PERRET (Centre de Recherches GLAXO, Les Ulis).

Tous les réactifs autres que les enzymes sont dissous dans un tampon tris 50 mM (pH 7,5 pour PKC et 7,0 pour PKA). Les peptides à tester (substrats et inhibiteurs) sont mis en solution à la concentration 10^{-3} M, aliquotés et congelés. Les inhibiteurs de type H7, insolubles dans l'eau sont préalablement dissous dans le DMSO dont la concentration finale est 5 % (v/v) à la concentration en inhibiteur 10^{-3} M.

Les phospholipides dissous dans le chloroforme sont séchés sous courant d'azote et mis en suspension (micelles) dans le tampon tris/HCl.

9.1- Milieu réactionnel

Le milieu réactionnel (80 μ l), est composé comme suit:

* Protéine Kinase C

MgCl ₂	5 mM
CaCl ₂	0,5 mM
ATP	10 μ M
[γ ³² P]ATP	qsp 1 million de cpm
Phosphatidylsérine	50 μ g/ml (= 65 μ M)
Diacylglycérol	5 μ g/ml (= 8 μ M)
PKC	0,5 μ g/ml
Tris/HCl 50 mM	pH 7,5
Peptide substrat ou inhibiteur	en concentration variable.

Les tests d'inhibition sont réalisés en présence d'un substrat peptidique ou protéique:

	Histones III S	60 μ g/ml
ou	Peptide "GS 1-12"	12 μ M

* Protéine kinase A

MgCl ₂	5 mM
ATP	10 μ M
[γ ³² P]ATP	qsp 1 million de cpm
PKA (Unité catalytique)	1 μ g/ml (30 UI/ml)
Tris/HCl 50 mM	pH 7,0
Peptide substrat ou inhibiteur	en concentration variable.

Les tests d'inhibition sont réalisés en présence d'un substrat peptidique ou protéique:

	Histones II A	60 μ g/ml
ou	Kemptide	8 μ M

9.2- Incubation

Le temps d'incubation est choisi dans la zone où la vitesse de réaction est égale à la vitesse initiale, c'est à dire que le taux de réaction est directement proportionnel au temps.

Le temps choisi est de 7 minutes pour tous les tests.

9.3- Séparation du substrat phosphorylé

Après incubation, la réaction est stoppée par acidification du milieu et le substrat phosphorylé doit être séparé de l'ATP radiomarqué afin d'évaluer la quantité de radioactivité incorporée. Deux méthodes sont couramment utilisées:

9.3.1- Séparation sur papier échangeur d'ions

La réaction est arrêtée par addition de 20 μ l d'acide trichloroacétique (TCA) à 12 %. Après homogénéisation, 50 μ l de chaque échantillon sont déposés sur un carré de papier échangeur d'ions (papier de phosphocellulose Whatman P 81, 2 cm x 2 cm).

On procède ensuite à 3 lavages de 15 minutes par l'acide phosphorique 75 mM. Dans ces conditions, l'ATP chargé négativement est éliminé, par contre les molécules, peptide ou protéine, possédant au moins 3 charges positives sont retenues sur le papier.

Cette méthode est la seule utilisable pour les petits peptides qui ne sont pas précipitables par le TCA.

Les papiers sont ensuite séchés et déposés dans des fioles à scintillation. La radioactivité est ensuite comptée en présence de liquide scintillant.

9.3.2- Séparation par précipitation au TCA

La précipitation au TCA est réservée à la séparation des protéines, elle est favorisée par la présence d'une seconde protéine précipitable telle que la caséine ou la BSA. La réaction est réalisée dans des tubes de polypropylène, directement utilisables pour le comptage de radioactivité. Après incubation l'isolement de la protéine phosphorylée se déroule selon les étapes suivantes:

- Précipitation par addition de 30 μ l de caséine (ou de BSA) à 30 mg/ml, puis de 1 ml de TCA à 12 %.
- Centrifugation 10 minutes à 2000 rpm
- Elimination du surnageant
- Solubilisation du culot par 100 μ l de soude 1M
- Agitation 1 minute
- Précipitation par 1 ml de TCA à 12 %
- Centrifugation 15 minutes à 2000 rpm
- Elimination du surnageant
- Solubilisation du culot par 100 μ l de soude 1M
- Agitation 1 minute
- Addition de 1 ml d'aqualyte
- Comptage de la radioactivité

10) COUPLAGE D'UN PEPTIDE SUR UNE PROTEINE PORTEUSE

10.1- Préparation de la protéine porteuse

Avant utilisation, l'anatoxine tétanique (AT) doit être dialysée avec le solvant de couplage afin d'éliminer toute trace de formol utilisé pour sa conservation. La dialyse est effectuée sur une membrane de type YM5.

La solution de protéine est ensuite concentrée et dosée selon la méthode de Lowry.

10.2- Couplage au glutaraldéhyde (AVRAMEAS 1969/1978)

Le glutaraldéhyde fournit une liaison entre deux fonctions amines. L'AT contient environ 700 nmoles de lysines par mg, mais cette protéine étant partiellement formylée, on estime la quantité réelle de lysines accessibles à 250 nmoles/mg. La BSA contient environ 800 nmoles de lysines par mg, la quantité de résidus accessibles est estimée à 50 %, soit 400 nmoles.

Le peptide est utilisé avec un excès de 3 par rapport au nombre de lysines. Le glutaraldéhyde de masse 100 est utilisé avec un excès de 10 par rapport au nombre de lysines.

La protéine est mise en solution ou dialysée dans le chlorure de sodium à 0,9 %, le peptide est ensuite ajouté à la solution de protéine et le pH est ajusté à 8,2 par le carbonate monosodique. Le glutaraldéhyde est additionné par fractions de 2 équivalents réparties sur cinq jours consécutifs. Le milieu

réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Après couplage l'excès de réactifs (peptide non couplé et glutaraldéhyde) est éliminé par dialyse sur membrane YM5 dans du sérum physiologique stérile (NaCl 0,9 %), et la solution de conjugué est concentrée jusqu'à un volume compatible avec le mode d'immunisation utilisé.

10.3- Couplage avec le 6-maléimidocaproate de N-hydroxysuccinimide (MCS) (LEE 1980)

Le couplage par le MCS permet de former une liaison entre une fonction amine et une fonction thiol.

Le MCS est utilisé avec un excès de 5 par rapport au nombre de lysines accessibles de la protéine. Le peptide réduit est ajouté avec un excès de 2 par rapport à la capacité de fixation de la protéine.

10.3.1- Préparation du MCS

La réaction d'estérification de l'acide maléimidocaproïque par le N-hydroxysuccinimide est activée par la DCC. Les trois composés sont utilisés en quantité équimolaire. Les masses molaires sont respectivement:

- acide maléimidocaproïque: 211 g
- N-hydroxysuccinimide: 115 g
- DCC: 206 g.

Acide maléimidocaproïque et N-hydroxysuccinimide d'une part, DCC d'autre part, sont dissous dans un volume minimal d'acétate d'éthyle et préincubés 10 minutes à 0°C. Les deux solutions sont

ensuite mélangées et maintenues sous agitation, 1 heure à 0°C puis 4 heures à température ambiante. En fin de réaction la DCU formée est éliminée par centrifugation. La solution d'ester est ensuite évaporée et reprise par l'acétonitrile à - 10°C, conditions dans lesquelles la DCU résiduelle est insoluble. Après centrifugation, le surnageant est évaporé et stocké, ou directement ajouté à la protéine porteuse.

10.3.2- Activation de la protéine porteuse

La protéine porteuse est dissoute ou dialysée dans un tampon phosphate 0,1 M / NaCl 0,9 % (PBS) à pH 6,6. Le MCS est ajouté à cette solution et le contact est maintenu une nuit à température ambiante.

La protéine activée est purifiée par dialyse sur membrane YM5 et dosée selon la méthode de Lowry. La capacité de fixation des groupements thiols est évaluée par retour selon la méthode d'Ellman: la protéine est mise en contact avec une quantité connue de cystéine, après réaction la quantité de cystéine résiduelle est mesurée par comparaison à une gamme étalon. On en déduit la quantité de cystéine fixée par la protéine.

10.3.3- Réduction du peptide

La régénération des fonctions thiols du peptide est obtenue par l'action d'un réducteur, le plus utilisé est le dithiotréitol (DTT) et dans une moindre mesure la tributylphosphine. L'ensemble des solutions utilisées pendant et après la réduction doivent être dégazées afin de limiter au maximum la présence d'oxygène.

* Réduction par le DTT (CLELAND 1964, KONIGSBERG 1972)

Le peptide sous forme disulfure est réduit par 50 équivalents de DTT (masse moléculaire 154 g) dans un tampon phosphate 0,1M pH 8 à 9. La cinétique de la réduction peut être suivie par HPLC analytique. De façon générale, la solution est maintenue sous agitation pendant une nuit puis ramenée à pH 3 afin d'éviter la réoxydation du peptide.

Le peptide est séparé du DTT par gel filtration dans l'acide acétique à 5 % puis lyophilisé et conservé sous azote.

* Réduction par la tributylphosphine (FONTANA)

La tributylphosphine, en solution à 10 % dans le n-propanol, est utilisée avec un excès de 1,5 par rapport aux ponts disulfures (masse moléculaire = 202 g).

Le peptide est dissous dans un tampon phosphate salin (PBS) à pH 6,6; le contact est maintenu une heure, puis la tributylphosphine volatile est éliminée par bullage d'azote.

L'avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas les étapes de gel filtration et de lyophilisation; cependant la toxicité de la tributylphosphine exige de manipuler avec précaution sous une hotte ventilée.

10.3.4- Réaction de couplage

Le peptide réduit est ajouté à la solution de protéine porteuse activée. Le mélange est maintenu à pH 6,6 une nuit à température ambiante. Le conjugué est ensuite purifié par dialyse contre du sérum physiologique stérile.

Pendant toutes les étapes de préparation du conjugué il

faut s'assurer que le pH ne soit pas basique car l'élévation du pH au dessus de 8,5 provoque l'hydrolyse du maléimide en acide maléique.

11) DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE LOWRY (1951)

Ce dosage nécessite la préparation des solutions suivantes:

Solution A:	CuSO ₄	500 mg
	H ₂ SO ₄	1 goutte
	Eau milli-Q	qsp 100 ml
Solution B:	Na ₂ CO ₃	2 g
	Tartrate Na/K	20 mg
	NaOH 0,1 N	qsp 100ml
Solution C:	Solution A	1 ml
	Solution B	50 ml

Le dosage de la protéine est réalisé en parallèle avec celui d'une gamme étalon de BSA, constituée de 6 points contenant respectivement: 0 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100 µg de protéine.

Le volume des solutions de protéine (gamme étalon et protéine à doser) est amené à 1 ml par de l'eau milli-Q.

Chaque tube est additionné de 3 ml de solution C. Après 10 minutes d'incubation à l'obscurité, on ajoute dans chaque tube 0,5 ml de réactif de Folin® dilué au 1/2. Le mélange est homogénéisé et maintenu 30 minutes à l'abri de la lumière.

L'absorbance des solutions est lue par spectrophotométrie à 750 nm.

12) DOSAGE DES FONCTIONS THIOLS PAR LE REACTIF D'ELLMAN (HABEEB)

Cette méthode a été utilisée:

- pour évaluer le taux de réduction des peptides
- pour doser par retour la capacité de fixation des protéines fonctionnalisées par le MCS.

Le réactif d'Ellman (acide (5,5'-dithiobis) 2-nitro-benzoïque ou DTNB), est un disulfure aromatique qui réagit spécifiquement avec les thiols aliphatiques pour fournir par échange un disulfure mixte. Cette réaction libère un anion 2-nitro 5-thiobenzoate qui présente une couleur jaune intense (coefficient d'absorption molaire = $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 412 nm).

Toutes les solutions utilisées pour ce dosage sont préalablement dégazées et saturées en azote. Une gamme étalon, constituée de 11 points allant de 0 à 2 mM en cystéine, est préparée à partir d'une solution extemporanée de chlorhydrate de cystéine 2 mM (350,4 g/l) dans l'eau milli-Q.

100 μl de chaque échantillon sont additionnés de:

- 300 μl de tampon Tris/HCl 0,2M pH 8,2 (24,2 g/l de Tris-hydroxyméthyl-aminométhane ajusté au pH 8,2 par HCl 1N).
- 20 μl d'une solution de DTNB à 3,96 mg/ml dans l'éthanol.
- méthanol qsp 2 ml

Après trente minutes, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 412 nm.

* Pour évaluer un taux de réduction, le test est effectué sur 100 à 150 nmoles de peptide pour se situer dans la zone la plus fiable de la gamme étalon.

* Pour évaluer la consommation en cystéine d'une protéine activée, 200 nmoles de cystéine sont ajoutées à une quantité de protéine activée dont la capacité de fixation est supposée de 125 nmoles. La quantité de cystéine consommée est donnée par la différence d'absorbance entre le point de la gamme étalon à 200 nmoles et l'échantillon de protéine activée.

13) DOSAGE DES IMMUN-SERUMS SELON LA METHODE ELISA

Les tests sont réalisés sur des plaques EIA (Enzyme Immuno Assay) Nunc[®], constituées de 8 colonnes de 12 puits d'un volume de 300 µl.

Deux systèmes de tampon solvant peuvent être utilisés:

- le tampon phosphate salin 0,1 M pH 7,4 (ou PBS = phosphate-buffered saline)

NaH ₂ PO ₄ , 1H ₂ O	3,53 g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	13,43 g
NaCl	8,00 g
Eau distillée	qsp 1 l

- le tampon Tris/NaCl pH 8

Trishydroxyméthyl-aminométhane	1,8 g
NaCl	9,0 g
Eau distillée	qsp 1 l
HCl 1N	pour ajuster à pH 8

Ces tampons sont utilisés pour l'étape de fixation de l'antigène sur la plaque. Pour les étapes suivantes (lavages et incubations),

ils sont additionnés de 1 % de BSA ou de 0,5 ml/l de Tween 20 (dans le cas où la BSA a été utilisée comme protéine porteuse), afin de saturer les sites de fixation non spécifique de la plaque.

Deux séries de témoins sont réalisées en parallèle avec le dosage des immun-sérums:

1) Dans les premiers, l'immun-sérum est remplacé par un sérum préimmun, ceci permet de confirmer la spécificité de la réaction observée.

2) Dans les deuxièmes, l'addition de sérum est omise. On évalue ainsi la fixation non spécifique de l'antiglobuline de chèvre sur l'antigène ou la plaque.

Les différentes étapes se déroulent de la façon suivante:

- Fixation de l'antigène

100 µl d'une solution de peptide à 5 µg/ml sont déposés dans chaque puits, l'incubation est réalisée à température ambiante pendant une nuit.

- Trois lavages

- Formation du complexe antigène-anticorps

Les différents sérums à tester, immun-sérum et sérum normal témoin sont dilués dans le tampon; 100 µl de chaque solution sont déposés dans les puits. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 2 heures.

- Trois lavages

- Fixation de l'antiglobuline sur les immun-complexes

L'anticorps de chèvre antiglobuline de lapin marqué à la peroxydase (Diagnostic Pasteur) est dilué à 1/10 000 dans le tampon, 100 µl de cette solution sont déposés dans les puits et maintenus en incubation 2 heures à 37°C.

- Addition des substrats de l'enzyme

Cette dernière étape est réalisée dans un tampon phosphate-citrate pH 5,5:

NaH ₂ PO ₄ , 1H ₂ O	1,76 g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	6,71 g
Acide citrique	4,2 g
Eau distillée	qsp 700 ml

On dépose dans chaque puits 100 µl de la solution suivante:

peroxyde d'hydrogène à 110 volumes	16 µl
orthophénylène diamine	75 mg
tampon phosphate citrate pH 5,5	25 ml

- Arrêt de la réaction

Après 30 minutes d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, l'évolution de la réaction est stoppée par addition de 100 µl d'HCl 1N.

- Lecture de l'absorbance à 492 nm

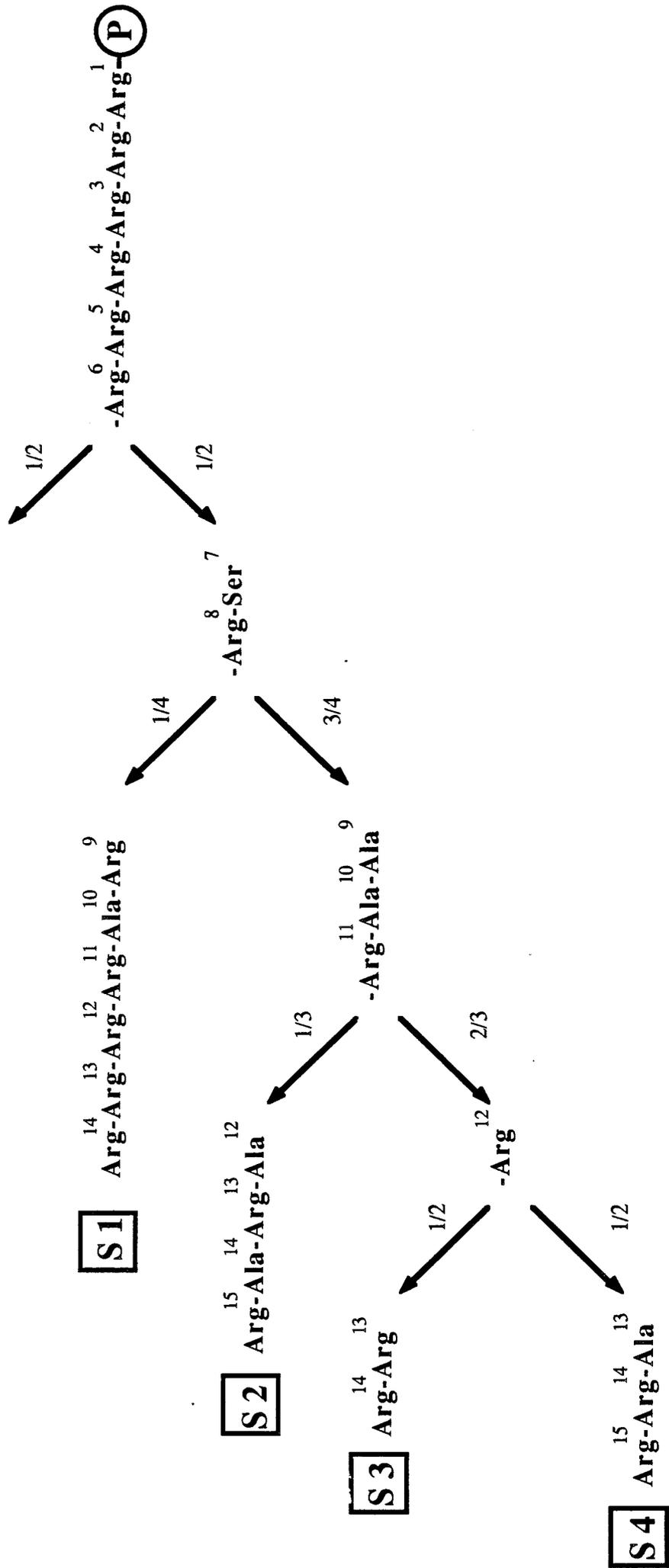


FIGURE 67 Stratégie de synthèse des substrats S1, S2, S3 et S4

B) EXEMPLES DE SYNTHÈSES

1) PRÉPARATION DES QUATRE PEPTIDES SUBSTRATS DE LA PKC: S 1, S 2, S 3 et S 4

1.1- Synthèse

Ces quatre peptides présentent une séquence C-terminale analogue et ont de ce fait, été préparés à partir d'une même peptidyl-résine. La Figure 67 retrace les différentes étapes de synthèse.

Nous avons utilisé une résine "P-Arg", issue du couplage d'une tosyl arginine sur une chlorométhyl-résine. La première étape a consisté à préparer un stock important de "P-Arg₆" utilisable pour des synthèses ultérieures.

Les quantités de réactifs employés sont les suivantes:

* 12,4 g de P-Arg chargée à 0,541 mEq/g soit 6,708 mEq.

* amino-acide et agents de couplage en excès de 2,5, soit par couplage:

- 3455 mg de DCC
- 2544 mg d'HOBt
- 8067 mg de tBoc-tosyl arginine

Après incorporation de la sixième arginine, la peptidyl-résine a été répartie en deux lots, dont l'un a été utilisé pour la préparation de la séquence commune, c'est à dire jusque l'arginine en 8.

Quantité de réactifs utilisés par couplage:

- 1727 mg DCC
- 1283 mg d'HOBt
- 2474 mg de tBoc-O-benzyl sérine

ou - 4033 mg de tBoc-tosyl arginine

La peptidyl-résine a ensuite été de nouveau scindée en fonction des séquences N-terminales.

Chaque peptide a été synthétisé sur 1/8 de la résine initiale, soit 1,55 g à 0,541 mEq/g soit 0,839 mmole.

L'évolution de la synthèse est résumée dans les Tableaux suivants:

Peptide	Amino-acide incorporé	Equivalents mis en jeu	Solvant	Temps de couplage	Acétylation
SEQUENCE COMMUNE	2 = Arg	2,5	DMF *	120'	
	3 = Arg	2,5	DMF *	120'	
	4 = Arg	2,5	DMF *	120'	+
		2,5	"	90'	
		1	"	90'	
	5 = Arg	2,5	DMF *	300'	+
		1,25	"	120'	
		1,25	"	90'	
	6 = Arg	2,5	DMF *	120'	+
		2,5	"	700'	
7 = Ser	2,5	DCM	120'		
8 = Arg	2,5	DMF *	720'		
S I	9 = Arg	2,5	DMF *	120'	+
		1,25	"	900'	
		1	"	120'	
	10 = Ala	2,5	DCM	900'	
	11 = Arg	2,5	DMF *	180'	
	12 = Arg	2,5	DMF *	180'	
		1	"	900'	
	13 = Arg	2,5	DMF *	240'	
14 = Arg	2,5	DMF *	900'		

Peptide	Amino-acide incorporé	Equivalents mis en jeu	Solvant	Temps de couplage	Acétylation
S 2 / S 3 / S 4	9 = Ala	2,5	DCM	800'	
		1	DMF	60'	
	10 = Ala	2,5	DCM	120'	+
		2,5	"	840'	
		2,5	"	60'	
	11 = Arg	2,5	DMF *	800'	+
		2,5	"	180'	
S 2	12 = Ala	2,5	DMF	900'	
	13 = Arg	2,5	DMF *	150'	
		1	"	800'	
	14 = Ala	2,5	DMF	120'	
		1,25	"	900'	
	15 = Arg	2,5	DMF *	120'	
		2	"	900'	
	1	"	60'		
S 3 / S 4	12 = Arg	2,5	DMF *	840'	
		2,5	"	120'	
		2,5	"	60'	
S 3	13 = Arg	2,5	DMF *	120'	
		2,5	"	900'	
	14 = Arg	2,5	DMF *	120'	
		2,5	"	900'	
		2,5	"	120'	
S 4	13 = Ala	2,5	DCM	120'	
	14 = Arg	2,5	DMF *	900'	
		2,5	"	90'	
	15 = Arg	2,5	DMF *	120'	

DMF = Diméthylformamide

DCM = Chlorure de méthylène

DMF* = Préincubation des agents de couplage et de l'acide-amino à 0°C

" RENDEMENTS DE SYNTHÈSE "

Peptide	Masse de polymère	Masse théorique de peptide protégé	Masse théorique de peptidyl-résine	Masse de peptidyl-résine obtenue
S 1	1,55 g	3,77 g	5,32 g	2,92 g
S 2	1,55 g	3,36 g	4,91 g	2,57 g
S 3	1,55 g	3,53 g	5,08 g	3,00 g
S 4	1,55 g	3,60 g	5,15 g	2,98 g

Dans tous les cas, la masse de peptidyl-résine obtenue est nettement inférieure à la masse attendue. Ce phénomène est lié à plusieurs paramètres:

- il n'est pas possible de s'assurer que le rendement de couplage atteint 100 %, l'évaluation du taux de réaction est limité par la sensibilité du test de Kaiser,
- plusieurs couplages d'acides aminés ont été suivis d'une acétylation qui a bloqué l'élongation d'une fraction des chaînes peptidiques,
- une quantité importante de peptidyl-résine est utilisée pour les tests de Kaiser systématiques après couplage et déprotection,
- la nécessité de fractionner la peptidyl-résine en lots a occasionné des pertes sur la paroi des réacteurs.

Compte tenu des pertes de résine, on ne connaît la part

réelle de polymère qui entre dans la masse de peptidyl-résine, il est donc impossible de calculer un rendement de synthèse.

Le rendement global "synthèse + coupure HF" peut être calculé en rapportant la masse de peptide brut à la masse théorique de peptide attendu. Mais ce rendement est surévalué car le crésol et le diméthylsulfure ne sont pas totalement éliminés lors du lavage de la résine à l'éther.

Peptide	Masse attendue	Masse obtenue	Rendement
S 1	1718 mg	315 mg	(18 %)
S 2	1635 mg	890 mg	54 %
S 3	1646 mg	1116 mg	68 %
S 4	1707 mg	1120 mg	66 %

Dans le cas du substrat S 1, un incident matériel a endommagé une partie de la peptidyl-résine lors de la coupure à l'HF, ce qui explique la très faible valeur de rendement observée.

1.2- Purification

1.2.1- Gel filtration

Les quatre peptides ont été purifiés dans les mêmes conditions. L'échantillon (peptide brut) dissous dans le solvant d'éluion, a été centrifugé 5 minutes à 4000 rpm. Le surnageant a été déposé sur une colonne de gel filtration.

Conditions de purification:

- taille de la colonne: 2,5 cm de diamètre sur 100 cm de haut

- gel Trisacyl GF05 (IBF)
- solvant d'élution: acide acétique à 5 % dans l'eau distillée
- débit: 6 ml/heure
- longueur d'onde de détection: 237 nm
- sensibilité: 1,28
- fractionnement de l'éluat: 60 minutes par tube

1.2.2- Contrôle de pureté

L'hydrophilie très importante des peptides ne permettait pas une bonne migration en chromatographie sur couche mince; de ce fait les fractions éluées ont été directement analysées par HPLC analytique (Gilson).

Conditions d'analyse:

- phase stationnaire: Nucléosil 100 Å 5 µ C18.
- phase mobile = eau, acétonitrile, acide trifluoroacétique

Solvant A: 990/9/1

Solvant B: 499/500/1

- gradient de solvant:
5 minutes d'isocratique en solvant A, 15 minutes de gradient linéaire de A (100 %) vers B (100 %), 10 minutes d'isocratique en solvant B.
- débit 1 ml/minute
- longueur d'onde 215 nm
- sensibilité 0-0,5

Après contrôle analytique les fractions les plus pures ont été recueillies et lyophilisées.

1.2.3- Contrôle d'identité

La composition de chaque peptide a été confirmée par analyse d'acides aminés; ces résultats sont donnés dans les fiches analytiques des molécules.

La proportion très importante d'arginines dans les peptides ne permettait pas une bonne quantification de cet amino-acide, la séquence de chacun d'eux a de ce fait été déterminée par microséquençage phase gaz.

Exemple: microséquence du peptide S3

quantité déposée = 32 nmoles

n° de cycle	AA attendu	AA obtenu	picomoles
1	Arg	Arg	1950
2	Arg	Arg	2590
3	Arg	Arg	3116
4	Arg	Arg	4015
5	Ala	Ala	3376
6	Ala	Ala	4040
7	Arg	Arg	2468
8	Ser	Ser	2652
9	Arg	Arg	2649
10	Arg	Arg	2550
11	Arg	Arg	2604
12	Arg	Arg	2393
13	Arg	Arg	2596
14	Arg	Arg	1640
15	/	Arg	702

La présence d'une arginine non attendue au 15^e cycle est due au phénomène "d'overlap": présence en faible quantité de l'acide-amino dans le cycle suivant. En effet, la dégradation d'Edman n'est pas complète mais de l'ordre de 97 %. Les 3 % de

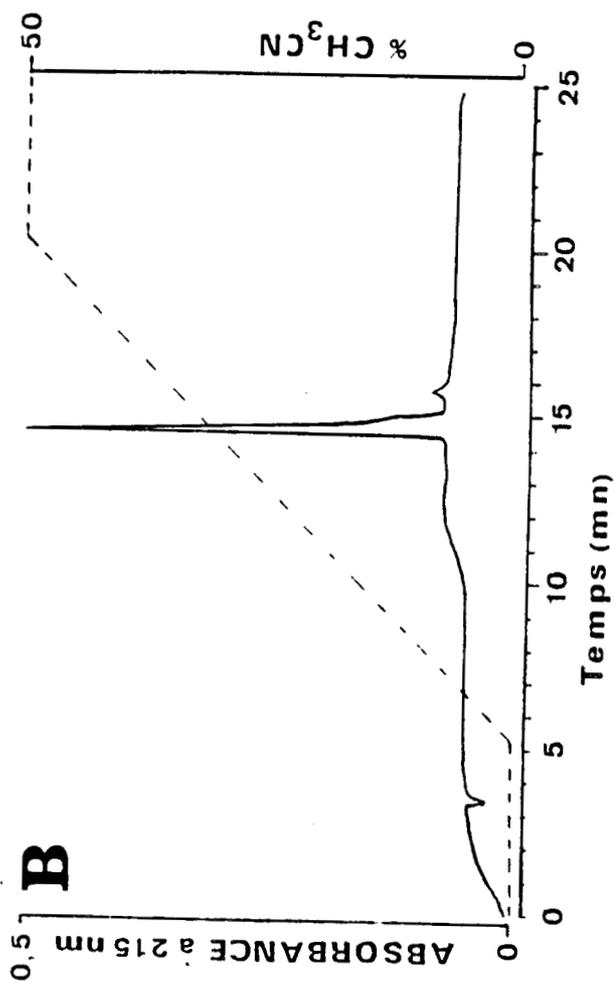
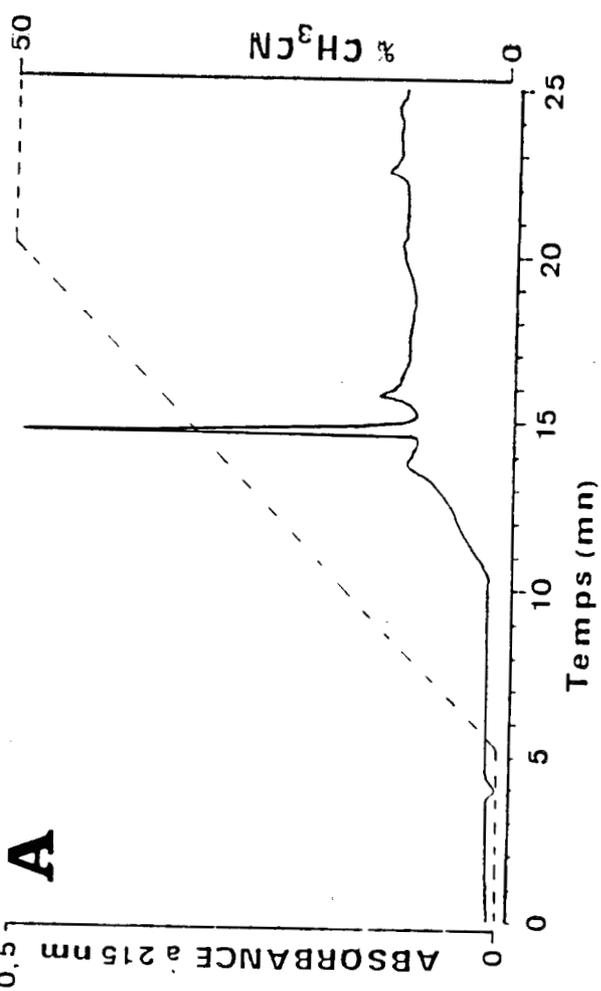


FIGURE 70 HPLC analytique du peptide S2:

(A) Peptide brut, (B) peptide purifié

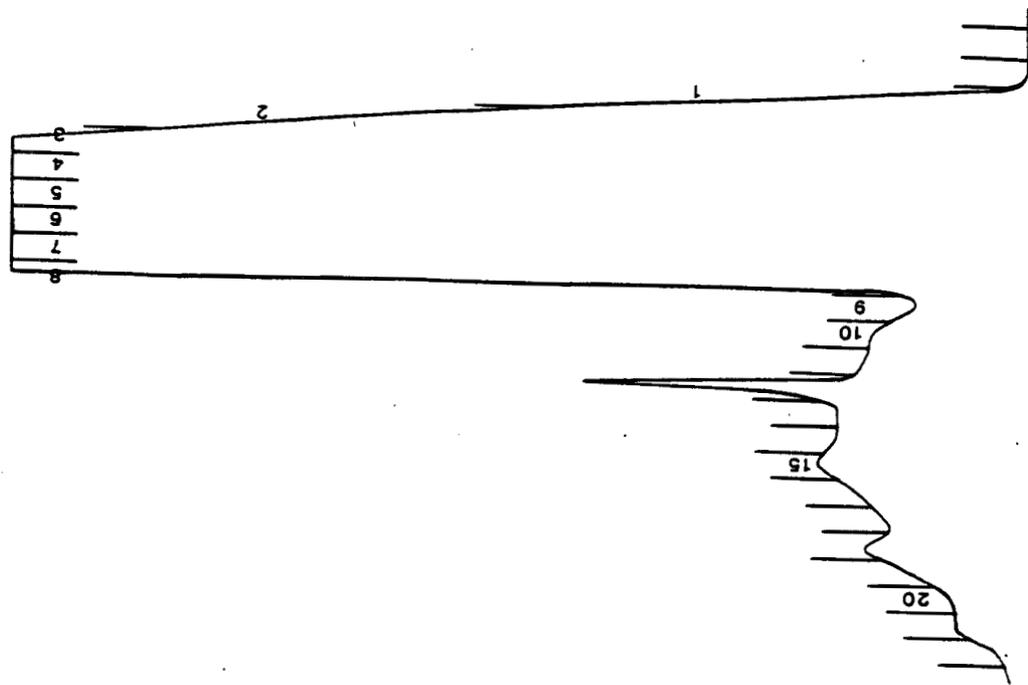


FIGURE 71

Profil de gel filtration du peptide S2

chaînes non modifiées provoquent l'apparition de l'acide aminé dans les cycles suivants. Dans le cas présent, la succession d'un nombre important de résidus arginine accentue le phénomène.

* **Peptide S1** (Figures 68 et 69)

Echantillon déposé: 105 mg de peptide brut.

Tube	% de pureté	Masse obtenue
27	100	29,2 mg
28	100	
29	95	
30	92	43,6 mg
31	92	
32	98	

Gel filtration de S1

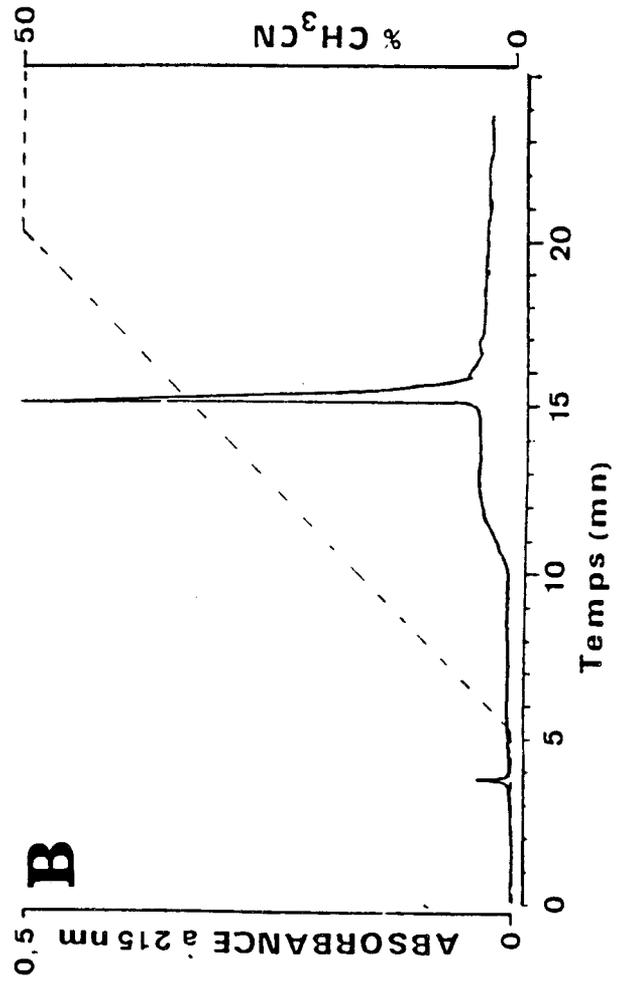
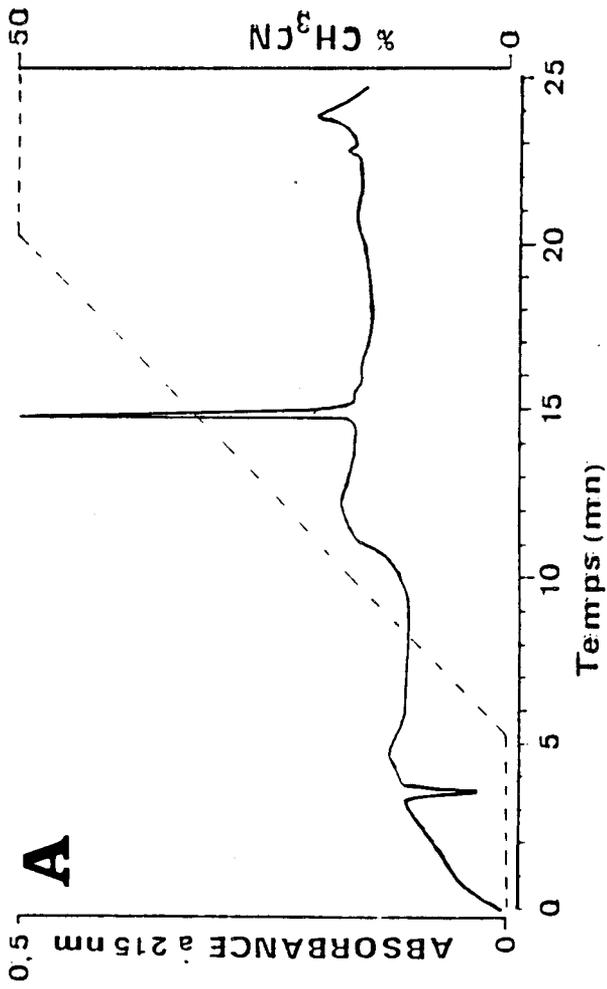


FIGURE 68 HPLC analytique du peptide S1:

(A) Peptide brut, (B) peptide purifié

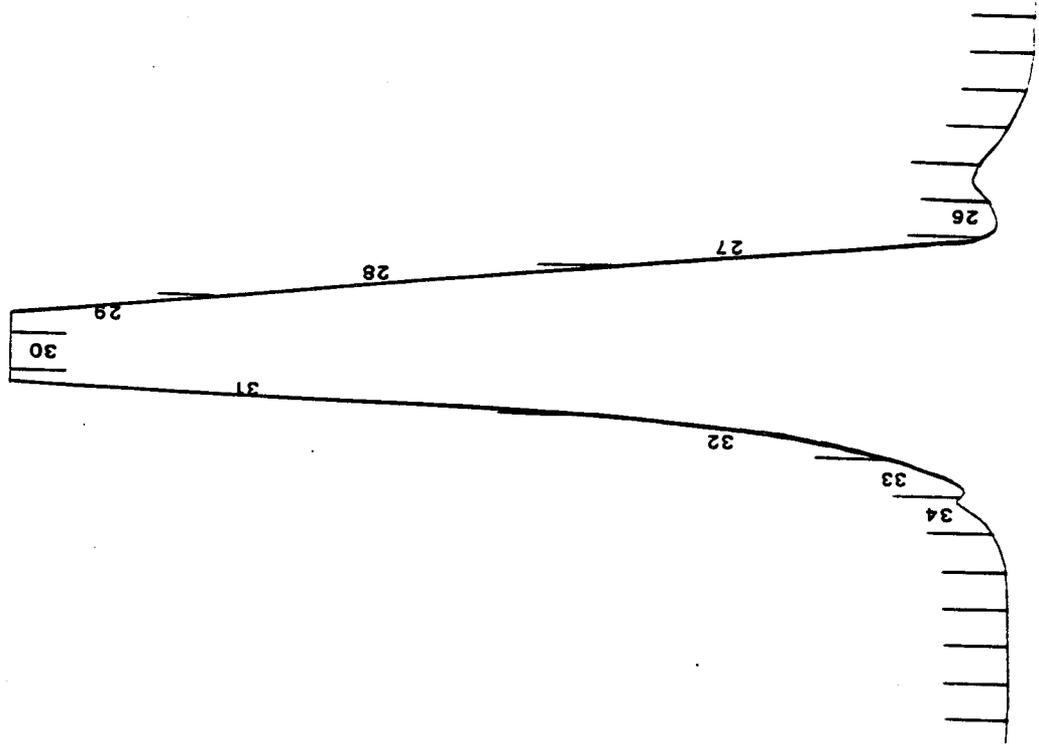


FIGURE 69

Profil de gel filtration du peptide S1

*** Peptide S2** (Figures 70 et 71)

Echantillon déposé: 201 mg de peptide brut.

Tube	% de pureté	Masse obtenue
2	95	70,3 mg
3	95	
4	95	
5	95	
6	89	81,0 mg
7	81	
8	26	

Gel filtration de S2

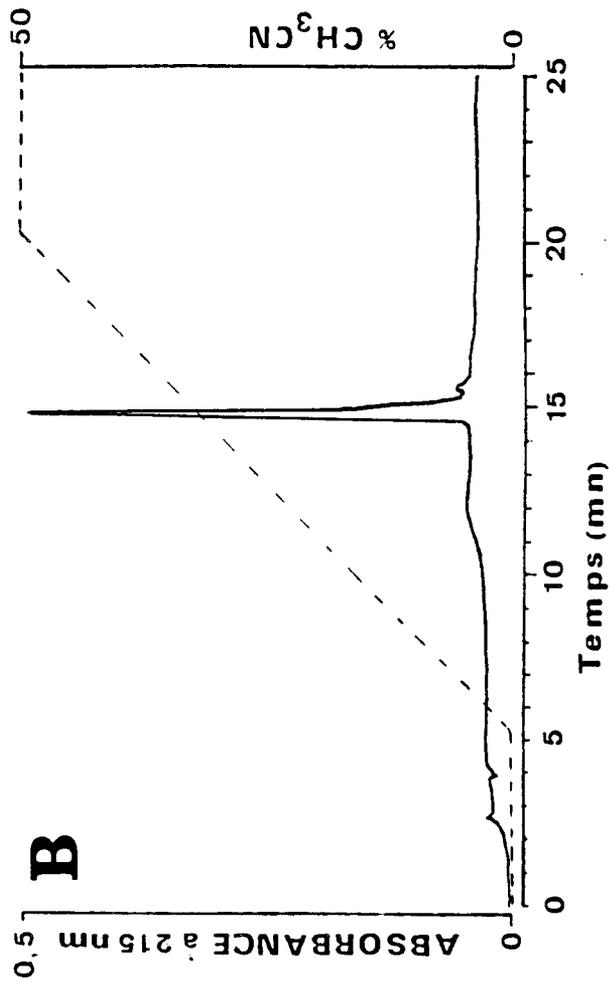
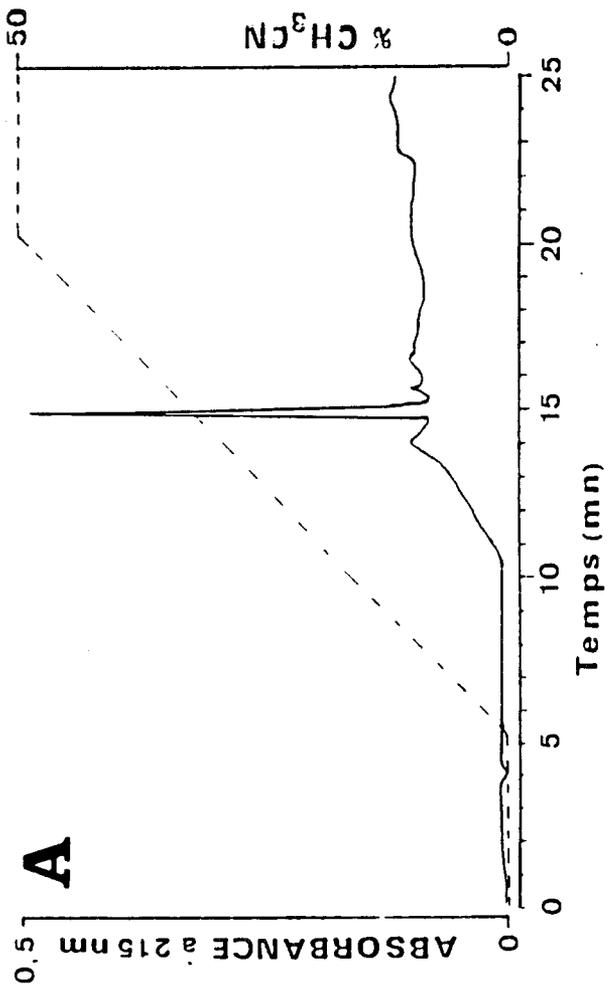


FIGURE 72 HPLC analytique du peptide S3:

(A) Peptide brut, (B) peptide purifié

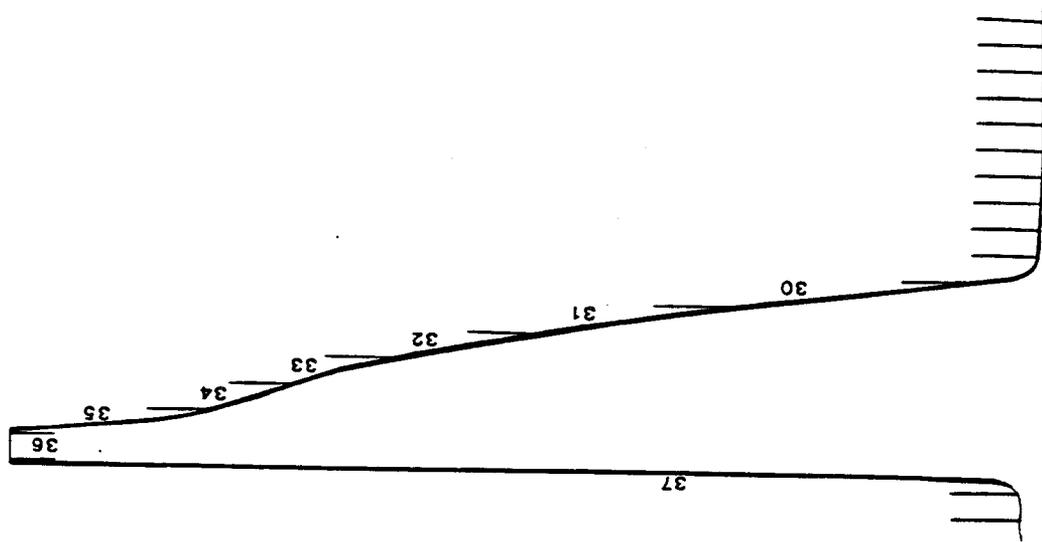


FIGURE 73

Profil de gel filtration du peptide S3

*** Peptide S3** (Figures 72 et 73)

Echantillon déposé: 200 mg de peptide brut.

Tube	% de pureté	Masse obtenue
30	95	23,8 mg
31	94	
32	97	
33	97*	86,9 mg
34	94	
35	90	
36	61	

* Contaminant détecté à 280 nm

Gel filtration de S3

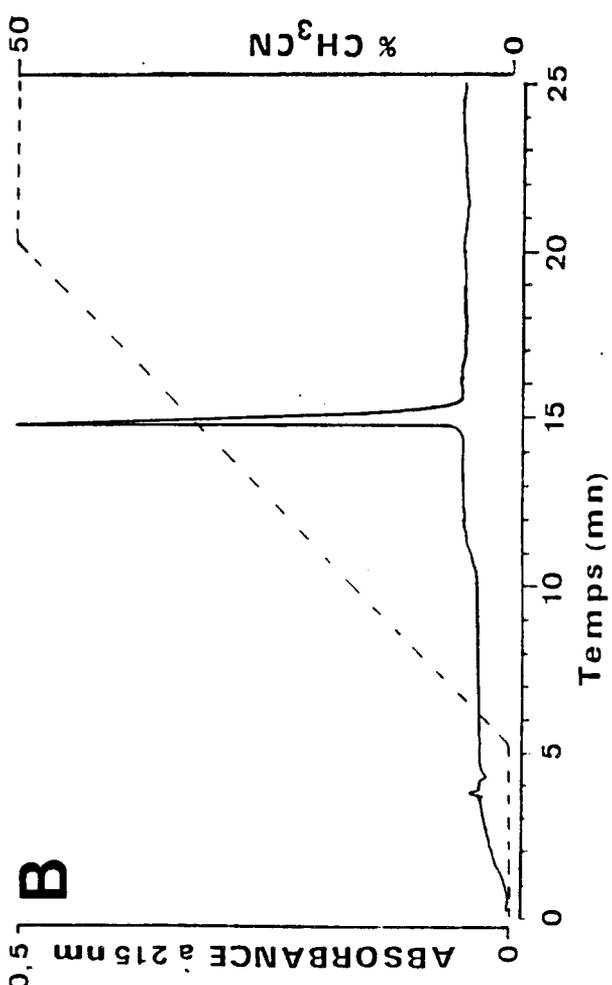
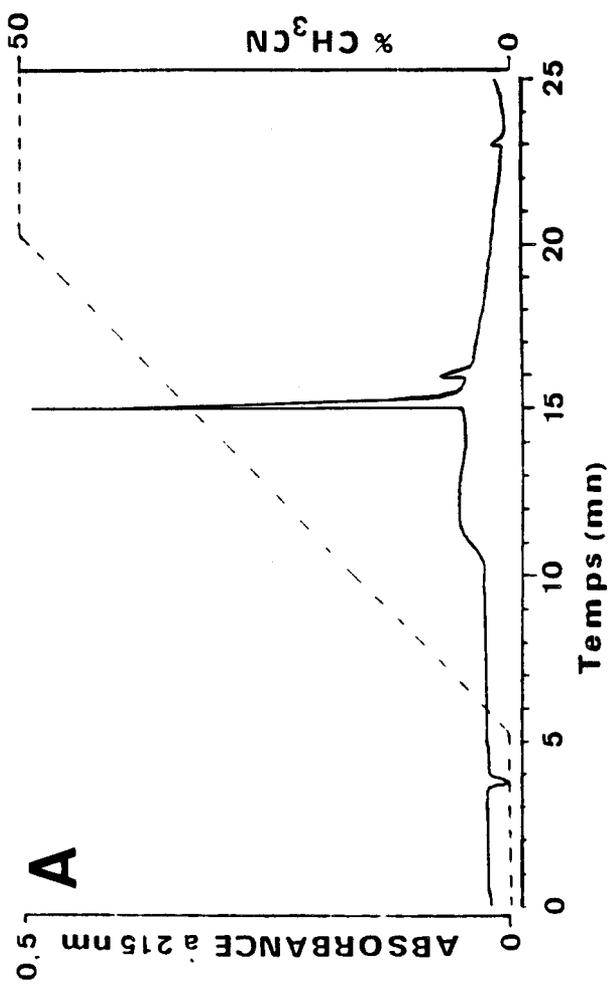


FIGURE 74 HPLC analytique du peptide S4:

(A) Peptide brut, (B) peptide purifié

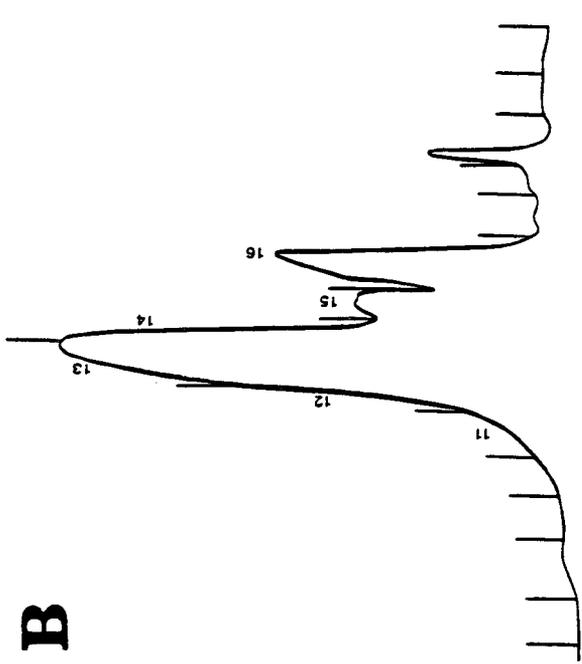
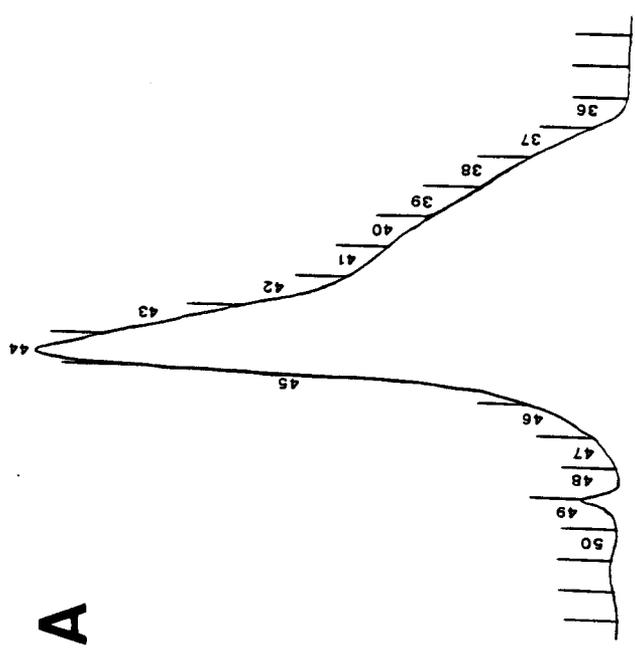


FIGURE 75 Purification du peptide S4:

(A) Profil de gel filtration

(B) Profil d'HPLC préparative

*** Peptide S 4** (Figures 74 et 75)

Quantité déposée en gel filtration: 252 mg.

Les fractions analysées par HPLC ont révélé la présence d'un peptide apparemment unique, mais dont la base du pic était élargie. De ce fait, nous avons réuni les fractions et opté pour une étape de purification supplémentaire.

n° de tube	masse obtenue
[36 - 40]	56,5 mg
[41 - 45]	113,6 mg
[46 - 49]	9,8 mg

- Purification par HPLC préparative.

Conditions: gel Nucléosil 100 Å 5 µ C 18

phase mobile = eau, acétonitrile, TFA

Solvant A: 990/9/1

Solvant B: 499/500/1

débit: 3 ml/ mn

gradient linéaire: 1 heure de A (100 %) vers B (100%)

longueur d'onde: 215 nm

sensibilité: 0-2

Quantité déposée: 31,4 mg de la fraction [41-45] provenant de gel filtration.

Après HPLC préparative, les fractions ont été analysées par HPLC analytique, les tubes 12, 13 et 14 contenaient le peptide recherché avec un degré de pureté de 100 % à 215 nm.

Nous avons obtenu respectivement 14,1 et 2,5 mg dans les tubes 13 et 14.

**2) SYNTHESE D'ANALOGUES DE L'INHIBITEUR H7 UTILISES
DANS LE CADRE DES BISUBSTRATS**

2.1- (1-dansyl, 2-méthyl) pipérazine

0,76 g de méthyl-2-pipérazine (7,6 mmoles) et 1 équivalent de triéthylamine (1,05 ml), ont été dissous dans 30 ml de chlorure de méthylène. A cette solution refroidie dans un bain de glace, a été ajoutée goutte à goutte, une solution de 1 g de chlorure de dansyl (3,8 mmoles) dans 30 ml de chlorure de méthylène. L'agitation a ensuite été maintenue 2 heures à température ambiante. Dans ces conditions la réaction, limitée à la monosubstitution de la pipérazine, est stéréospécifique pour l'azote situé en alpha du méthyle. Après réaction, la phase organique a été extraite par l'eau puis séchée sur sulfate de sodium. L'évaporation à sec a fourni une huile qui cristallise dans l'éther de pétrole.

Nous avons obtenu 0,68 g de produit correspondant à un rendement d'environ 60 %.

* Caractéristiques du composé:

Formule Brute: C₁₇ H₂₃ N₃ O₂ S

Masse moléculaire: 333,5 g

Point de fusion: 92,5 °C

Microanalyse:

Calculée: C 61,23 ; H 6,95 ; N 12,60 ; S 9,61

Trouvée: C 59,81 ; H 6,89 ; N 12,50 ; S 9,66

2.2- 1-(8-quinoléinesulfonyl)-2-méthyl pipérazine

Cette synthèse a été réalisée dans les mêmes conditions que celle du composé précédent, avec 0,85 g (3,8 mmoles) de 8-isoquinoléine sulfochlorure. Nous avons obtenu 0,68 g de produit sec, soit un rendement de l'ordre de 80 %.

* Caractéristiques du composé:

Formule Brute: C₁₄ H₁₇ N₃ O₂ S

Masse moléculaire: 291,4 g

Point de fusion: 106 °C

Microanalyse:

Calculée: C 57,71 ; H 5,88 ; N 14,42 ; S 11,00

Trouvée: C 56,79 ; H 5,77 ; N 13,98 ; S 11,10

2.3- 5-isoquinoléine sulfochlorure

2.3.1- Acide 5-isoquinoléine sulfonique.

Cet intermédiaire a été préparé selon la méthode décrite par KOELSCH (1952). L'action d'un oléum (acide sulfurique à 65 % d'anhydride) sur l'isoquinoléine fournit en majorité l'isomère 5 de l'acide sulfonique.

2.3.2- 5-isoquinoléine sulfochlorure.

Ce composé a été obtenu à partir de l'acide 5-isoquinoléine sulfonique selon deux méthodes:

- par action du pentachlorure de phosphore (GERARD 1986)
- par action du chlorure de thionyle (MORIKAWA 1989).

* Caractéristiques du composé:

Formule Brute: C₉ H₆ Cl N O₂ S

Masse moléculaire: 227,7 g

Point de fusion: 105 °C

Microanalyse:

Calculée: C 47,78 ; H 2,65 ; N 6,15 ; S 14,08 ; Cl 15,57

Trouvée: C 47,10 ; H 2,98 ; N 5,80 ; S 14,25 ; Cl 15,46

2.4- Acide théophylline acétique

L'acide théophylline acétique a été obtenu selon la méthode décrite par BAISSÉ (1949), par action de l'acide chloroacétique en milieu sodique sur le noyau théophylline.

* Caractéristiques du composé:

Formule Brute: C₉ H₁₀ N₄ O₄

Masse moléculaire: 238 g

Point de fusion: 106 °C

Microanalyse (avec 1 molécule d'eau):

Calculée: C 42,18 ; H 4,68 ; N 21,87

Trouvée: C 42,23 ; H 4,67 ; N 21,95

2.5- 1-(5-isoquinoléine sulfonyl) pipérazine (I₁)

0,688 g (8 mmoles) de pipérazine et 1 équivalent de triéthylamine ont été dissous dans 30 ml de chlorure de méthylène. A cette solution refroidie dans un bain de glace a été ajoutée

goutte à goutte une solution de 0,908 g (4 mmoles) de 5-isoquinoléine sulfochlorure dans 20 ml de chlorure de méthylène. Après 3 heures d'agitation à température ambiante, la phase organique a été extraite par l'eau (50 ml) et séchée sur sulfate de sodium. L'évaporation de la phase organique a fourni une huile qui cristallise dans l'éther de pétrole. Nous avons obtenu 0,96 g de produit sec, soit un rendement de 87 %.

* Caractéristiques du produit

Formule Brute: C₁₃ H₁₅ N₃ O₂ S

Masse moléculaire: 277,3 g

Point de fusion: 162 °C

Microanalyse:

Calculée: C 56,30 ; H 5,45 ; N 15,15 ; S 11,56

Trouvée: C 56,76 ; H 5,49 ; N 14,44 ; S 11,62

2.6- N-(5-isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-méthylpropionate) pipérazine [I₂]

0,63 g (1,3 mmoles) de 1-(5isoquinoléine sulfonyl) pipérazine et 0,361 ml (2,6 mmoles) de triéthylamine ont été dissous dans 20 ml de méthanol. Cette solution a été additionnée de 0,26 g (1,43 mmoles) de 3-bromopropionate de méthyle et portée à reflux pendant 4 heures. Le mélange réactionnel a ensuite été évaporé à sec et repris par un mélange de 30 ml d'eau et 30 ml de chlorure de méthylène. La phase organique a été séchée et évaporée jusqu'à obtention d'une huile, qui a été purifiée par chromatographie sur couche épaisse de silice (solvant d'élution: acétate d'éthyle).

Nous avons obtenu 0,35 g de produit soit un rendement de 75 %.

* Caractéristiques du produit

Formule Brute: C₁₇ H₂₁ N₃ O₄ S

Masse moléculaire: 363,4 g

Point de fusion: 140 °C

Microanalyse:

Calculée: C 56,18 ; H 5,82 ; N 11,56 ; S 8,82

Trouvée: C 54,99 ; H 5,73 ; N 11,44 ; S 8,83

Spectre de masse: 363 g

2.7- N-(5-isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-méthyl
valérate) pipérazine [I3]

Ce composé a été préparé à partir du 5-bromovalérate de méthyle dans les mêmes conditions que le composé précédent. Nous avons obtenu 0,3 g de produit, soit un rendement d'environ 60 %.

* Caractéristiques du produit

Formule Brute: C₁₉ H₂₅ N₃ O₄ S

Masse moléculaire: 391,5 g

Point de fusion: 64 °C

Microanalyse:

Calculée: C 58,29 ; H 6,43 ; N 10,73 ; S 8,19

Trouvée: C 57,72 ; H 6,34 ; N 10,51 ; S 8,23

Spectre de masse: 391 g

2.8- N-(2-aminoéthyl)-5-isoquinoléine sulfonamide

(I₄)

A une solution aqueuse (150 ml) contenant 5 g (19 mmoles) de 5-isoquinoléine sulfochlorure, maintenue sous agitation dans un bain de glace, ont été ajoutés lentement 1,6 g (19 mmoles) de carbonate de sodium. La solution résultante a été extraite deux fois par 50 ml de chlorure de méthylène. La phase organique séchée sur sulfate de sodium a ensuite été ajoutée goutte à goutte à une solution d'éthylène diamine (5,7 g soit 95 mmoles) dans le chlorure de méthylène (50 ml), maintenue sous agitation et refroidie dans un bain de glace. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel a été extrait par l'acide chlorhydrique à 10 % dans l'eau. La phase aqueuse recueillie a ensuite été amenée à pH 10 par la soude à 10 % dans l'eau et extraite par le chloroforme. L'évaporation de la phase organique a fourni une huile qui cristallise dans l'éther de pétrole. Nous avons obtenu 0,95 g de produit soit un rendement de 20 %.

* Caractéristiques du produit

Formule Brute: C₁₁ H₁₃ N₃ O₂ S

Masse moléculaire: 251,3 g

Point de fusion: 104 °C

Microanalyse:

Calculée: C 52,57 ; H 5,21 ; N 16,72 ; S 12,76

Trouvée: C 52,07 ; H 5,21 ; N 16,42 ; S 12,52

2.9- [N-(3-méthylpropionate), N'-(5-isoquinoléine sulfonyle)] éthylène diamine [I5]

0,71 g (2,83 mmoles) de N-(2-aminoéthyl)5-isoquinoléine sulfonamide et 0,787 ml (5,66 mmoles) de triéthylamine ont été dissous dans 30 ml de méthanol. Cette solution a été additionnée de 0,519 g (3,11 mmoles) de 3-bromopropionate de méthyle et portée 4 heures à reflux. Le milieu réactionnel a ensuite été repris par un mélange de 30 ml d'eau et 30 ml de chlorure de méthylène. La phase organique séchée sur sulfate de sodium a fourni après évaporation, une huile qui cristallise dans l'éther de pétrole. Nous avons obtenu 0,9 g de produit soit un rendement de 95 %.

* Caractéristiques du produit

Formule Brute: C₁₅ H₁₉ N₃ O₄ S

Masse moléculaire: 337,4 g

Point de fusion: 105 °C

Microanalyse:

Calculée: C 53,40 ; H 5,67 ; N 12,45 ; S 9,50

Trouvée: C 53,11 ; H 5,80 ; N 12,28 ; S 9,79

Spectre de masse: 337 g

2.10- N-[2-(succinimido)éthyl]5-isoquinoléine sulfonamide [I6]

0,24 g (0,95 mmoles) de N-(2-aminoéthyl)5-isoquinoléine sulfonamide et 0,1 g (1 mmole) d'anhydride succinique ont été dissous dans 40 ml de toluène et portés 10 minutes à 60 °C. Le

résidu d'évaporation a cristallisé dans le méthanol. Nous avons obtenu 0,2 g de produit soit un rendement de 60 %.

* Caractéristiques du produit

Formule Brute: C₁₅ H₁₇ N₃ O₅ S

Masse moléculaire: 351,3 g

Point de fusion: 175 °C

Microanalyse:

Calculée: C 51,40 ; H 4,86 ; N 11,92 ; S 9,10

Trouvée: C 50,28 ; H 4,78 ; N 11,65 ; S 9,35

2.11- N-[2-(succinimido)éthyl] 5-isoquinoléine sulfonamide, méthyl ester [I7]

0,12 g de N-[2-(succinimido)éthyl]5-isoquinoléine sulfonamide (I₆) dissous dans l'éther anhydre ont été ajoutés lentement à une solution de diazométhane dans l'éther (préparé par décomposition basique de nitrosométhylurée). Après 10 minutes, le milieu réactionnel a été évaporé pour fournir une huile, ensuite purifiée par chromatographie sur colonne d'alumine (solvant d'élution: acétate d'éthyle/ méthanol 90/10). Nous avons obtenu 0,11 g de produit (cristaux oranges) soit un rendement de 90 %.

* Caractéristiques du produit

Formule Brute: C₁₆ H₁₉ N₃ O₅ S

Masse moléculaire: 351,3 g

Point de fusion: 152 °C

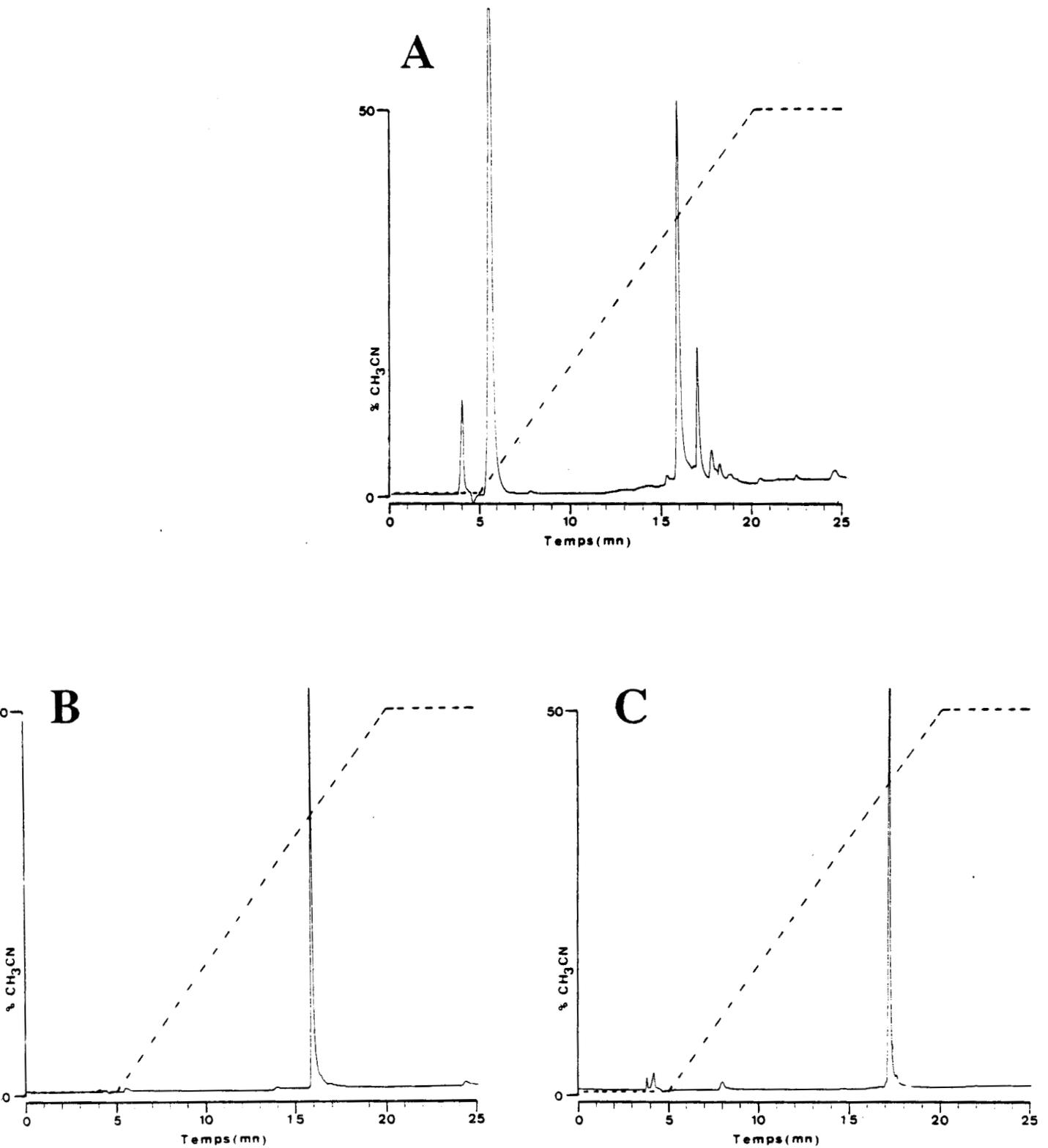


FIGURE 76 Profils d'HPLC analytique:

Colonne Nucléosil C18, Solvant: eau, acétonitrile (0 à 50 % en 15 mn), TFA (0,05 %). $\lambda = 215$ nm.

(A) I₅-Ser-Arg₆ après coupure HF

(B) I₅-Ser-Arg₆ purifié

(C) Dérivé de substitution de I₅-Ser-Arg₆ par une deuxième molécule de "I₅".

Microanalyse:

Calculée: C 52,59 ; H 5,24 ; N 11,49 ; S 8,77

Trouvée: C 51,96 ; H 5,31 ; N 11,12 ; S 8,34

2.12- N-(isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-propionyl-Ser-Arg₆) éthylène diamine ["I₅-Ser-Arg₆"]

La fonction ester du [N(3-méthyl propionate), N'(5-isoquinoléine sulfonyl)] éthylène diamine (I₅) a été hydrolysée pour fournir l'acide carboxylique correspondant, qui a ensuite été couplé en phase solide sur la peptidyl-résine Ser-Arg₆. Bien que la fonction amine en δ du sulfonyle n'ait pas été protégée lors du couplage, nous avons obtenu le composé recherché de façon majoritaire (1). Nous avons observé la formation d'un dérivé secondaire correspondant probablement à la substitution de l'amine par une molécule d'acide (2) (Figure 76 A).

Le premier composé (temps de rétention 15,8 mn) a pu être isolé par gel filtration (Figure 76 B), le second composé (temps de rétention 16,9 mn) a nécessité une étape de purification supplémentaire par HPLC préparative (Figure 76 C). L'analyse d'acides aminés nous a indiqué que ces deux produits contenaient la partie peptidique Ser-Arg₆. La spectrométrie de masse nous a fourni la masse attendue pour le premier pic ($M+H^+ = 1348$ g, Figure 77 A); le deuxième pic présente une masse de 1652 g ($M+H^+ = 1653$ g), correspondant à la substitution du composé précédent par une deuxième molécule d'acide carboxylique (Figure 77 B).

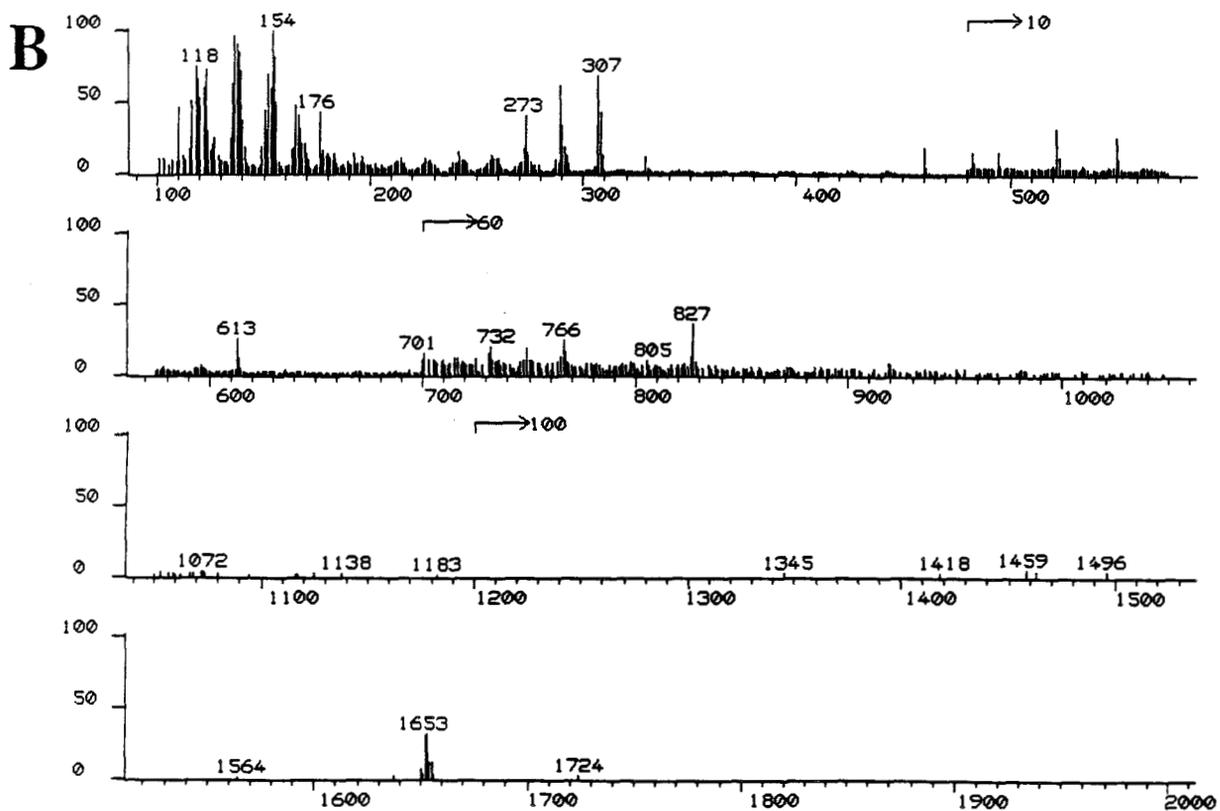
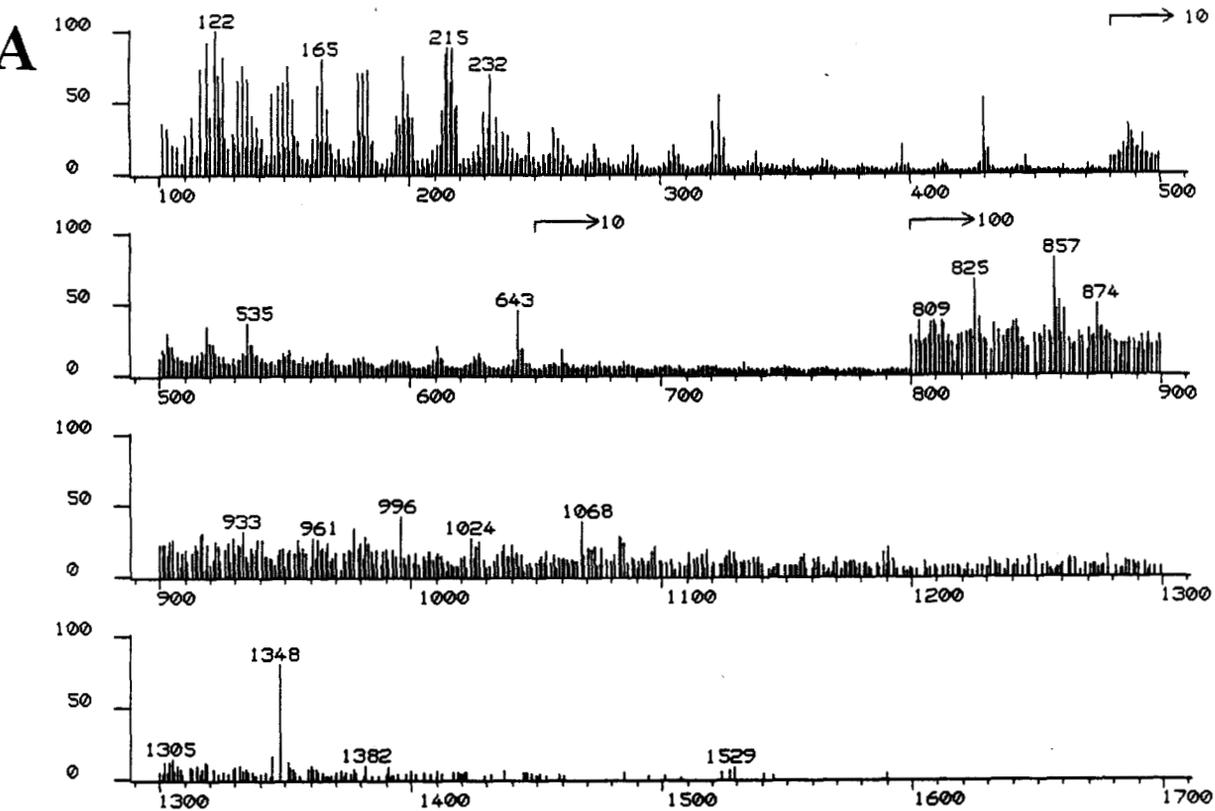


FIGURE 77 Spectre de masse (FAB) de I₅-Ser-Arg₆ (A) et de son dérivé substitué par une molécule de "I₅" (B).

Amino-acide incorporé	Equivalents mis en jeu	Solvant	Temps de couplage	Acétylation
2 = Asp	2,5	DCM	700'	+
	1,25	"	60'	
3 = Leu	2,5	DCM	60'	+
	2,5	"	700'	
4 = Asn	2,5	DCM + DMF *	90'	+
	1,25	"	90'	
	1,25	"	600'	
5 = Asn	2,5	DCM + DMF	120'	+
	2,5	"	600'	
6 = Ser	2,5	DCM	120'	+
	2,5	"	120'	
7 = Pro	2,5	DCM	120'	+
	2,5	"	60'	
8 = Gln	2,5	DMF*	120'	+
	2,5	"	120'	
9 = Arg	2,5	DMF*	30'	+
	2,5	"	45'	
10 = Arg	2,5	DMF*	300'	+
11 = Asp	2,5	DCM	60'	+
	2,5	"	60'	
12 = Glu	2,5	DCM	90'	+
	2,5	"	60'	
13 = Ser	2,5	DCM	60'	+
	1,25	"	120'	
14 = Pro	2,5	DCM	60'	+
	1,25	"	60'	
	1,25	"	180'	
15 = Cys	2,5	DCM	90'	
	2,5	"	90'	

DMF = Diméthylformamide

DCM = Chlorure de méthylène

* = Préincubation des agents de couplage et de l'acide-amino à 0°C

TABLEAU 16 Synthèse du peptide antigénique PKC α

3) PREPARATION DES PEPTIDES ANTIGENIQUES

3.1-Peptide antigénique PKC alpha

SEQUENCE:

Cys-Pro-Ser-Glu-Asp-Arg-Arg-Gln-Pro-Ser-Asn-Asn-Leu-Asp-Arg

3.1.1- Synthèse

Le peptide a été synthétisé sur une résine "P-Arg" chargée à 0,64 mEq/g.

Masse de résine mise en jeu = 1,5 g soit 0,96 mEq.

Les réactifs ont été utilisés avec un excès de 2,5, correspondant à 494 mg de DCC et 367 mg d'HOBt.

Le protocole suivi et le déroulement de la synthèse sont relatés dans le Tableau 16 et le cahier ci-joint.

S . A . S .

Synthesis Aid System

REFERENCE DE LA SEQUENCE A SYNTHETISER: ANTIGENE PKC ALPHA

NOMBRE D'AMINO-ACIDES: 15 INDICE FICHIER: 124

LA SEQUENCE A SYNTHETISER EST:

CYS-PRO-SER-GLU-ASP-ARG-ARG-GLN-PRO-SER-ASN-ASN-LEU-ASP-ARG-

LA SYNTHESE S'EFFECTUE SELON L'ORDRE:

ARG-ASP-LEU-ASN-ASN-SER-PRO-GLN-ARG-ARG-ASP-GLU-SER-PRO-CYS-

NOM DE L'OPERATEUR : ANNIE

RESINE UTILISEE: CHLOROMETHYLE LOT :

ARG est déjà sur la résine son poids est inclus dans celui figurant ci-après
Poids de résine utilisée: 1.5(gramme); charge: .64(m.eq) excès utilisé: 2.5

POIDS DE PEPTIDE BRUT ATTENDU: 1.14 par g de résine

soit 1.71 g pour cette synthèse

Poids de DCC pour chaque couplage avec excès=1 : 197.76 mg

Poids de DCC pour chaque couplage avec excès=2.5 : 494.4 mg

Poids de HOBt hydrate pour chaque couplage avec excès=1 : 146.88 mg

Poids de HOBt hydrate pour chaque couplage avec excès=2.5 : 367.2 mg

NUMERO DU SYNTHETISEUR UTILISE : 3

TYPE D'AGITATION : PAR SHAKER

Acide amine a incorporer numero 15 : ARG=174.2 DATE:

Deja incorpore sous forme Boc (Tos)ARG

Acide amine a incorporer numero 14 : ASP=133.1 DATE:

Vous travaillez avec le :

BOC O-Bz1 ASP

Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif

POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 775.2 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :

AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT

PREMIER COUPLAGE Temps choisi : LOT: KAISER :

RECOUPLAGE OUI/NON Temps choisi : LOT: KAISER :

ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 1.697 g

Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.566 meq/g

REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 13 : LEU=131.2 DATE:

Vous travaillez avec le :

BOC LEU hydrate

Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif

POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 597.6 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :

AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT

PREMIER COUPLAGE Temps choisi : LOT: KAISER :

RECOUPLAGE OUI/NON Temps choisi : LOT: KAISER :

ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 1.806 g

Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.532 meq/g

REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 12 : ASN=132.1 DATE:

Vous travaillez avec le :

BOC ASN

Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif

POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 556.8 mg A dissoudre dans CH2Cl2+DMF LOT :

AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT preincubation a 0 degre, au minimum 15 mn

PREMIER COUPLAGE Temps choisi : LOT: KAISER :

RECOUPLAGE OUI/NON Temps choisi : LOT: KAISER :

ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 1.915 g

Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.501 meq/g

REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 11 : ASN=132.1 DATE:

Vous travaillez avec le :

BOC ASN

Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif

POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 556.8 mg A dissoudre dans CH2Cl2+DMF LOT :

AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT preincubation a 0 degre, au minimum 15 mn

PREMIER COUPLAGE Temps choisi : LOT: KAISER :

RECOUPLAGE OUI/NON Temps choisi : LOT: KAISER :

ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 2.025 g

Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.474 meq/g

REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 10 : SER=105.1 DATE:

Vous travaillez avec le :

BOC O-Bz1 SER

Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif

POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 708 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :

AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT

PREMIER COUPLAGE Temps choisi : LOT: KAISER :

RECOUPLAGE OUI/NON Temps choisi : LOT: KAISER :

ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 2.195 g

Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.437 meq/g

REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 9 : PRO=115.1 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC PRO
Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 516 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: KAISER :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: KAISER :
ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 2.288 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdl 100%) :.42 meq/g
REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 8 : GLN=146 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC GLN
Test de CHRISTENSEN apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 590.4 mg A dissoudre dans DMF LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT preincubation a 0 degre, au minimum 15 mn
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: CHRISTENSEN :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: CHRISTENSEN :
ACETYLATION OUI/NON CHRISTENSEN :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 2.411 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdl 100%) :.398 meq/g
REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 7 : ARG=174.2 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC Tos ARG 1/2 AcOEt, 1/2 H2O
Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 1154.4 mg A dissoudre dans DMF LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT preincubation a 0 degre, au minimum 20 mn
IL EST NECESSAIRE DE PESER PRECISEMENT
TOUS LES REACTIFS UTILISES
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: KAISER :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: KAISER :
ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 2.709 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdl 100%) :.354 meq/g
REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 6 : ARG=174.2 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC Tos ARG 1/2 AcOEt, 1/2 H2O
Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 1154.4 mg A dissoudre dans DMF LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT preincubation a 0 degre, au minimum 20 mn
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: KAISER :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: KAISER :
ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 3.006 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdl 100%) :.319 meq/g
REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 5 : ASP=133.1 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC O-Bzl ASP
Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 775.2 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: KAISER :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: KAISER :
ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 3.203 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdl 100%) :.3 meq/g
REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 4 : GLU=147.1 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC O-Bz1 GLU
Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 808.8 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: KAISER :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: KAISER :
ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 3.414 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.281 meq/g
REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 3 : SER=105.1 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC O-Bz1 SER
Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 708 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: KAISER :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: KAISER :
ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 3.584 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.268 meq/g
REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 2 : PRO=115.1 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC PRO
Test de KAISER apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 516 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: KAISER :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: KAISER :
ACETYLATION OUI/NON KAISER :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 3.677 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.261 meq/g
REMARQUES :

Acide amine a incorporer numero 1 : CYS=121.2 DATE:
Vous travaillez avec le :
BOC MeOBz1 CYS
Test de CHRISTENSEN apres deprotection : positif / negatif
POIDS D'AA PROTEGE A PESER: 818.4 mg A dissoudre dans CH2Cl2 LOT :
AGENTS DE COUPLAGE: DCC,HOBT
PREMIER COUPLAGE temps choisi : LOT: CHRISTENSEN :
RECOUPLAGE OUI/NON temps choisi : LOT: CHRISTENSEN :
ACETYLATION OUI/NON CHRISTENSEN :

Poids de BOC peptidyl resine attendu: 3.891 g
Charge Theorique de cette peptidyl-resine (Rdt 100%) :.247 meq/g
REMARQUES :

Poids theorique de BOC peptidyl resine en fin de synthese: 3.891 g

TRAITEMENT PAR HF

La coupure HF doit s'effectuer en presence de:
oresol: 1g/10ml de HF/1g de resine

Nombre de groupes resistants a HF:

Acw: 0
Dap: 0
Fur: 0

Poids total theorique de peptide brut : 1.715 g

Poids theorique par g de peptidyl-resine obtenue : .441 g

Poids theorique de peptide totalement deprotege : 1.715

soit par gramme de peptidyl resine a couper : .441

RENSEIGNEMENTS DIVERS

Poids moleculaire du peptide: 1786.9
Fonctions ionisables-La sequence comporte:

ARG: 3
ACP: 4
GLU: 2
HIS: 0
LYS: 0

Après déprotection des deux asparagines, le test de Kaiser a fourni une couleur rouge au lieu de la couleur bleue habituelle. Ce phénomène est lié à la cyclisation de l'acide-amino sous l'action du chauffage nécessaire pour le test, réduisant le nombre de fonctions amines libres dans le milieu. La sensibilité réduite du test ne permettait pas une évaluation correcte du taux de couplage; nous avons préféré, avant de poursuivre la synthèse, réaliser une analyse d'acides aminés sur peptidyl-résine afin de s'assurer que tous les résidus étaient bien présents.

Peptidyl résine = **P**-Arg-Asp-Leu-Asn-Asn

L'hydrolyse acide totale a été effectuée sur 0,5 mg de peptidyl-résine, le protocole utilisé est détaillé dans la section A.7: Analyse d'acides aminés.

Les résultats résumés dans le Tableau 17 se sont montrés satisfaisants, nous avons donc continué la synthèse.

Amino-acide	Valeur théorique	Valeur obtenue	
		nmoles	proportion
Arg	1	7,38	0,93
Asp	3	23,43	2,96
Leu	1	8,76	1,10

TABLEAU 17 Analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale sur résine

En fin de synthèse, la séquence présentant un résidu cystéine, le dernier amino-acide a été déprotégé afin de limiter la présence de carbocations réactifs lors de la coupure peptide-résine. Cette déprotection a été réalisée en présence d'éthanedithiol. De même lors de la coupure à l'HF, nous avons ajouté du diméthylsulfure au milieu réactionnel afin de limiter l'oxydation de la cystéine.

" RENDEMENTS DE SYNTHÈSE "

	Masse théorique	Masse obtenue
Peptidyl-résine	3,89 g	3,00 g
Peptide	1715 mg	900 mg

3.1.2- Purification (Figures 78 et 79)

Le peptide PKC alpha, doit être sous forme réduite pour le couplage à la protéine porteuse.

Nous avons réalisé la réduction avant purification, afin de n'effectuer qu'une étape de gel filtration.

300 mg de peptide brut, correspondant à environ 0,16 mmole et 247 mg de dithiotréitol (10 excès) ont été dissous dans un tampon carbonate de sodium pH 8. Après dissolution, le pH descendu à 3 a été ramené à 8 par addition d'ammoniaque. Après 24 heures d'agitation, le milieu a été acidifié jusque pH 3 par l'acide acétique 50 %. Le milieu réactionnel a ensuite été lyophilisé et déposé sur une colonne garnie de gel TSK (2,5 x 100 cm), éluée par l'acide acétique à 5 %.

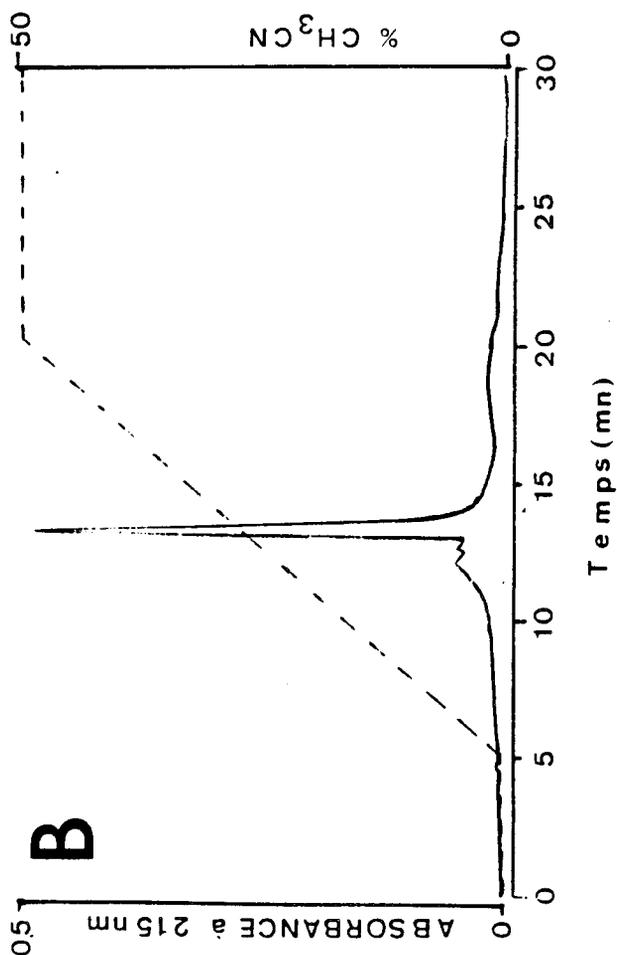
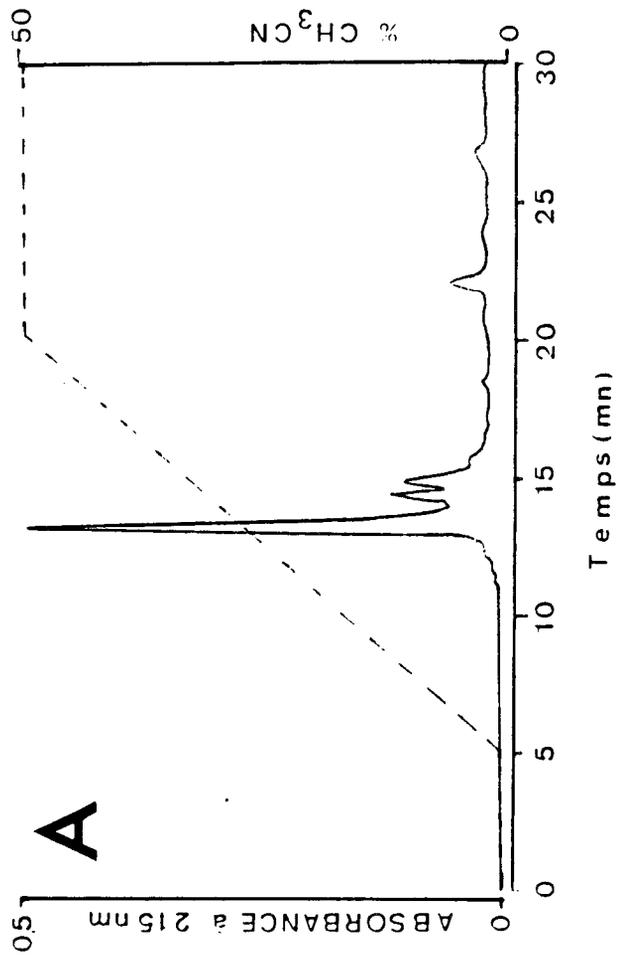


FIGURE 78 HPLC analytique de l'antigène PKC α :

(A) Peptide brut. (B) peptide purifié

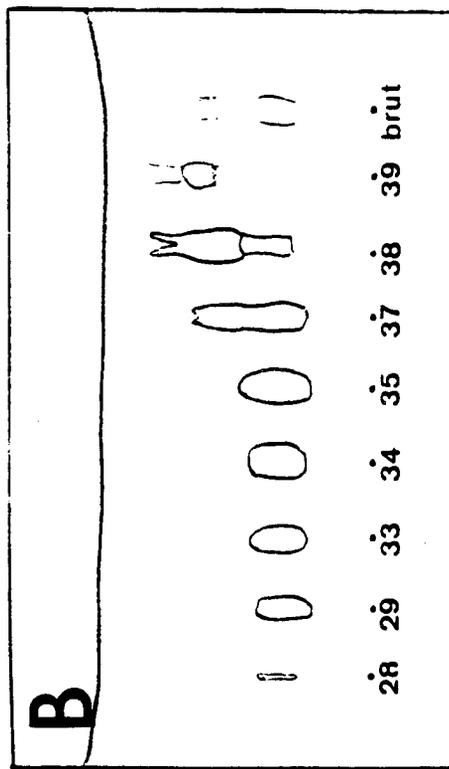
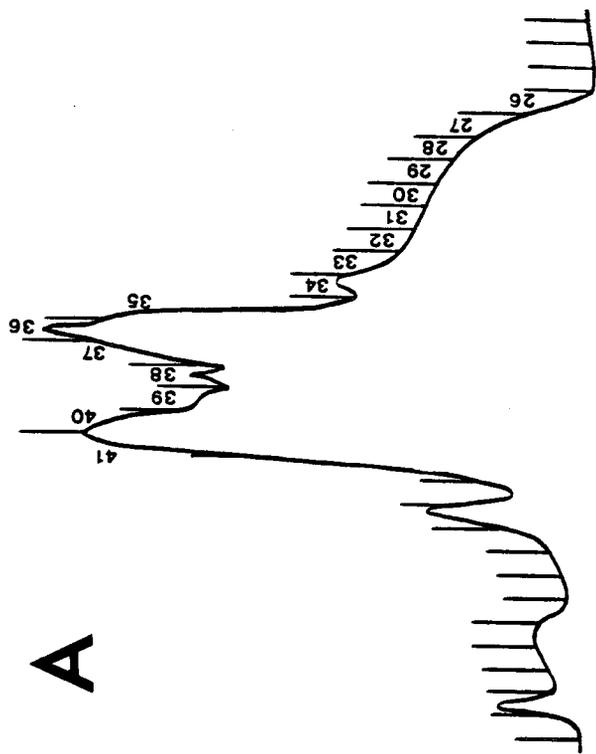


FIGURE 79 Purification de l'antigène PKC α :

(A) Profil de gel filtration

(B) Contrôle analytique par GCM

Les fractions éluées ont été détectées à 227 nm, absorbance maximale 1,28. Leur composition a été analysée par chromatographie sur couche mince et HPLC analytique.

3.1.3- Contrôles

* Chromatographie sur couche mince

Solvant de migration: Butanol, pyridine, acide acétique, eau (1/1/1/1). Une tache unique est détectée dans les tubes 28 à 35.

* HPLC analytique

Conditions: - colonne Nucléosil C 18

- solvant: eau/ acétonitrile / tampon phosphate pH 2,5

- gradient: 5 mn isocratique en A, 15 mn de gradient linéaire (100 %) vers B (100 %), 10 mn d'isocratique.

- longueur d'onde de détection: 215 nm

- débit 1 ml/mn

:	Tube	pureté
	28	99 %
	33	98 %
	36	71 %
	40	14 %

* Masses obtenues

[28-35]	75 mg
36	31 mg
37	22 mg
[38-39]	24 mg

La fraction [28-35] contrôlée par HPLC analytique présente un degré de pureté de 99 %.

Contrairement à toute attente, le dosage d'Ellman (dosage

des fonctions thiols) sur la fraction [28-35] s'est révélé négatif. Lors de la préparation des conjugués, nous avons de ce fait effectué une seconde réduction par la tributylphosphine.

* Contrôle d'identité

L'identité du peptide a été confirmée par une analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale:

Amino-acide	Quantité théorique	Quantité trouvée
Asp	4	3,88
Ser	2	1,65
Glu	2	2,05
Leu	1	1,02
Arg	3	3,04
Pro	2	2,33

Amino-acide incorporé	Equivalents mis en jeu	Solvant	Temps de couplage	Acétylation
2 = Asp	2,5	DCM	200'	
3 = Arg	2,5	DMF*	90'	
	2,5	"	60'	
4 = Asn	2,5	DCM + DMF*	90'	
5 = Gly	2,5	DCM	30'	+
	2,5		30'	
6 = Asn	2,5	DCM + DMF*	90'	
	2,5	"	30'	
	2,5	"	30'	
	2,5	"	30'	
	2,5	"	30'	
7 = Asn	2,5	DCM + DMF*	30'	+
	2,5	"	30'	
8 = Asp	2,5	DCM	60'	+
	2,5	"	90'	
	2,5	"	90'	
	2,5	DMF	120'	
	2,5	DMF	600'	
9 = Phe	2,5	DCM	90'	
	2,5	"	600'	
10 = Lys	2,5	DCM	90'	+
	2,5	"	60'	
11 = Ser	2,5	DCM	90'	+
	2,5	"	90'	
12 = Ile	2,5	DCM	90'	+
	2,5	"	90'	
13 = Thr	2,5	DCM	90'	
	2,5	"	90'	
14 = Asn	2,5	DCM + DMF*	90'	
	2,5	"	90'	
15 = Ala	2,5	DCM	180'	+
	2,5	"	60'	
16 = Thr	2,5	DCM	90'	+
	2,5	"	60'	
17 = Lys	2,5	DCM	90'	+
	2,5	"	90'	
18 = Glu	2,5	DCM + DMF*	90'	
	2,5	"	60'	

DMF = Diméthylformamide; DCM = Dichlorométhane

* = Préincubation des agents de couplage et de l'acide-amino à 0°C

TABLEAU 18 Synthèse du peptide antigénique PKC β

3.2-Peptide antigénique PKC bêta

SEQUENCE:

Glu-Lys-Thr-Ala-Asn-Thr-Ile-Ser-Lys-Phe-Asp-Asn-Asn-Gly-Asn-Arg-
Asp-Arg

3.2.1- Synthèse

Le peptide a été synthétisé sur 2,56 g de résine **P**-Arg chargée à 0,39 mEq/g.

Les réactifs ont été utilisés avec un excès de 2,5, soit par couplage: 514 mg de DCC et 382 mg d'HOBt.

L'évolution de la synthèse est résumée dans le Tableau 18.

Masse de résine attendue en fin de synthèse: 5,8 g

Masse de résine obtenue: 3 g

Masse théorique de peptide brut: 2,08 g

La coupure HF réalisée sur 2 g de résine a fourni 800 mg de peptide, pour une masse attendue de 1,39 g.

Le rendement global synthèse/coupure HF est de 57 %.

3.2.2- Purification (Figures 80 et 81)

Conditions:

- colonne (2,5 x 100 cm) garnie de gel Fractogel[®] TSK HW-40 (S) Merck, (taille des particules 25-40 μ M)
- solvant: acide acétique à 5 %
- longueur d'onde de détection: 254 nm
- sensibilité: 0-0,64

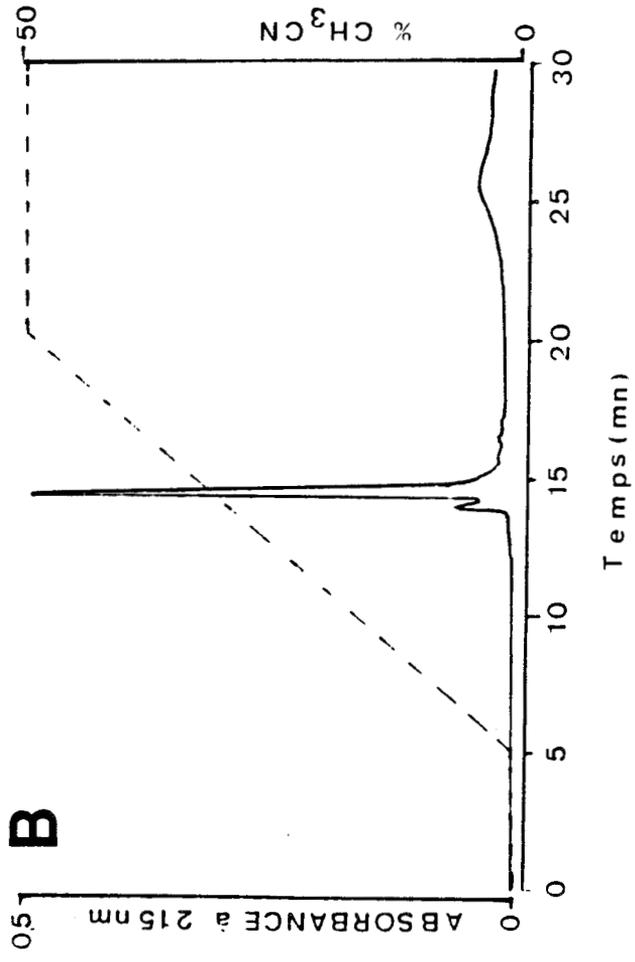
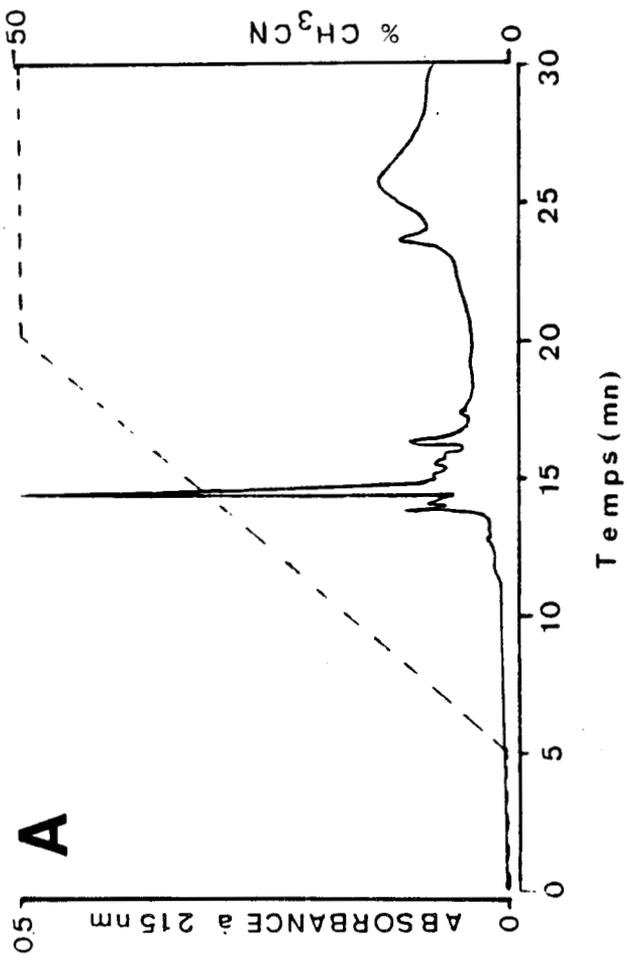


FIGURE 80 HPLC analytique de l'antigène PKC β :
 (A) Peptide brut, (B) peptide purifié

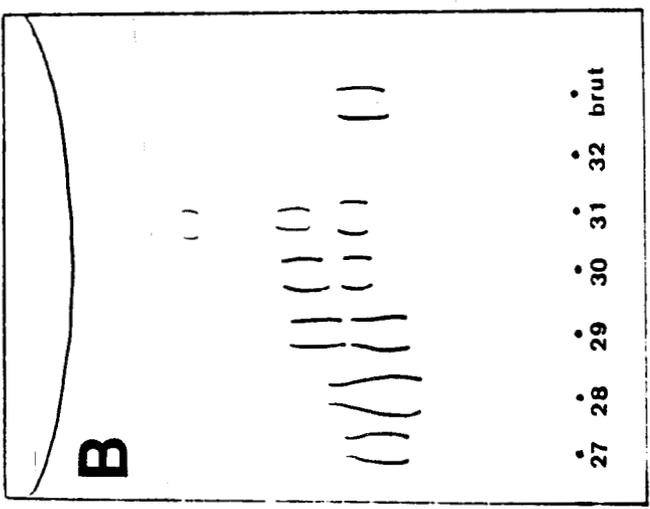
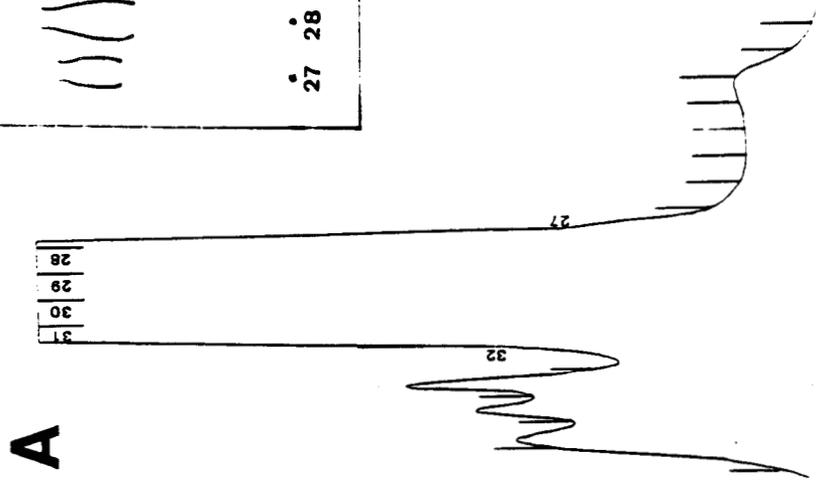


FIGURE 81 Purification de l'antigène PKC β :
 (A) Profil de gel filtration
 (B) Contrôle analytique par CCM

- quantité déposée: 358 mg de peptide brut dissous dans 7 ml de solvant d'élution.

3.2.3- Contrôles

* Chromatographie sur couche mince

Solvant de migration acétate d'éthyle/pyridine/acide acétique/eau (1/1/1/1).

Le peptide était présent avec une pureté satisfaisante dans les tubes 27 et 28. Ces deux fractions réunies et lyophilisées ont fourni 95 mg de peptide.

* HPLC analytique

Conditions: colonne Nucléosil C 18
solvant: eau/ acétonitrile / tampon phosphate pH 2,5
gradient: 5 mn isocratique en A, 15 mn de gradient linéaire de A (100 %) vers B (100 %), 10 mn d'isocratique
longueur d'onde de détection: 215 nm
débit: 1 ml/mn

Fraction contrôlée [27-28], pureté de 91 %.

* Contrôle d'identité

L'identité du peptide a été contrôlée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale:

Amino-acide	Quantité théorique	Quantité trouvée
Asp	6	6,10
Thr	2	1,88
Ser	1	0,96
Glu	1	0,94
Gly	1	0,99
Ala	1	1,02
Ile	1	0,97
Phe	1	1,00
Lys	2	2,08
Arg	2	2,05

Amino-acide incorporé	Equivalents mis en jeu	Solvant	Temps de couplage	Acétylation
2 = Val	2,5	DCM	700'	+
3 = Pro	2,5	DCM	120'	+
4 = Val	2,5	DCM	120'	
5 = Pro	2,5	DCM	120'	+
	2,5	"	120'	
6 = Val	2,5	DCM	120'	+
7 = Pro	2,5	DCM	120'	
	2,5	"	120'	
8 = Ser	2,5	DCM	120'	
9 = Thr	2,5	DCM	90'	+
10 = Pro	2,5	DCM	120'	
	2,5	"	120'	
11 = Ser	2,5	DCM	120'	
	2,5	"	700'	+
12 = Arg	2,5	DMF*	90'	
	2,5	"	120'	+
13 = Ala	2,5	DCM	105'	
	2,5	"	700'	
14 = Asp	2,5	DCM	120'	+
15 = Pro	2,5	DCM	600'	
	2,5	"	120'	
16 = Cys	2,5	DCM	120'	
	2,5	"	120'	

DMF = Diméthylformamide

DCM = Dichlorométhane

* = Préincubation des agents de couplage et de l'acide-amino à 0°C

TABLEAU 19 Synthèse du peptide antigénique PKC γ

3.3- Peptide antigénique PKC gamma

SEQUENCE:

Cys-Pro-Asp-Ala-Arg-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Val-Pro-Val-Pro-Val-Met

3.3.1- Synthèse

Le peptide a été synthétisé sur 1,5 g de résine **P**-Met chargée à 1,19 mEq/g, soit 1,78 mEq.

Nous avons utilisé un excès de 2,5 en réactif, soit par couplage: 0,92 mg de DCC et 0,68 mg d'HOBt. L'évolution de la synthèse est résumée dans le Tableau 19.

" RENDEMENTS DE SYNTHÈSE "

Masse de peptidyl résine attendue = 5,7 g

Masse de résine obtenue = 4,5 g

Masse totale de peptide attendu après coupure HF = 2,44 g

La coupure réalisée sur 2 g de résine devait fournir 1,08 g, nous avons obtenu 670 mg, soit un rendement de 62 %.

3.3.2- Purification (Figures 82,83,84)

300 mg de peptide brut ont été réduits par 50 équivalents de DTT. Après réduction le pH a été ramené à 3 par l'acide acétique à 50 %, la solution a été déposée sur colonne TSK éluee par l'acide acétique à 5 % (mêmes conditions que le peptide PKC bêta).

La longueur d'onde de détection était 215 nm.

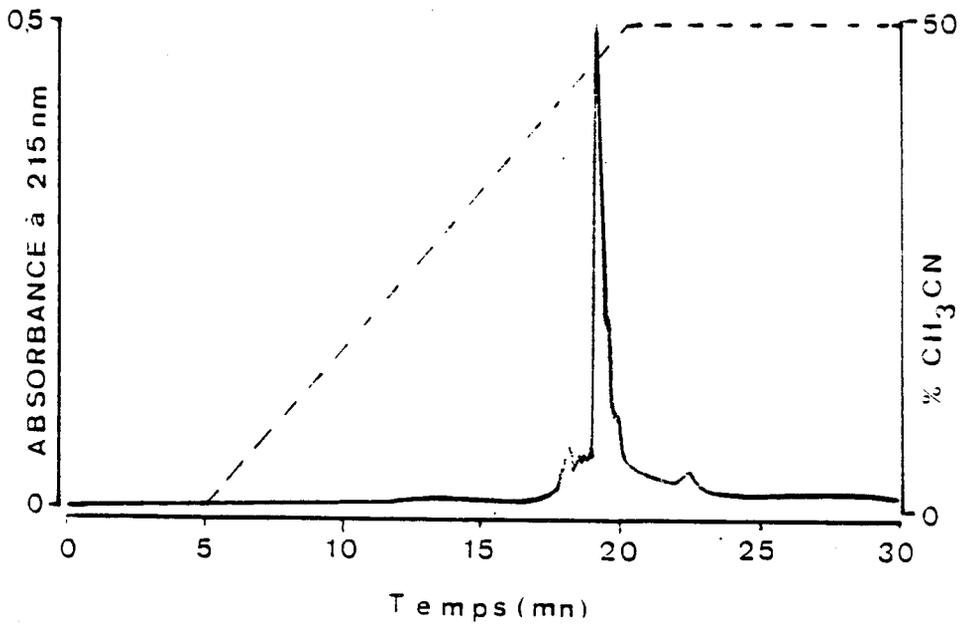


FIGURE 82 HPLC analytique de l'antigène PKC γ . Peptide brut

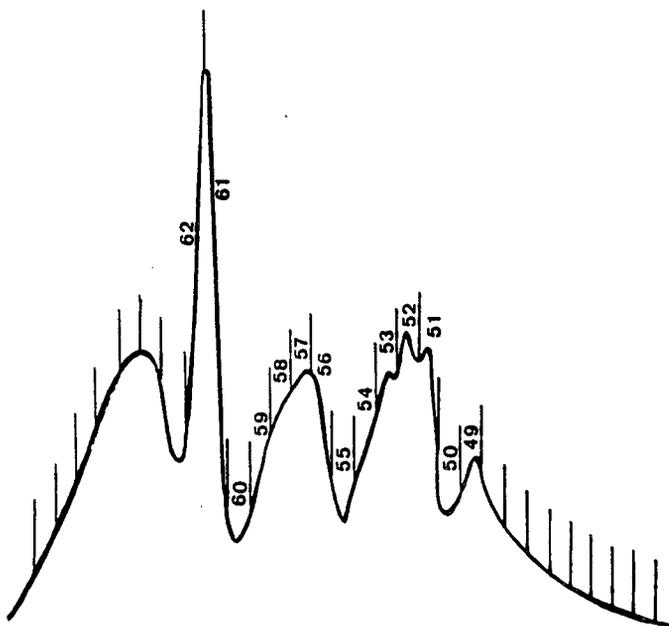


FIGURE 83 Profil de gel filtration de l'antigène PKC γ

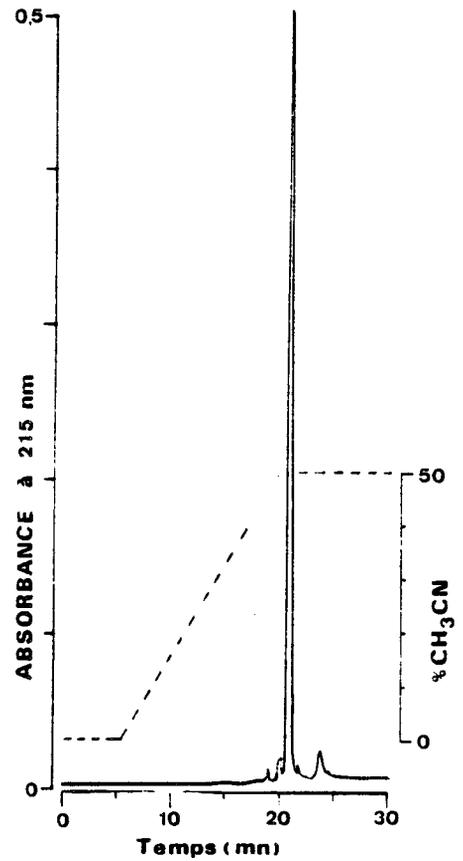


FIGURE 84 HPLC analytique de l'antigène PKC γ . Peptide purifié

3.3.3- Contrôles

Les fractions éluées ont été étudiées par HPLC analytique.

Tube	% de pureté	Masse obtenue
51	62	62 mg
52	61	
53	94	98 mg
54	95	
55	95	

La composition du peptide a été confirmée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide totale.

Amino-acide	Quantité théorique	Quantité trouvée
Asp	1	0,98
Thr	1	0,89
Ser	2	1,60
Pro	5	5,02
Ala	1	1,00
Val	3	3,01
Met	1	0,98
Arg	1	1,03

4) PREPARATION DES CONJUGUES PEPTIDE-PROTEINE

4.1- Conjugué PKC alpha

4.1.1- Préparation de la BSA activée

L'activation a été réalisée sur 30 mg de BSA, correspondant à 12 μ moles de lysines accessibles. La protéine et 5 équivalents de MCS ont été dissous dans 1 ml de tampon PBS pH 6,6. Le précipité formé a été solubilisé par addition de 200 μ l de DMF.

Après réaction, la protéine a été dialysée et recueillie dans un volume de 5 ml.

* La concentration de la solution a été déterminée par la méthode de Lowry:

Concentration théorique:	Concentration obtenue:	Rendement:
6 mg/ml	5,17 mg/ml	86 %

* La capacité de fixation des cystéines a été déterminée par la méthode d'Ellman:

La BSA activée à 100 % doit fixer 400 nmoles de cystéine par mg.

Le dosage est réalisé sur une capacité théorique de 100 nmoles, soit 0,25 mg.

48 μ l de la solution de BSA activée (0,25 mg), ont fixé 68 nmoles de cystéine. La capacité de fixation de la BSA est de 272 nmoles / mg.

Le rendement d'activation est de 68 %.

4.1.2- Réduction et couplage du peptide

Le couplage a été réalisé sur 10 mg de BSA avec 2 équivalents de peptide par rapport à la capacité de fixation.

- 10 mg de BSA = 2,72 μ moles de fixation
- le peptide a une masse moléculaire de 2027 g (sous-forme d'acétate), 2 équivalents de peptide = 5,44 μ moles soit 11,0 mg.

Le peptide a été préalablement réduit par un équivalent de tributylphosphine par rapport aux ponts disulfures, soit 2,72 μ moles (0,7 μ l). La TBP dissoute dans 0,5 ml de n-propanol a été additionnée au peptide dissous dans 1 ml de tampon PBS pH 6,6.

Après une heure d'agitation, la TBP a été éliminée par bullage sous azote, la BSA activée a été ajoutée directement à la solution de peptide réduit. Après 20 heures d'agitation, le conjugué formé a été dialysé dans le tampon PBS. La concentration évaluée par dosage de Lowry est de 3,9 mg/ml.

4.1.3- Analyse d'acides aminés du conjugué

Deux analyses d'acides aminés sont réalisées en parallèle:

- une analyse de la BSA seule
- une analyse du conjugué

Les quantités de protéines analysées étant différentes, on effectue une règle de trois sur un amino-acide stable n'appartenant pas à la séquence du peptide, pour amener sa concentration à une valeur identique dans les deux analyses. Connaissant ainsi la concentration approximative de la BSA dans l'analyse du conjugué, en retranchant cette valeur on obtient la concentration d'acides aminés issus du peptide. Dans le cas présent, nous avons

choisi comme amino-acide de référence l'isoleucine. Pour calculer la proportion relative d'amino-acides correspondant au peptide, nous avons évalué sa concentration (0,8 nmoles) en nous basant sur celle de l'arginine.

Acide aminé	Conjugué	BSA	BSA corrigée	Conj.- BSA = peptide	Proportion théorique	Proportion obtenue
Asp	5,55	15,95	2,39	3,16	4	3,93
Thr	1,40	10,56	1,58	0,18	0	/
Ser	1,78	2,83	0,43	1,35	2	1,68
Glu	5,18	20,68	3,10	2,08	2	2,59
Pro	3,66	10,80	1,62	2,04	2	2,53
Gly	0,84	5,02	0,75	0,09	0	/
Ala	2,11	13,61	2,04	0,07	0	/
Val	1,67	10,69	1,60	0,07	0	/
Met	0,14	0,39	0,06	0,08	0	/
Ile	<u>0,56</u>	3,75	<u>0,56</u>	0	0	/
Leu	3,47	18,46	2,77	0,70	1	0,88
Tyr	0,78	5,50	0,82	0,04	0	/
Phe	1,10	8,27	1,24	0,14	0	/
His	0,31	2,71	0,40	0,09	0	/
Lys	2,41	14,11	2,11	0,30	0	/
Arg	3,46	6,93	1,04	2,42	3	3

Calcul de la concentration en peptide fixé

L'analyse effectuée sur 1,15 µl a révélé environ 0,8 nmole de peptide fixé soit une concentration de 696 nmoles/ml; la masse moléculaire du peptide (sous-forme non ionisée) étant de 1787 g, la concentration est de 1,24 mg/ml. Cette valeur est utilisée pour le calcul du volume de conjugué à injecter lors des immunisations.

Calcul du taux de fixation du peptide sur la BSA

La quantité de BSA obtenue à partir du dosage de Lowry est de 3,9 mg/ml, la concentration en peptide fixé est de 696 nmoles /ml. Le taux de fixation est donc de 178 nmoles de peptide /mg de protéine

pour une valeur attendue de 272, le rendement de couplage est de 66 %.

4.2- Conjugué PKC bêta

4.2.1- Dialyse de l'anatoxine tétanique

Nous avons dialysé 17 ml d'AT à environ 1 mg/ml, dans une solution de chlorure de sodium 0,9 % ajustée à pH 8,2 par le carbonate monosodique. Nous avons obtenu 3,8 ml de solution à 4,4 mg/ml (évaluée par dosage de Lowry) soit 16,7 mg d'AT.

4.2.2- Couplage du peptide

Le peptide a été couplé par le glutaraldéhyde.

Quantités utilisées:

750 nmoles de peptide (masse = 2378 g sous forme acétate) par mg d'AT soit 12,5 μ moles (29,7 mg).

500 nmoles de glutaraldéhyde par mg d'AT pendant 5 jours, soit 5 x 8,35 μ moles (33,4 μ l d'une solution à 2,5 %).

Après 5 jours de réaction à pH 8,2, le conjugué a été dialysé dans le chlorure de sodium 0,9 %, pour fournir 2,2 ml de solution à 8,96 mg /ml.

4.2.3- Contrôle du conjugué

La quantité de peptide fixée a été définie par analyse d'acides aminés.

Pour 2,2 μ l de solution nous avons obtenu:

Acide aminé	nmoles	part théorique	valeur obtenue
Asp	12,02	6	5,30
Thr	3,13	2	1,56
Ser	1,25	1	0,62
Glu	1,28	1	0,63
Gly	1,79	1	0,89
Ala	2,29	1	1,14
<u>Ile</u>	2,01	1	<u>1,00</u>
Phe	2,13	1	1,06
Arg	3,48	2	1,52

Quantité de peptide fixé

En nous basant sur l'isoleucine, nous avons 2,00 nmoles de peptide fixé pour 2,2 μ l c'est à dire 909 nmoles/ml, soit 1,89 mg de peptide par ml de solution (masse du peptide non ionisé = 2080 g).

Taux de fixation

Pour l'AT on considère une capacité théorique de fixation de 250 nmoles/mg. Nous avons fixé 909 nmoles pour 8,96 mg soit 101 nmoles /mg. Le rendement de couplage est de 40 %.

4.3- Conjugué PKC gamma

La BSA activée a été préparée dans les mêmes conditions que celle utilisée pour le conjugué PKC alpha. Après activation et dialyse, la protéine était en concentration de 2 mg/ml, et sa capacité de fixation des cystéines de 386 nmoles/mg.

Le rendement d'activation était de 96,6 %.

Nous avons utilisé 2,33 mg de protéine soit une capacité de fixation de 900 nmoles.

Après réduction par la tributylphosphine, le peptide de masse 1773 g (sous forme d'acétate) a été ajouté à la BSA avec un excès de 2 soit 1,8 μ moles (3 mg). Le conjugué dialysé dans le tampon PBS pH 6,66, a été concentré jusque la concentration de 1,38 mg/ml évaluée par le dosage de Lowry. Une analyse d'acides aminés a ensuite permis de connaître la quantité de peptide fixé sur le conjugué.

Acide aminé	nmoles	part théorique	valeur obtenue
Asp	0,76	1	1,03
Thr	0,61	1	0,83
Ser	1,16	2	1,56
Pro	3,60	5	4,86
Ala	0,91	1	1,22
<u>Val</u>	2,22	3	<u>3,00</u>
Met	0,60	1	0,81
Arg	0,67	1	0,90

* Quantité de peptide fixé

En nous basant sur la valine, nous avons 0,74 nmole de peptide fixé pour 3,14 μ l de conjugué analysé, soit 232 nmoles/ml. Sa masse moléculaire (non ionisé) étant de 1653 g, la concentration est de 0,38 mg/ml.

* Rendement de fixation

La concentration en protéine est de 1,38 mg/ml, la concentration en peptide fixé est donc de 168 nmoles/mg de protéine.

Le rendement de fixation est de 44 %.

**FICHES ANALYTIQUES DES SUBSTRATS
ET INHIBITEURS PEPTIDIQUES**

Composés	Page
c-erb A (124-137)	197
[Ala ¹²⁵⁻¹²⁶] c-erb A (124-137)	197
[Ala ¹²⁵] c-erb A (124-137)	198
[Ala ¹²⁶] c-erb A (124-137)	198
Substrat S1	199
Substrat S2	199
Substrat S3	200
Substrat S4	200
Gly-Ser-Arg ₆ -Tyr	201
Gly-Ser-Ala ₃ -Arg ₃	201
Gly-Ser-Arg ₆	202
Arg ₄ -Ala-Arg ₆	203
Arg ₄ -Ala-Gly-Arg ₄	203
Ala-Arg ₆	204
Arg-Ala-Arg ₆	204
Gly-DSer-Arg ₆	205
Gly-Met-Arg ₆	205
DAP-Arg ₆	206
Lys-Arg ₆	206
Arg ₆ fluoroacétate	207
Trifluoroala-Arg ₆	207
DTyr-DSer-DArg ₆ -Gly	208
[Ala ⁹⁻¹⁰ ,Lys ¹¹⁻¹²] GS(1-12)	209
PKC(19-31)	209

Rétro-Inverso PKC(19-31)	210
Rétro-Inverso [Ser ²⁵] PKC(19-31)	210
Dansyl-Arg ₆	211
5-Isoquinoléine-sulfonyl-Arg ₆	211
Théophylline-Arg ₆	212
Dansyl-βAla ₂ -Ser-Arg ₄	212
Dansyl-βAla ₂ -Ala-Arg ₄	213
Dansyl-βAla ₂ -Ser-Arg ₆	213
5-Isoquinoléine-sulfonyl-βAla ₂ -Ser-Arg ₄	214
5-Isoquinoléine-sulfonyl-βAla ₂ -Ala-Arg ₄	214
5-Isoquinoléine-sulfonyl-βAla ₄ -Ser-Arg ₄	215
5-Isoquinoléine-sulfonyl-βAla ₂ -Ser-Arg ₆	215
N-(5-isoquinoléine sulfonyl),N'-(3-propionyl- Ser-Arg ₆)éthylène diamine	216
βAla-Ser-Arg ₆	216

- L'analyse des composés par HPLC a été réalisée sur une colonne de type nucléosil C₁₈. L'élution a été réalisée par un gradient d'acétonitrile dans l'eau selon le protocole suivant:

- 5 minutes d'isocratique en solvant A (3 % d'acétonitrile)

- gradient linéaire de 15 minutes du solvant A vers le solvant B (50 % d'acétonitrile)

- 10 minutes d'isocratique en solvant B

Deux systèmes solvants ont été utilisés:

* système PO₄: acidification des solvants par un tampon phosphate pH 2,5.

* système TFA: acidification des solvants par 0,05 % d'acide trifluoroacétique.

La détection a été effectuée à 215 nm.

ABREVIATIONS UTILISEES

FB: formule brute du composé

MM: masse moléculaire du composé sous forme de sel:

acét = acétate; tfa = trifluoroacétate.

Analyse d'acides aminés:

Th = valeur théorique; Obt = valeur obtenue

FAB = fast atomic bombardment

c-erb A (124-137)

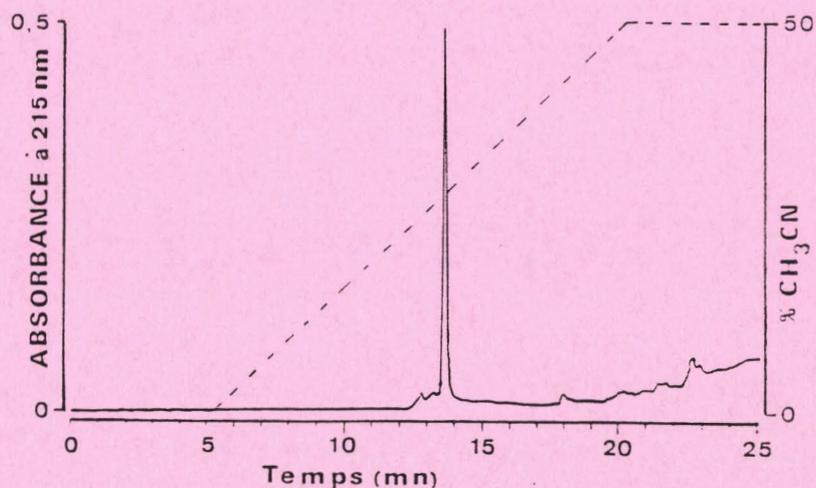
Leu-Asp-Asp-Ser-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Glu

FB: C₇₂ H₁₃₁ N₂₃ O₂₂

MM (acét): 2031,0 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Asp	2	1,97
Ser	1	0,74
Glu	1	1,01
Ala	1	1,02
Val	1	0,98
Ile	1	0,92
Leu	2	2,01
Lys	3	3,03
Arg	2	2,02



HPLC analytique: système phosphate. Pureté: 100 %

[Ala¹²⁵⁻¹²⁶] c-erb A (124-137)

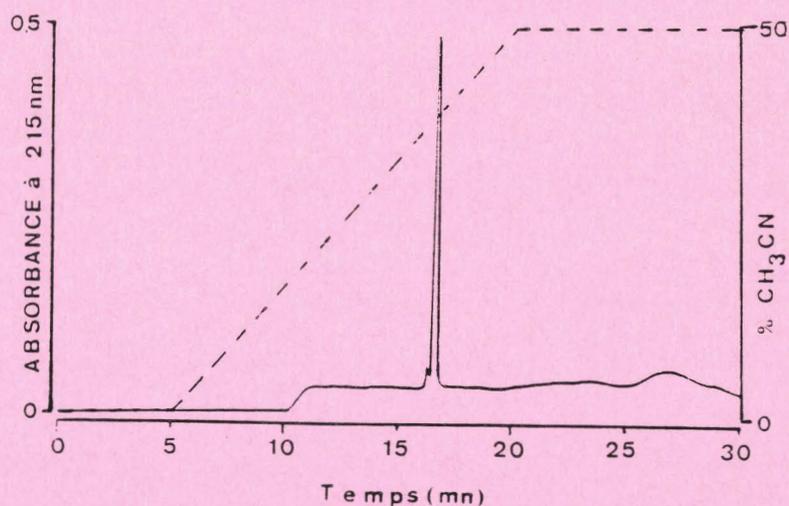
Leu-Ala-Ala-Ser-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Glu

FB: C₇₀ H₁₃₁ N₂₃ O₁₈

MM (tfa): 2267,0 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Ser	1	0,74
Glu	1	1,05
Ala	3	2,91
Val	1	0,97
Ile	1	0,96
Leu	2	0,97
Lys	3	3,06
Arg	2	2,08



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 94,8 %

[Ala¹²⁵] c-erb A (124-137)

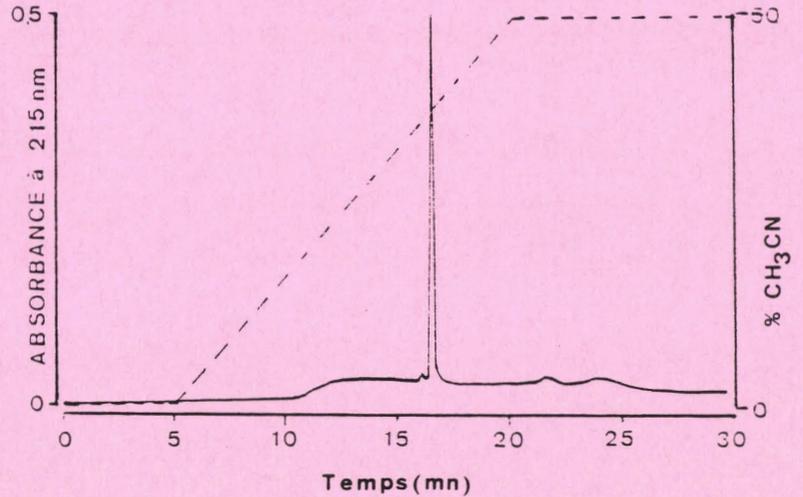
Leu-Ala-Asp-Ser-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Glu

FB: C71 H131 N23 O20

MM (tfa): 2311,0 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Asp	1	1,02
Ser	1	0,78
Glu	1	1,06
Ala	2	2,00
Val	1	0,98
Ile	1	0,94
Leu	2	2,00
Lys	3	2,97
Arg	2	2,03



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 96,8 %

[Ala¹²⁶] c-erb A (124-137)

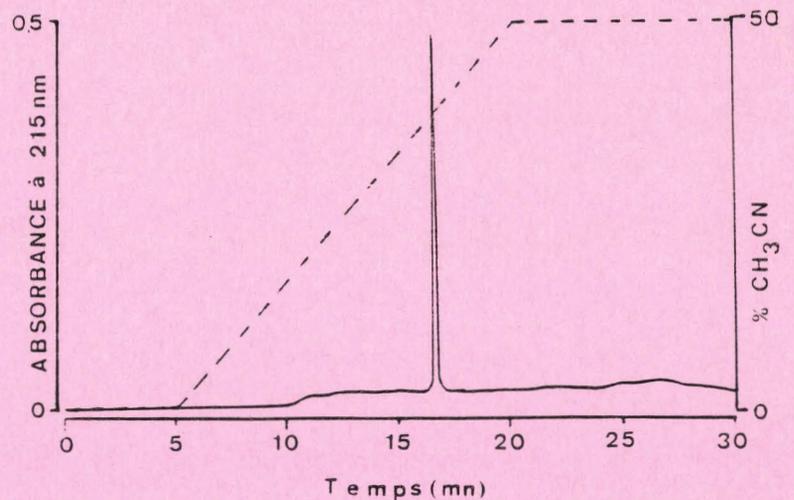
Leu-Asp-Ala-Ser-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Arg-Lys-Leu-Ile-Glu

FB: C71 H131 N23 O20

MM (tfa): 2311,0 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Asp	1	1,04
Ser	1	0,77
Glu	1	1,05
Ala	2	2,09
Val	1	0,85
Ile	1	0,93
Leu	2	2,03
Lys	3	3,03
Arg	2	2,03



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 98,5 %



"SUBSTRAT S1"

Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Arg-Arg-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg



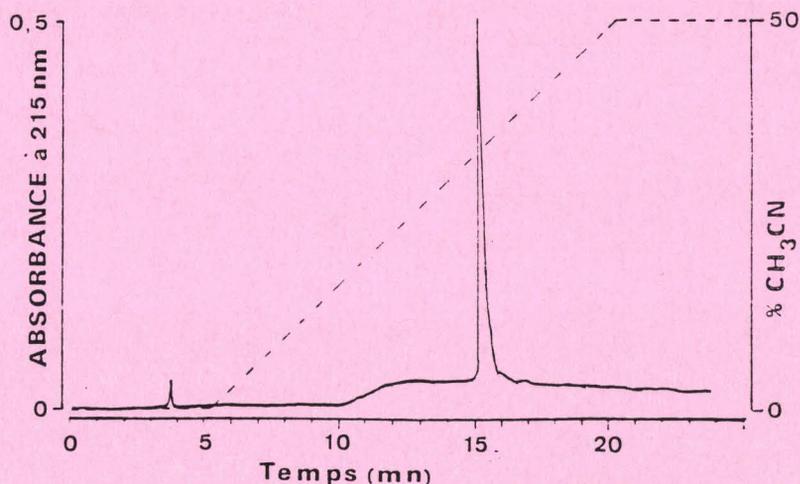
EB: C78 H156 N50 O16

MM (acét): 2830,4 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	12	11,95
Ala	1	1,03
Ser	1	1,02

Séquence: confirmée par
microséquençage phase gaz



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

"SUBSTRAT S2"

Arg-Ala-Arg-Ala-Arg-Ala-Ala-Arg-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

EB: C75 H147 N45 O17

MM (acét): 2050,4 g

Analyse d'acides aminés:

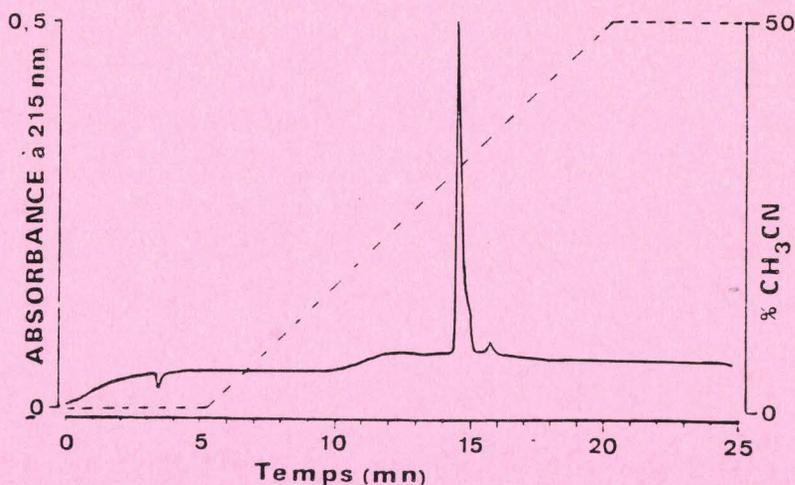
	Th	Obt
Arg	10	9,53
Ala	4	4,00
Ser	1	0,97

Séquence: confirmée par
microséquençage phase gaz

Spectre de masse (FAB)

attendu: 1950,5 g

obtenu: 1950 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 96,9 %

"SUBSTRAT S3"

Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Ala-Arg-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

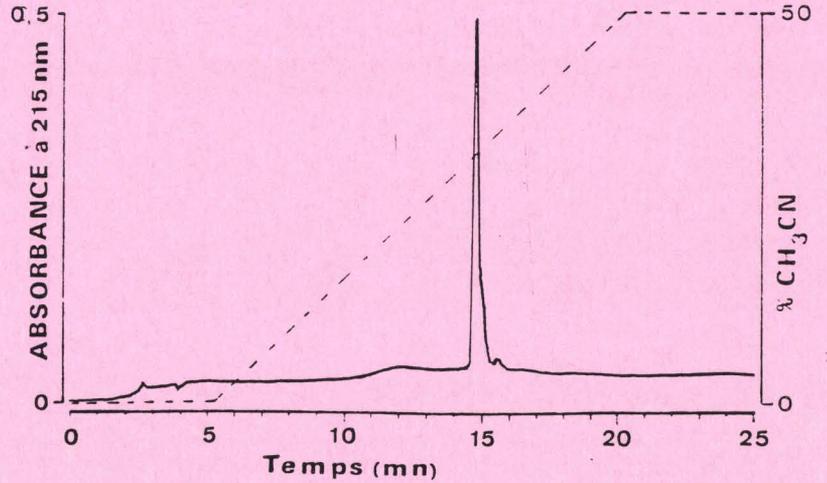
FB: C₇₅ H₁₄₉ N₄₇ O₁₆

MM (acét): 2685,3 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	11	10,84
Ala	2	2,17
Ser	1	0,99

Séquence: confirmée par
microséquençage phase gaz



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 96,8 %

"SUBSTRAT S4"

Arg-Arg-Ala-Arg-Arg-Ala-Ala-Arg-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg

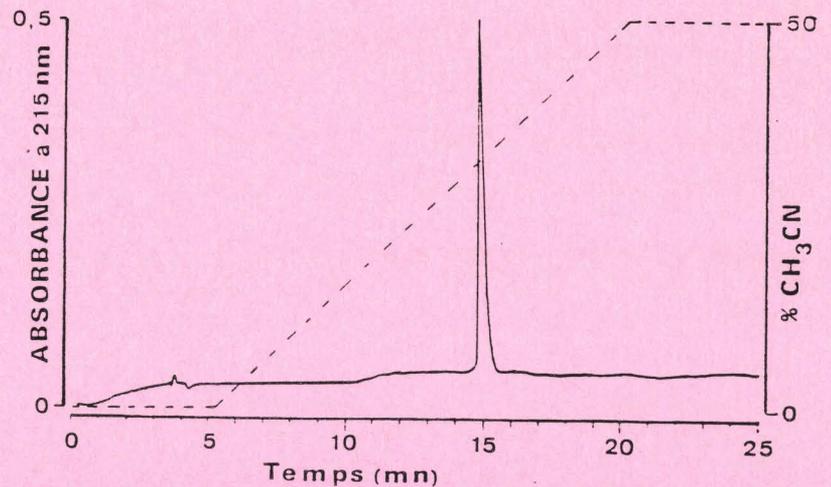
FB: C₇₈ H₁₅₄ N₄₈ O₁₇

MM (tfa): 3404,4 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	11	
Ala	3	
Ser	1	

Séquence: confirmée par
microséquençage phase gaz



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

Gly-Ser-Arg₆-Tyr

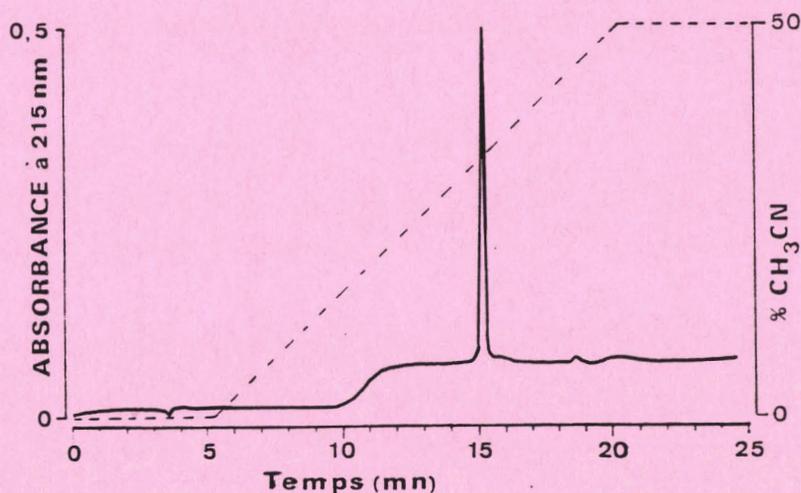
EB: C₅₀ H₉₁ N₂₇ O₁₂

MM (acét): 1682,4 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Gly	1	1,03
Ser	1	0,91
Arg	6	5,95
Tyr	1	1,01

Séquence: confirmée par
microséquençage phase gaz



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 98,8 %

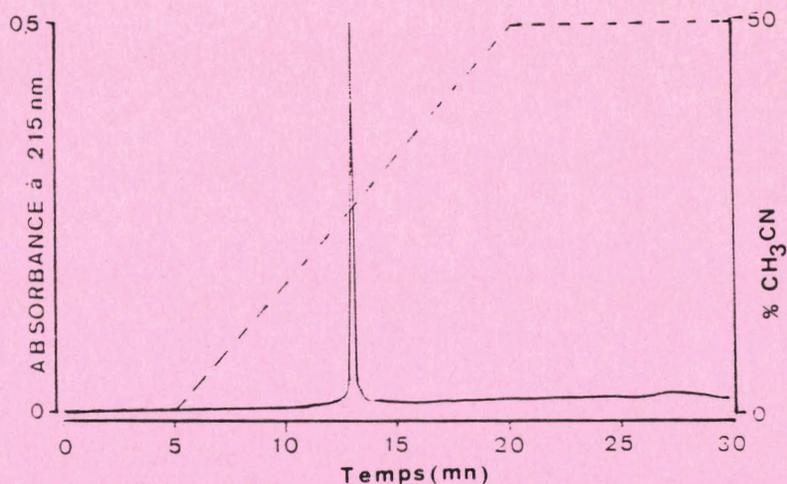
Gly-Ser-Ala₃-Arg₃

EB: C₃₂ H₆₁ N₁₇ O₁₀

MM (acét): 1084,0 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Gly	1	1,0
Ser	1	1,0
Ala	3	2,8
Arg	3	3,2



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

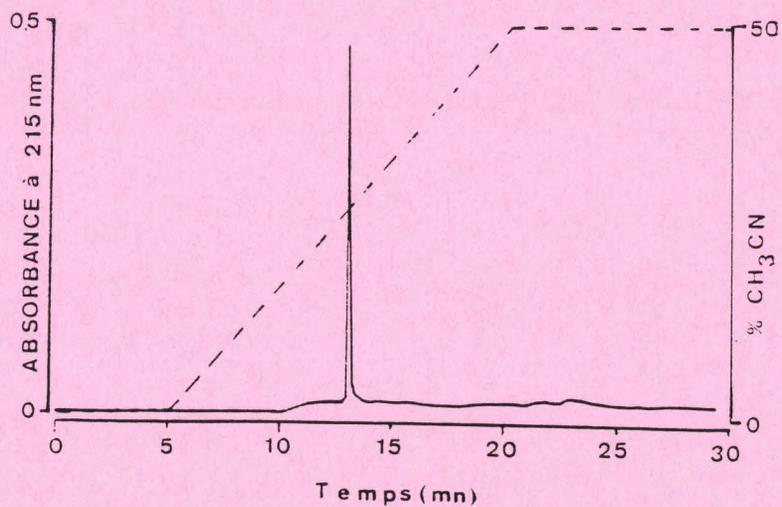
Gly-Ser-Arg₆

EB: C₄₁ H₈₂ N₂₆ O₁₀

MM (acét): 1519,3 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	6	6,0
Ser	1	0,9
Gly	1	1,1



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

Arg₄-Ala-Arg₆

EB: C₆₃ H₁₂₇ N₄₁ O₁₂

MM (acét): 2311,0 g

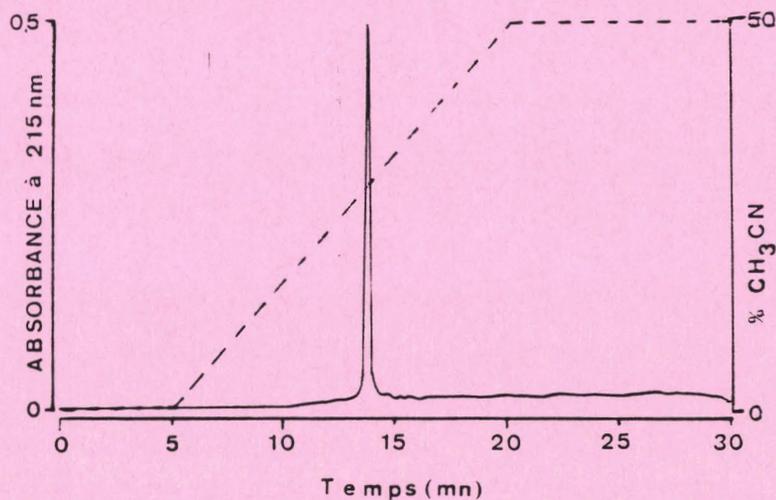
Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	10	9,8
Ala	1	1,2

Spectre de masse (FAB)

attendu: 1650,1 g

obtenu: 1650 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 98,0 %

Arg₄-Ala-Gly-Arg₄

EB: C₅₃ H₁₀₆ N₃₄ O₁₁

MM (Acét): 1935,7 g

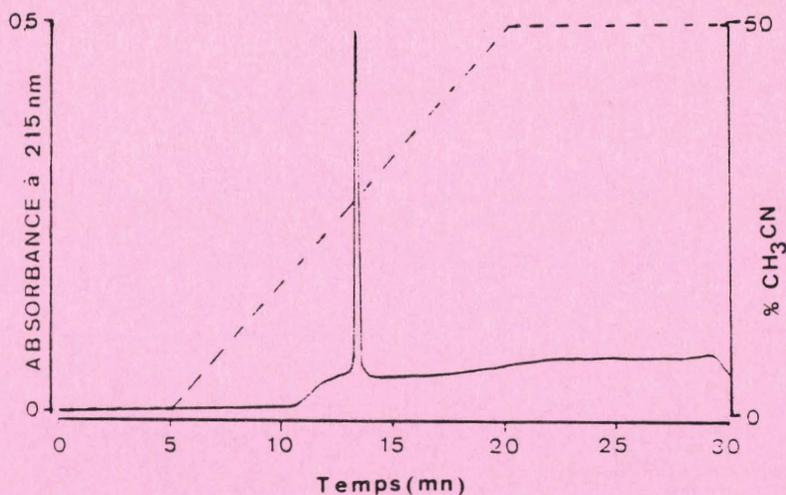
Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	8	8,4
Ala	1	0,7
Gly	1	0,9

Spectre de masse (FAB)

attendu: 1395,7 g

obtenu: 1396 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

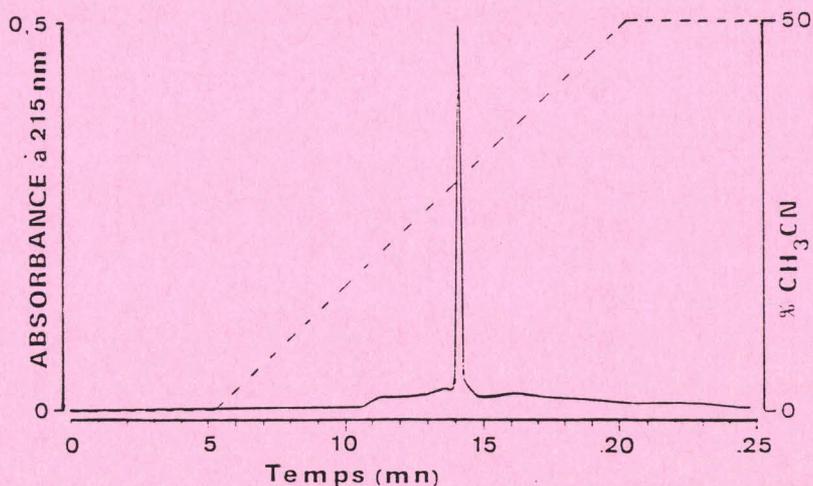
Ala-Arg₆

FB: C₃₉ H₇₉ N₂₅ O₈

MM (tfa): 1446,2 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	6	6,1
Ala	1	0,9



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 98,5 %

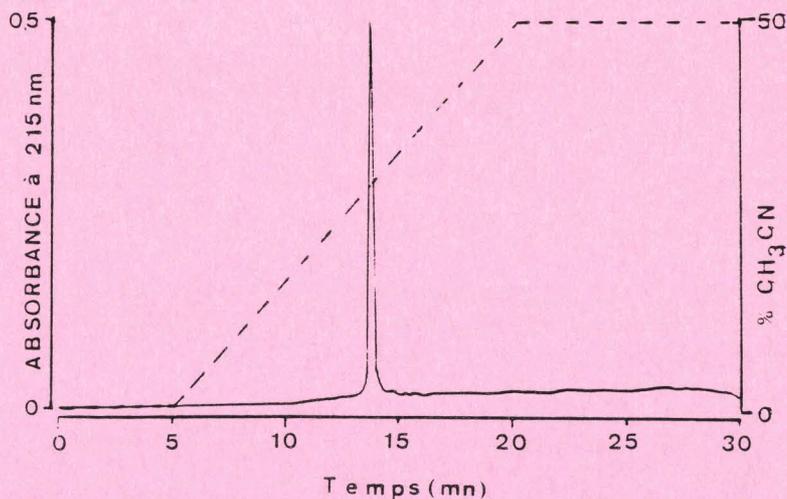
Arg-Ala-Arg₆

FB: C₄₅ H₉₁ N₂₉ O₉

MM (Acét): 1662,4 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	7	6,8
Ala	1	1,2



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 96,4 %

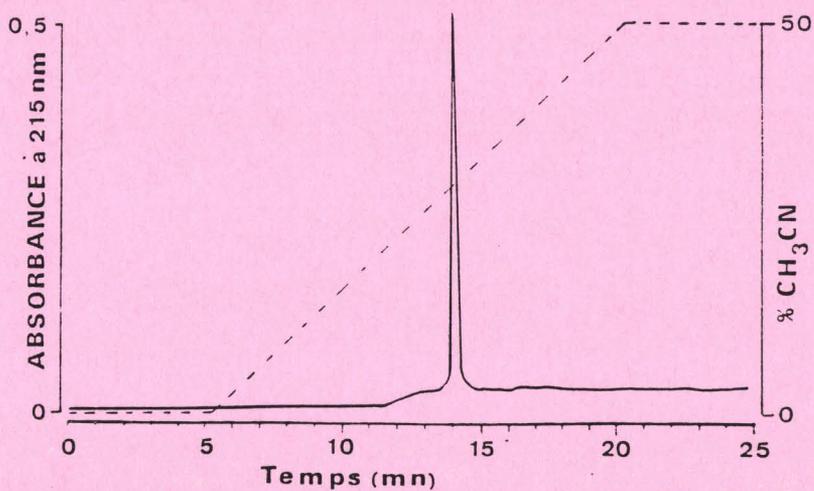
Gly-DSer-Arg₆

FB: C₄₁ H₈₂ N₂₆ O₁₀

MM (acét): 1519,3 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Arg	6	6,2
Ser	1	0,8
Gly	1	1,0



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 99,7 %

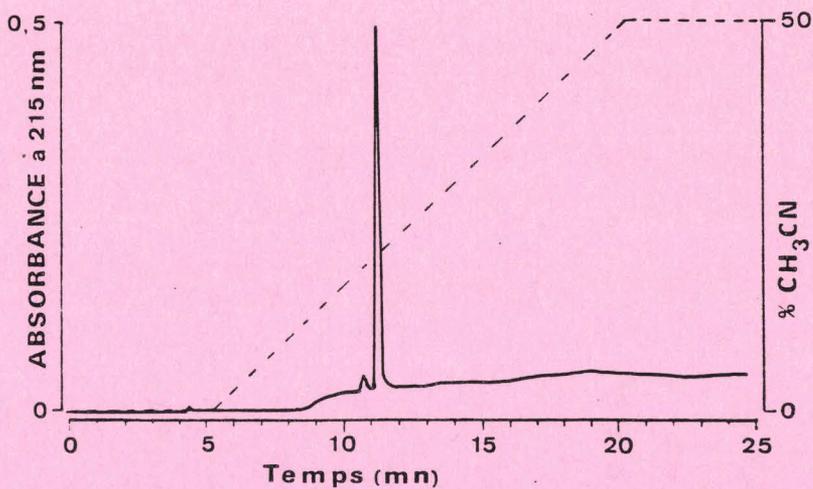
Gly-Met-Arg₆

FB: C₄₃ H₈₆ N₂₆ O₉ S

MM (acét): 1563,4 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Gly	1	1,04
Met	1	0,96
Arg	6	6,00



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 95,4 %

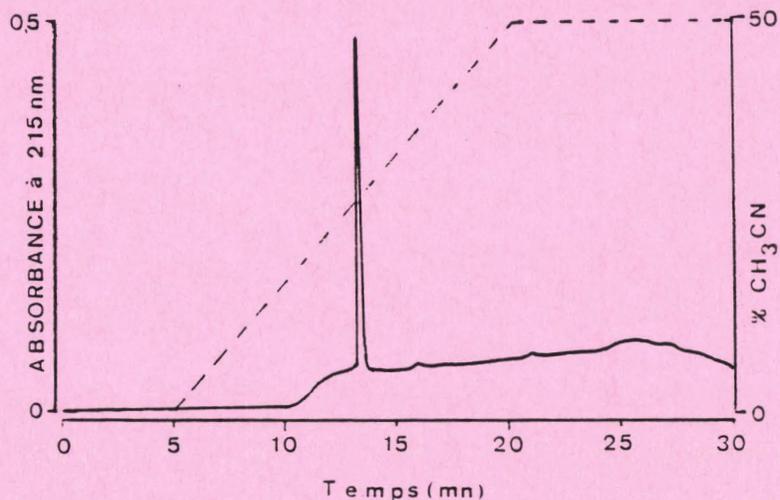
Lys-Arg₆

FB: C₄₂ H₈₆ N₂₆ O₈

MM (acét): 1562,8 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Lys	1	0,99
Arg	6	6,01



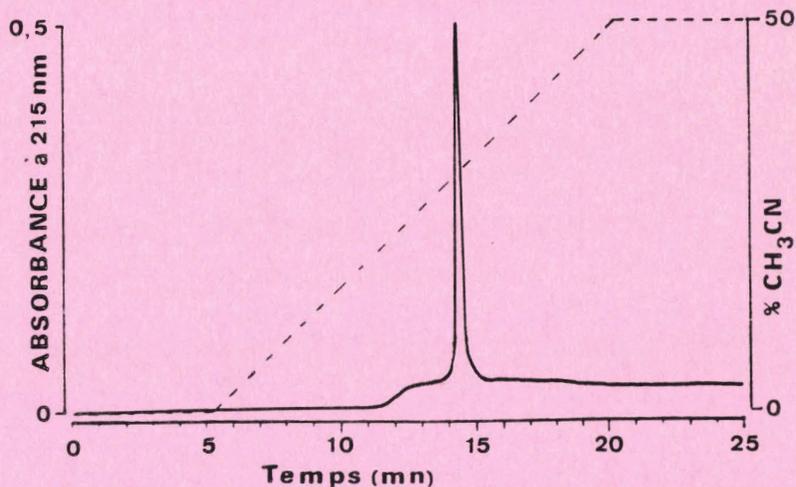
HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

"DAP-Arg₆"

Arg₆ (2,3-diaminopropionate)

FB: C₃₉ H₈₁ N₂₆ O₈

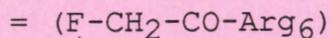
MM (acét): 1522,3 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté 100 %.

Le pic unique contient le couple
de diastéréoisomères non résolus.

Arg₆ fluoroacétate



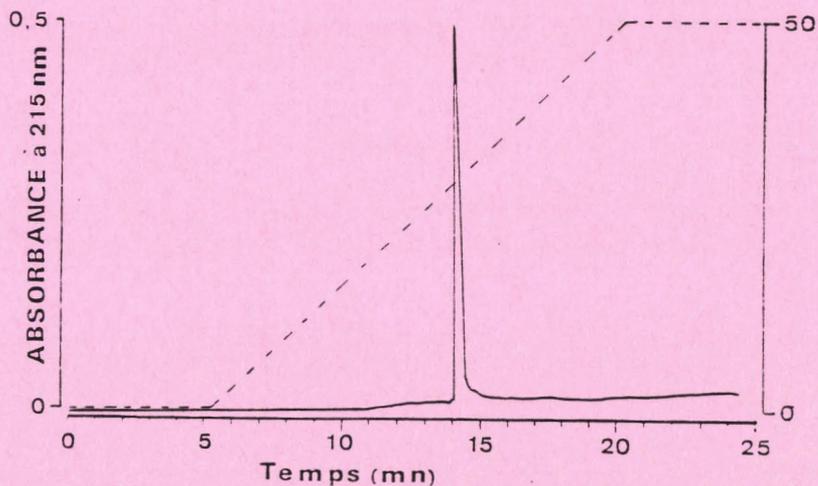
EB: C₃₈ H₇₅ N₂₄ O₈F

MM (Acét): 1375,3 g

Spectre de masse (FAB):

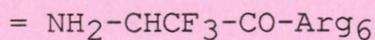
attendu = 1015,3 g

obtenu = 1015 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

Trifluoroala-Arg₆



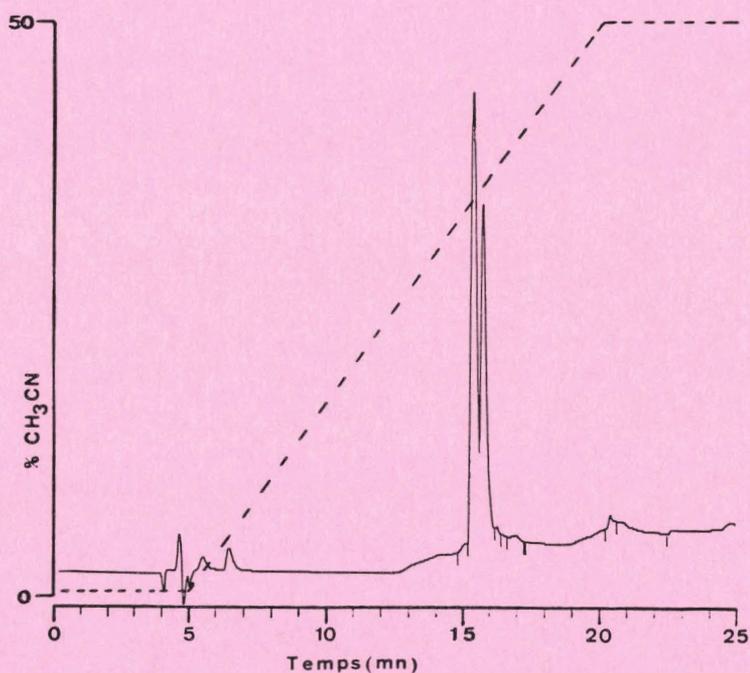
EB: C₃₉ H₇₆ N₂₅ O₈ F₃

MM (Acét): 1500,2 g

Spectre de masse (FAB)

attendu: 1080,2 g

obtenu: 1080 g



HPLC analytique: système TFA

2 diastéréoisomères non séparés

DTyr-DArg₆-DSer-Gly

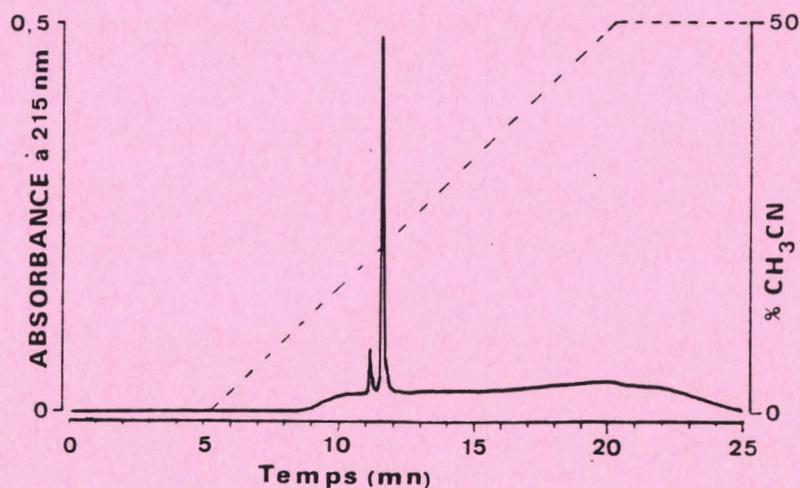
Rétro-Inverso (Gly-Ser-Arg₆-Tyr)

FB: C₅₀ H₉₁ N₂₇ O₁₂

MM (acét): 1682,4 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Ser	1	0,89
Gly	1	1,10
Tyr	1	0,83
Arg	6	6,07



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 86,6 %

[Ala⁹⁻¹⁰, Lys¹¹⁻¹²] GS (1-12)

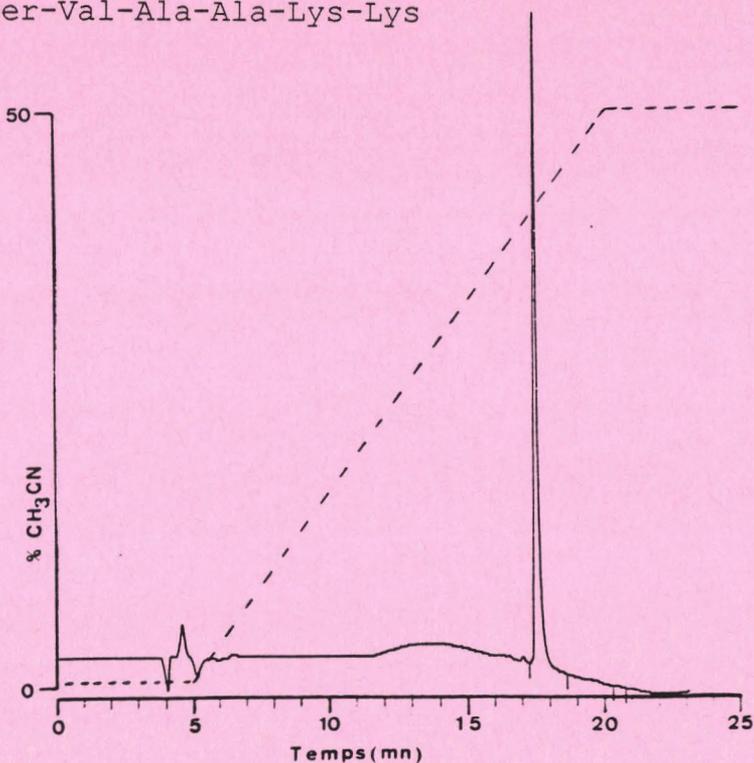
Pro-Leu-Ser-Arg-Thr-Leu-Ser-Val-Ala-Ala-Lys-Lys

EB: C₅₆ H₁₀₃ N₁₇ O₁₆

MM (acét): 1510,5 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Thr	1	0,97
Ser	2	1,85
Pro	1	1,03
Ala	2	2,05
Val	1	1,03
Leu	2	1,99
Lys	2	1,96
Arg	1	0,97



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

PKC (19-31)

Pseudosubstrat prototype: P_{Ala}

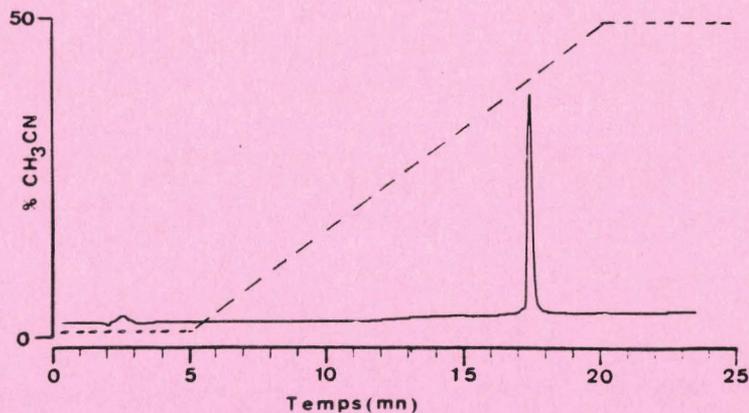
Arg-Phe-Ala-Arg-Lys-Gly-Ala-Leu-Arg-Gln-Lys-Asn-Val

EB: C₆₇ H₁₁₈ N₂₆ O₁₆

MM (tfa): 2227,8 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Asp	1	0,95
Glu	1	0,94
Gly	1	1,00
Ala	2	1,98
Val	1	1,03
Leu	1	1,03
Phe	1	0,97
Lys	2	2,15
Arg	3	2,96



HPLC analytique: système phosphate. Pureté: 94,6 %

Rétro-Inverso PKC (19-31)

RIP_{Ala}

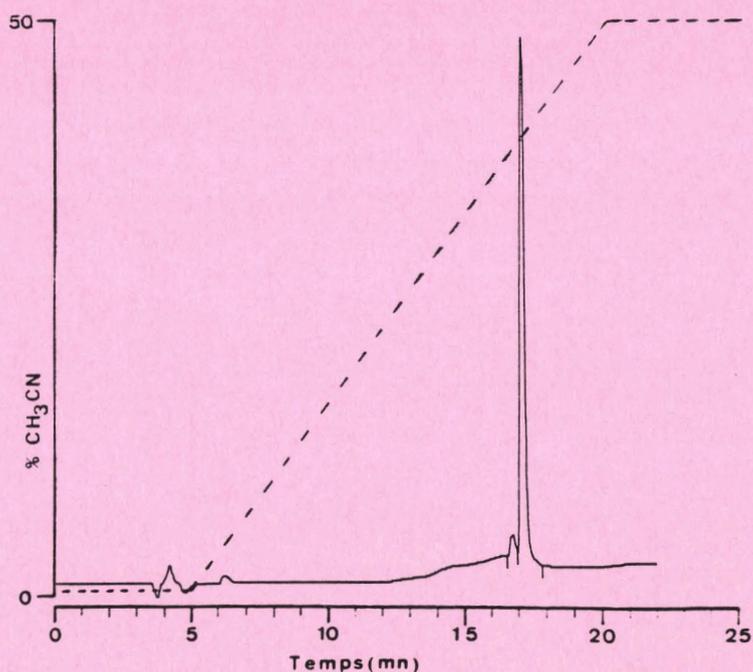
CH₃-CO-DVal-DAsn-DLys-DGln-DArg-DLeu-DAla-Gly-DLys-DArg-DAla-
DPhe-DArg-NH₂

EB: C₆₉ H₁₂₁ N₂₇ O₁₆

MM (acét): 1885,2 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Asp	1	0,94
Glu	1	0,94
Gly	1	1,03
Ala	2	2,02
Val	1	0,97
Leu	1	0,99
Phe	1	0,97
Lys	2	2,16
Arg	3	2,97



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 95,6 %

Rétro-Inverso [Ser²⁵] PKC (19-31)

RIP_{Ser}

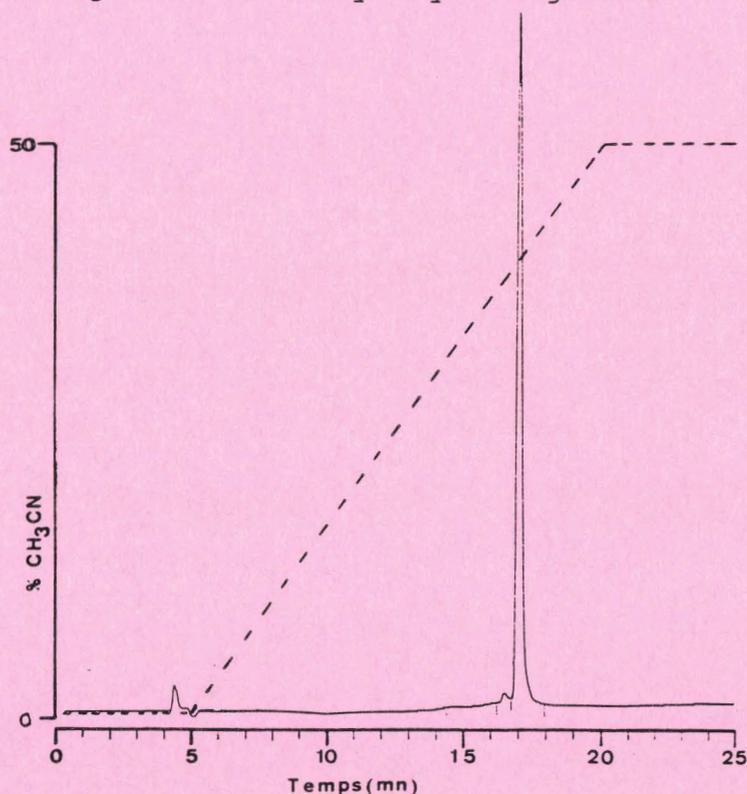
CH₃-CO-DVal-DAsn-DLys-DGln-DArg-DLeu-DSer-Gly-DLys-DArg-DAla-
DPhe-DArg-NH₂

EB: C₆₉ H₁₂₁ N₂₇ O₁₇

MM (acét): 1900,9 g

Analyse d'acides aminés:

	Th	Obt
Asp	1	0,98
Ser	1	0,87
Glu	1	1,01
Gly	1	1,01
Ala	1	1,01
Val	1	0,99
Leu	1	1,00
Phe	1	0,98
Lys	2	2,00
Arg	3	3,00



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

Dansyl-Arg₆

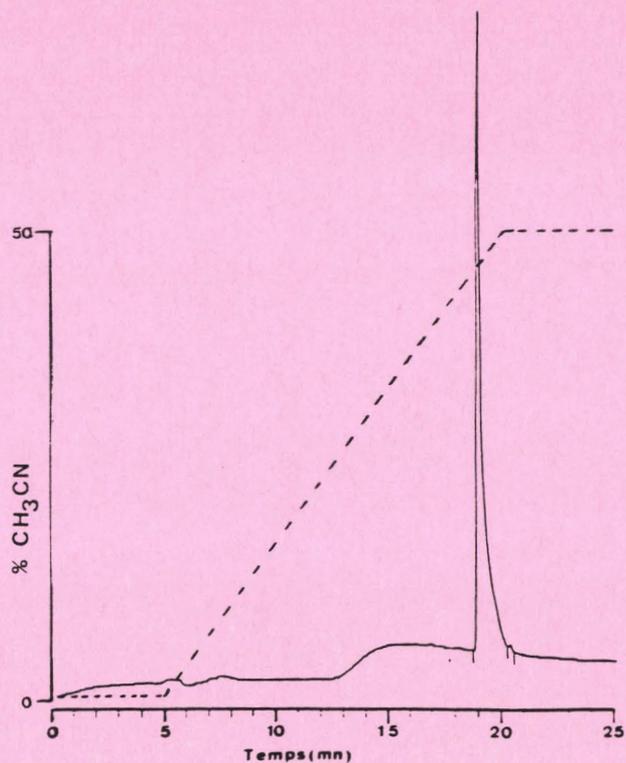
FB: C₄₈ H₈₅ N₂₅ O₉ S

MM (Acét): 1548,4 g

Spectre de masse (FAB):

attendu : 1188,4 g

obtenu: 1188 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

5-Isoquinoléine sulfonyl-Arg₆

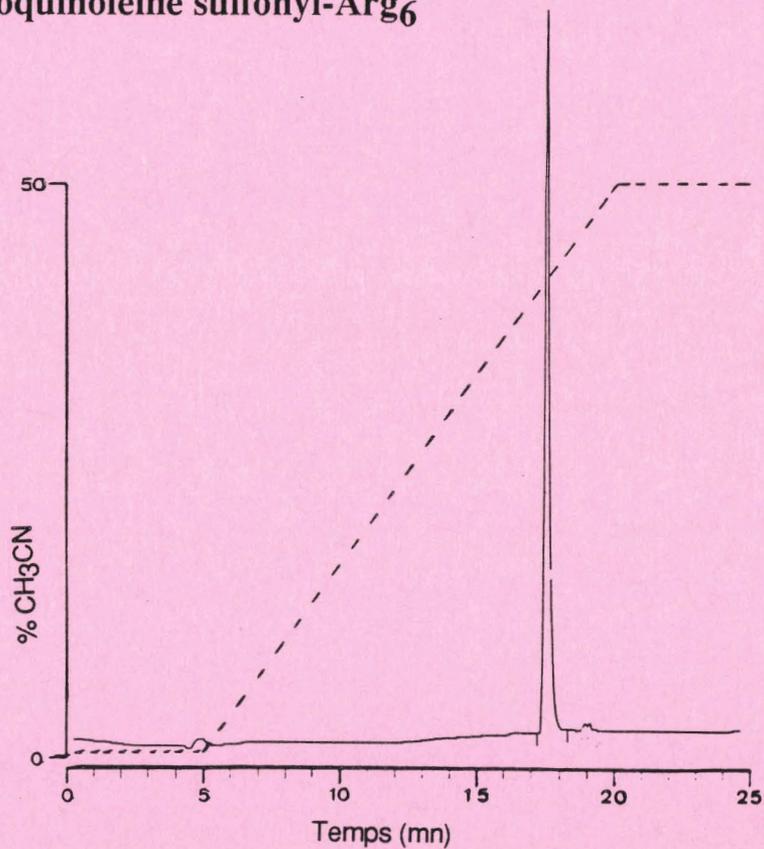
FB: C₄₅ H₇₉ N₂₅ O₉ S

MM (Acét): 1506,4 g

Spectre de masse (FAB):

attendu : 1146,4 g

obtenu: 1146 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

Théophylline-Arg₆

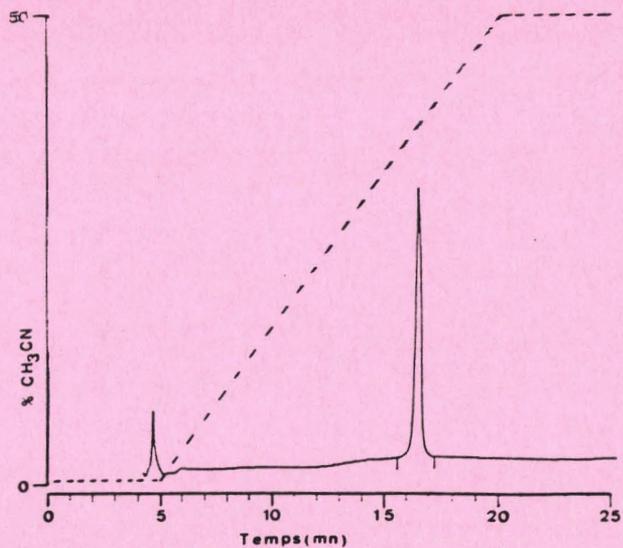
EB: C₄₅ H₈₂ N₂₈ O₁₀

MM (Acét): 1535,3 g

Spectre de masse (FAB):

attendu: 1175,2 g

obtenu: 1175 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

Dansyl-βAla₂-Ser-Arg₄

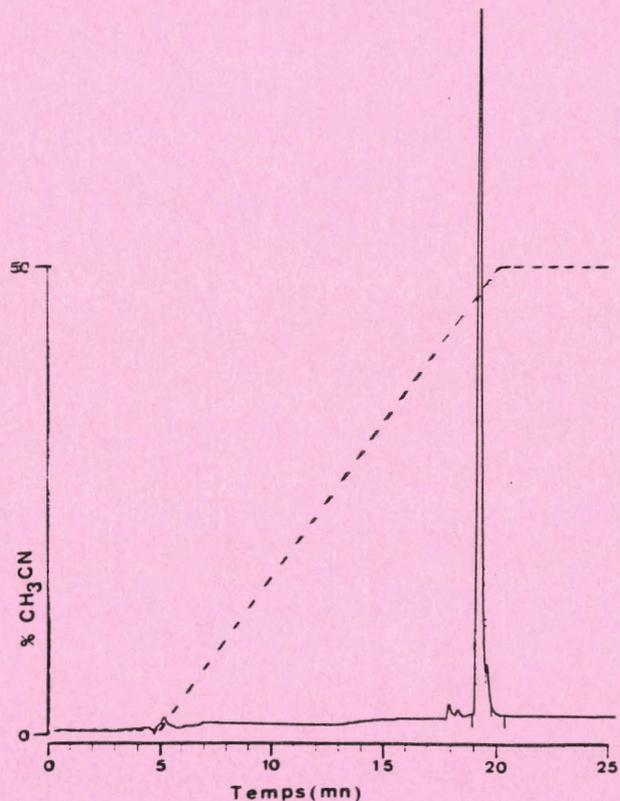
EB: C₄₅ H₇₆ N₂₀ O₁₁ S

MM (acét): 1345,5 g

Spectre de masse (FAB):

masse attendue: 1105,6 g

trouvée: 1105 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

Dansyl- β Ala₂-Ala-Arg₄

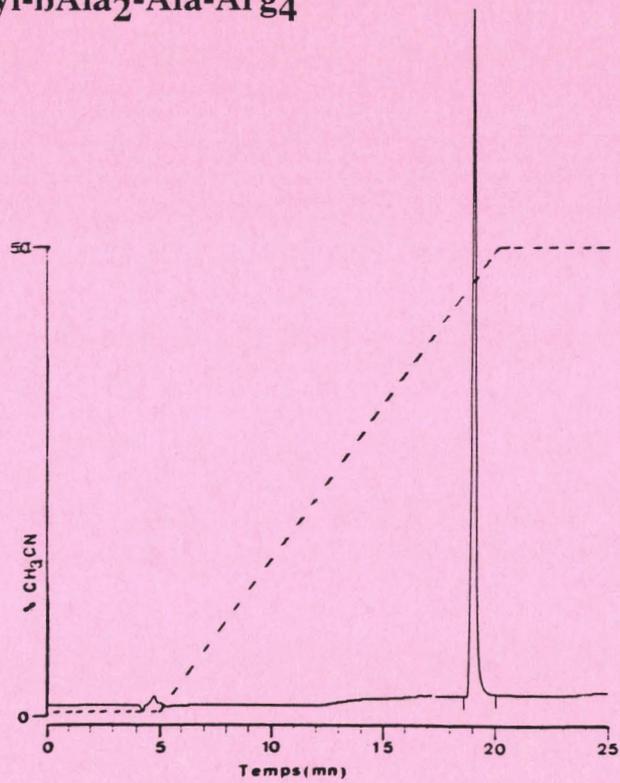
FB: C₄₅ H₇₆ N₂₀ O₁₀ S

MM (acét): 1329,5 g

Spectre de masse (FAB):

masse attendue: 1089,5 g

trouvée: 1089 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

Dansyl- β Ala₄-Ser-Arg₄

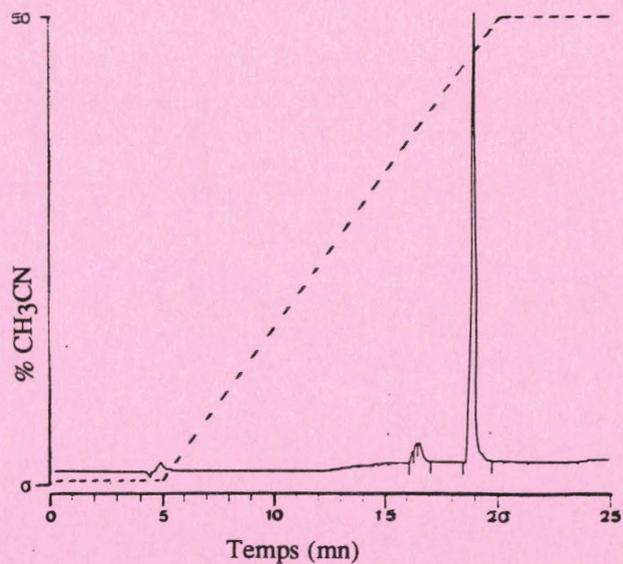
FB: C₅₁ H₈₆ N₂₂ O₁₃ S

MM (acét): 1487,4 g

Spectre de masse (FAB):

masse attendue: 1247,2 g

trouvée: 1247 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 95,3 %

5 Isoquinoléine-sulfonyl- β Ala₂-Ser-Arg₄

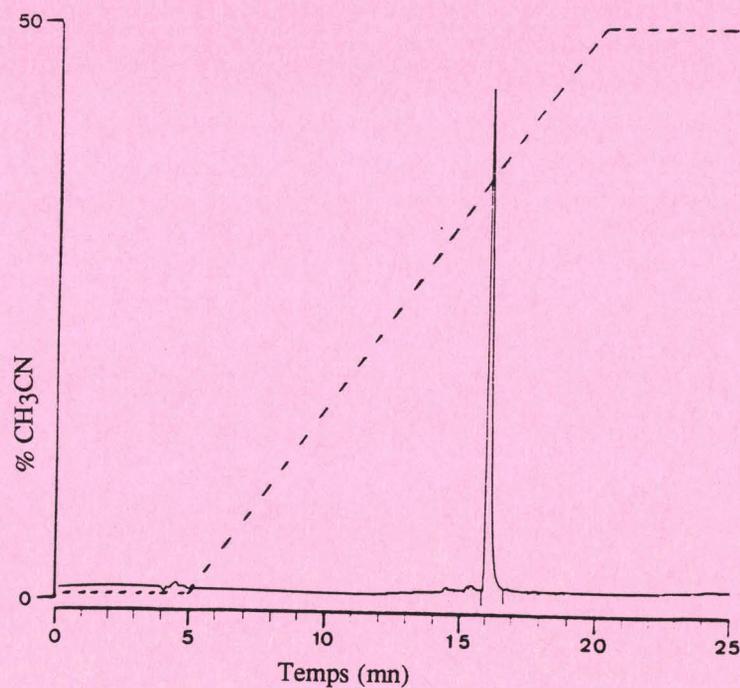
FB: C₄₂ H₇₀ N₂₀ O₁₁ S

MM (acét): 1303,0 g

Spectre de masse (FAB):

attendu: 1063 g

obtenu: 1062,6 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

5 Isoquinoléine-sulfonyl- β Ala₂-Ala-Arg₄

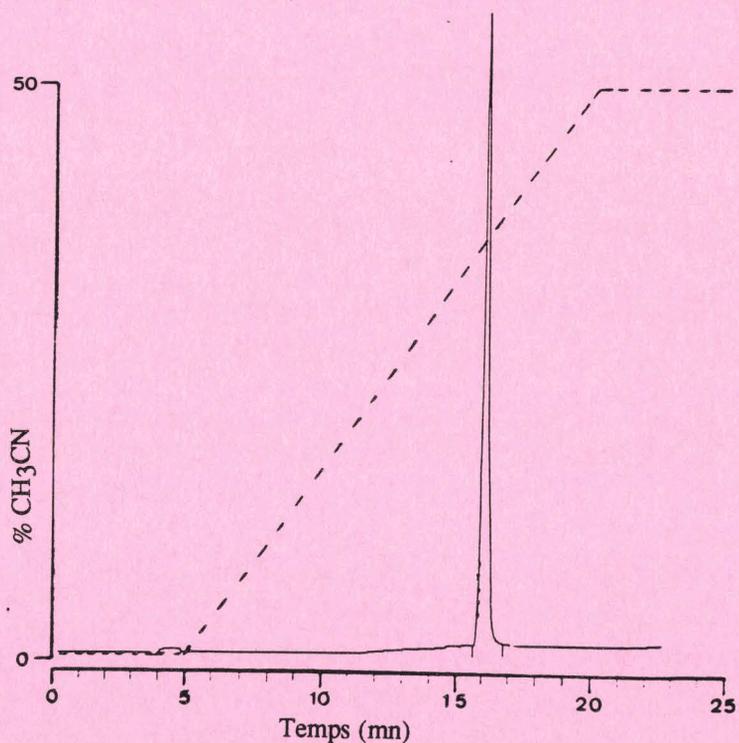
FB: C₄₂ H₇₀ N₂₀ O₁₀ S

MM (acét): 1287,0 g

Spectre de masse (FAB):

attendu: 1047 g

obtenu: 1047 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

5 Isoquinoléine-sulfonyl-βAla₄-Ser-Arg₄

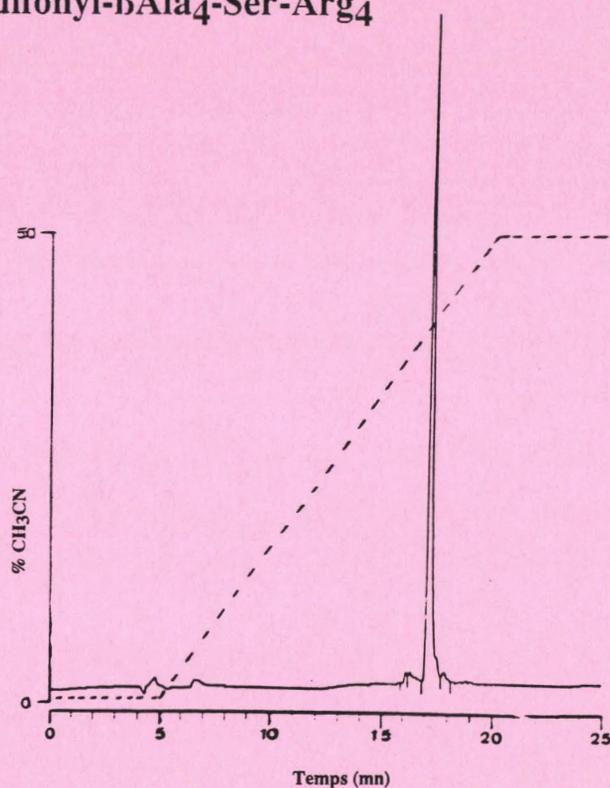
FB: C₄₈ H₈₀ N₂₂ O₁₃ S

MM (acét): 1445,0 g

Spectre de masse (FAB):

attendu: 1205,1 g

obtenu: 1205 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 97,0 %

5 Isoquinoléine-sulfonyl-βAla₂-Ser-Arg₆

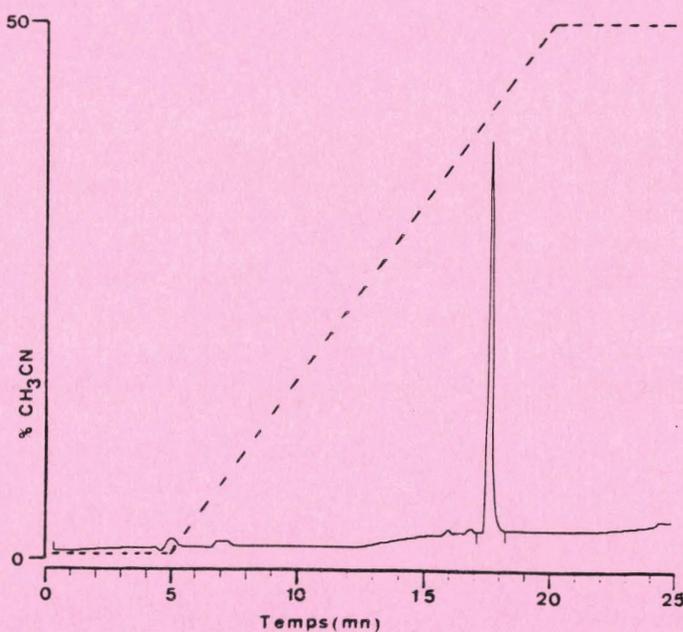
FB: C₅₄ H₉₄ N₂₈ O₁₃ S

MM (acét): 1735,6 g

Spectre de masse (FAB):

masse attendue: 1375,5 g

trouvée: 1375 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 100 %

N-(isoquinoléine sulfonyl), N'-(3-propionyl-Ser-Arg₆)

- éthylène diamine

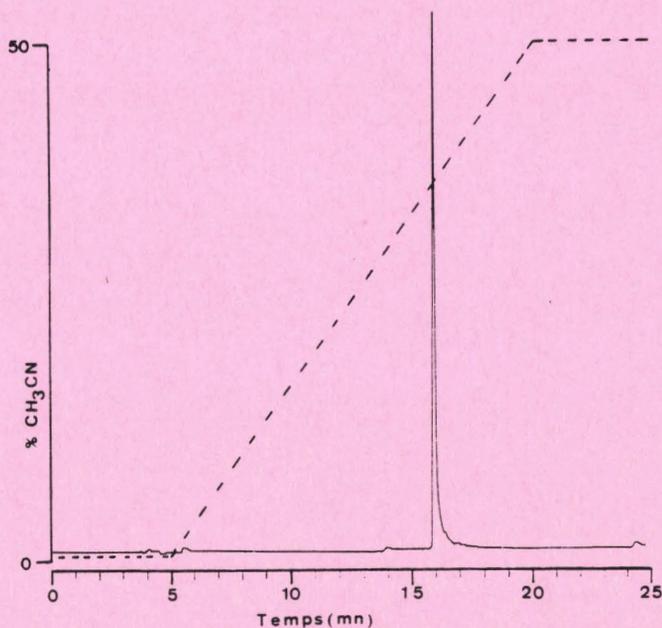
EB: C₅₃ H₉₄ N₂₈ O₁₂ S

MM (acét): 1767,9 g

Spectre de masse (FAB)

Attendu: 1347,6 g

Obtenu: 1348 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 98,6 %

βAla-Ser-Arg₆

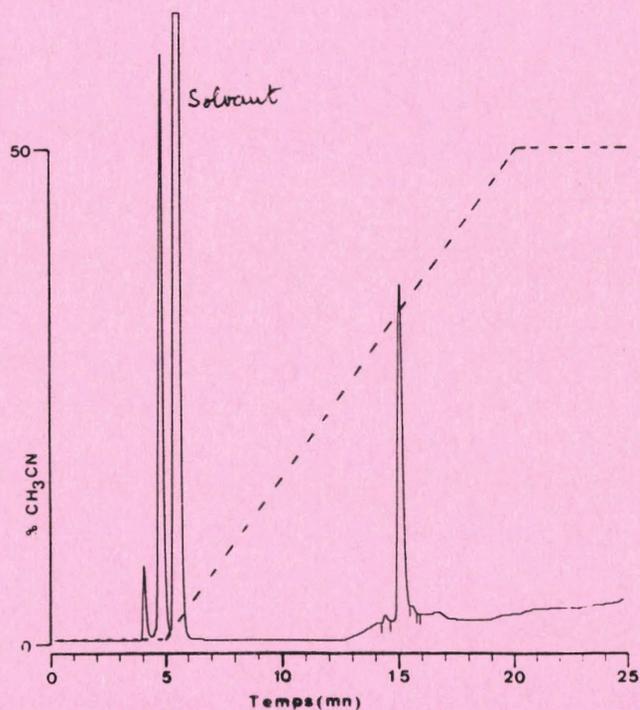
EB: C₄₂ H₈₄ N₂₆ O₁₀

MM (acét): 1533,3 g

Spectre de masse (FAB)

Attendu: 1113,3 g

Obtenu: 1113 g



HPLC analytique: système TFA. Pureté: 94,5 %

BIBLIOGRAPHIE

ADEREM A.A., ALBERT K.A., KEUM M.M., WANG J.K.T., GREENGARD P.,
COHN Z.A.

Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for
protein kinase C.

Nature (1988) **332**, 362-364.

ASHENDEL C.L.

The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein
kinase.

Biochemica et Biophysica Acta. (1985) **822**, 219-242.

AVRAMEAS S., TERNYNCK T.

The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use
for the preparation of immunoabsorbents.

Immunochemistry (1969) **6**, 53-66.

AVRAMEAS S., TERNYNCK T., GUESDON J.L.

Coupling of enzymes to antibodies and antigens.

Scand. J. Immunol. (1978) **8(7)**, 7-23.

BAISSE J.

Bulletins de la Société Chimique de France (1949) 769.

BELL R.M.

Protein kinase C activation by diacylglycerol second
messengers.

Cell (1986) **45**, 631-632.

BERRIDGE M.J.

Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers.

Biochem. J. (1984) **220**, 345-360.

BODANSKY M.

In search of new methods in peptide synthesis

Int. J. Peptide Prot. Res. (1985) **25**, 449-474.

BOLLAG G.E., ROTH R.A., BEAUDOIN J., MOCHLY-ROSEN D., KOSHLAND
D.E.

Protein kinase C directly phosphorylates the insulin receptor
in vitro and reduces its protein-tyrosine kinase activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1986) **83**, 5822-5824.

BRYANT T.N., WATSON H.C., WENDELL P.L.

Structure of yeast phosphoglycerate kinase.

Nature (1974) **247**, 14-17.

CARPENTER D., JACKSON T., HANLEY M.R.

Protein kinase Cs. Coping with a growing family.

Nature. (1987) **325**, 107-108.

CHRISTENSEN T.

A qualitative test for monitoring coupling completeness in solid phase peptide synthesis using chloranil.

Acta Chemica Scandinavica (1979) **B 33**, 763-766.

CLELAND W.W.

Dithithreitol, a new protective reagent for SH groups.

Biochemistry (1964) **3(4)**, 480-482.

COUSSENS L., PARKER P.J., L. RHEE, YANG-FENG T.L., CHEN E., WATERFIELD M.D., FRANCKE U., ULLRICH A.

Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways.

Science (1986) **233**, 859-866.

DOOLITTLE R.F.

Of URFS and ORFS. A primer of how to analyse derivated amino acid sequences.

University Science Books (Oxford University Press)

FERRARI S., MARCHIORI F., BORIN G., PINNA L.A.

Distinct structural requirements of Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) and cAMP-dependent protein kinase as evidenced by synthetic substrates.

Febs Letters (1985), **184(1)**, 72-77.

FERRARI S., MARCHIORI F., MARIN O., PINNA L.A.

Ca^{2+} phospholipid-dependent and independent phosphorylation of synthetic peptide substrates by protein kinase C.

Eur. J. Biochem. (1987) **163**, 481-487.

FONTANA A., GROSS E.

Fragmentation of polypeptides by chemical methods - 2. Cleavage of disulfide bonds.

DARBRE A. Practical Protein Chemistry - A Handbook.

Ed. J. WILEY and SONS.

GALLIS B., LEWIS A., WIGNALL J., ALPERT A., MOCHIZUKI D.Y., COSMAN D., HOPP T., URDAL D.

Phosphorylation of the human interleukin-2 receptor and a synthetic peptide identical to its C-terminal, cytoplasmic domain.

J. Biol. Chem. (1986) **261(11)**, 5075-5080.

GANONG B.R., LOOMIS C.R., HANNUN Y A., BELL R.M.

Specificity and mechanism of protein kinase C activation by *sn*-1,2-diacylglycerols.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1986) **83**, 1184-1188.

GERARD C., Mc PHAIL L.C., MARFAT A., STIMLER-GERARD N.P., BASS D.A., McCALL C.E.

Role of protein kinases in stimulation of human polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism by various agonists. Differential effects of a novel protein kinase inhibitor.

J. Clin. Invest. (1986) **77**, 61-65.

GISIN B.F.

The monitoring of reactions in solid-phase peptide synthesis with picric acid.

Analytica Chemica Acta. (1972) **58**, 248-249.

GISIN B.F.

The preparation of Merrifield-Resins through total esterification with cesium salts.

Helvetica Chemica Acta. (1973) **56**, 142-143.

GLASS D.B., MASARACCHIA R.A., FERAMISCO J.R., KEMP B.E.

Isolation of phosphorylated peptides and proteins on ion exchange papers.

Analytical Biochemistry (1978) **87**, 566-575.

- GOULD K.L., WOODGETT J.R., COOPER J.A., BUSS J.E., SHALLOWAY D.,
HUNTER T.
Protein kinase C phosphorylates pp60^{src} at a novel site.
Cell (1985) **42**, 849-857.
- HABEEB A.F.S A.
Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent.
Methods in enzymology. **25**, 457-465.
- HANCOCK W.S., BATTERSBY J.E., HARDING D.R.K.
The use of picric acid as a simple monitoring procedure for
automated peptide synthesis
Analytical Biochemistry (1975) **69**, 497-503.
- HARDIE G.
Pseudosubstrates turn off protein kinases.
Nature (1988) **335**, 592-593.
- HIDAKA H., INAGAKI M., KAWAMOTO S., SASAKI Y.
Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic
nucleotid dependent protein kinase and protein kinase C.
Biochemistry (1984) **23**, 5036-5041.
- HIDAKA H., HAGIWARA M.
Pharmacology of the isoquinolinesulfonamide protein kinase C
inhibitors.
TIPS (1987) **8**, 162-163.
- HOUSE C., KEMP B.E.
Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its
regulatory domain.
Science (1987a) **238**, 1726-1728.
- HOUSE C., WETTENHALL R.E.H., KEMP B.E.
The influence of basic residues on the substrate specificity of
protein kinase C.
J. Biol. Chem. (1987b) **262**(2), 772-777.

HUNTER T., LING N., COOPER J.A.

Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane.

Nature (1984) **311**, 480-483.

KAISER E., COLESCOTT R.L., BOSSINGER C.D., COOK P.I.

Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides

Analytical Biochemistry (1970) **34(2)**, 595-598.

KASE H., IWAHASHI K., NAKANISHI S., MATSUDA Y., YAMADA K., TAKAHASHI M., MURAKATA C., SATO A., KANEKO M.

K-252 compounds, noval and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1987) **142(2)**, 436-440.

KELLER O., RUDINGER J.

Preparation and some properties of maleimido acids and maleoyl derivatives of peptides.

Helvetica Chemica Acta (1975) **58(2)**, 531-540.

KEMP B.E., BENJAMINI E., KREBS E.G.

Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3':5'-cyclic AMP-dependent protein kinase.

Biochemistry (1976), **73(4)**, 1038-1042.

KEMP B.E., GRAVES D.J., BENJAMINI E., KREBS E.G.

Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase.

J. Biol. Chem. (1977), **252(14)**, 4888-4894.

KEMP B.E.

Phosphorylation of synthetic peptide analogs of rabbit cardiac troponin inhibitory subunit by the cyclic AMP-dependent protein kinase.

J. Biol. Chem. (1979), **254(8)**, 2638-2642.

KEMP B.E., PEARSON R.B., HOUSE C.

Role of basic residues in the phosphorylation of synthetic peptides by myosin light chain kinase.

Biochemistry (1983), **80**, 7471-7475.

- KIKKAWA U., ONO Y., OGITA K., FUJII T., ASAOKA Y., SEKIGUCHI K.,
KASAKA Y., IGARASHI K., NISHIZUKA Y.
Identification of the structures of multiples subspecies of
protein kinase C expressed in rat brain.
Febs Letters (1987a) **217**, 227-231.
- KIKKAWA U., OGITA K., ONO Y., ASAOKA Y., SHEARMAN M.S. , FUJII T.,
ASE K., SEKIGUCHI K., IGARASHI K., NISHIZUKA Y.
The common structure and activities of four subspecies of rat
brain protein kinase C family.
Febs Letters (1987b) **223(2)**, 212-216.
- KISHIMOTO A., TAKAI Y., MORI T., KIKKAWA U., NISHIZUKA Y.
Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase
by diacylglycerol, its possible relation to
phosphatidylinositol turnover.
J. Biol. Chem. (1979) **255(6)**, 2273-2276.
- KISHIMOTO A., NISHIAMA K., NAKANISHI H., URATSUJI Y., NOMURA H.,
TAKEYAMA Y., NISHIZUKA Y.
Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by
protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent
protein kinase.
J. Biol. Chem. (1985) **260(23)**, 12492-12499.
- KNOFF J.L., LEE M.H., SULTZMAN L.A., KRIZ R.W., LOOMIS C.R., HEWICK
R.M., BELL R.M.
Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs.
Cell (1986) **46**, 491-502.
- KOELSCH C.F., ALBERTON N.F.
Synthesis of N-Methylmorphine.
Journal of American Chemical Society (1953) **75(9)**, 2095-2097.
- KONDO H., BABA Y., TAKAKI K., KONDO K., KAGAMIYAMA H.
Phosphorylation by protein kinase C of a synthetic heptapeptide
bearing a lysine residue on the C terminal side of serine.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1987) **142(1)**, 155-161.

KONIGSBERG W.

Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiotreitol.
Methods in Enzymology (1972) **25**, 185-188.

KUBO K., OHNO S., SUZUKI K.

Primary structures of human protein kinase C β II and β I differ only in their C-terminal sequences.
Febs Letters (1987) **223**, 138-142.

LEE A.C.J., POWELL J.E., TREGEAR G.W., NIALL H.D., STEVENS V.C.

A method for preparing β -hCG COOH peptide-carrier conjugates of predictable composition.
Molecular Immunology (1980) **17**, 749-756.

LIN C.R., CHEN W.S., LAZAR C.S., CARPENTER C.D., GILL G.N., EVANS R.M., ROSENFELD M.G.

Protein kinase C phosphorylation at Thr 654 of the unoccupied EGF receptor and EGF binding regulate functional receptor loss by independent mechanisms.
Cell (1986), **44**, 839-848.

LOWRY O.H., ROSEBROUGHT N.J., FARR A.L., RANDALL R.J.

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. (1951) **193**, 265-275.

MERRIFIELD R.

Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide.
J. Am. Chem. Soc. (1963), **85**, 2149.

MONSAN P., PUZO G., MAZARGUIL H.

Etude du mécanisme d'établissement des liaisons glutaraldéhyde-protéine.
Biochimie (1975) **75**, 1281-1292.

MORIKAWA A, SONE T., ASANO T.

5-Isoquinolinesulfonamide derivatives. 1. Synthesis and vasodilatory activity of N-(2-guanidinoethyl)-5-isoquinoline sulfonamide derivatives.
J. Med. Chem. (1989) **32**, 42-46.

MOSJOV S., MITCHELL A.R., MERRIFIELD R.B.

A quantitative evaluation of methods for coupling asparagine
J. Org. Chem. (1980) **45**, 555,556.

NISHIZUKA Y., TAKAI Y., KISHIMOTO A., HASHIMOTO E., INOUE M.,
YAMAMOTO M., CRISS W.E., KURODA Y.

A role of calcium in the activation of a new protein kinase
system.

Advances in Cyclic Nucleotide Research (1978) **9**, 209-220.

NISHIZUKA Y.

Turnover of inositol phospholipids and signal transduction.
Science. (1984) **225**, 1365-1370.

NISHIZUKA Y.

Studies and perspectives of protein kinase C.
Science. (1986) **233**, 305-312.

O'BRIAN C.A., LAWRENCE D.S., KAISER E.T., WEINSTEIN I.B.

Protein kinase C phosphorylates the synthetic peptide
Arg-Arg-Lys-Ala-Ser-Gly-Pro-Pro-Val in the presence of
phospholipid plus either Ca^{2+} or a phorbol ester tumor
promoter.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1984) **124**(1), 296-302.

OHNO H, KAWASAKI S., IMAJOH S., SUZUKI K.

Tissue-specific expression of three distinct types of rabbit
protein kinase C.

Nature (1987) **325**, 161-166.

ONO Y., KUROKAWA T., KAWAHARA K., NISHIMURA O., MARUMOTO R.,
IGARASHI K., SUGINO Y., KIKKAWA U., OGITA K., NISHIZUKA Y.

Cloning of rat brain protein kinase C complementary DNA.

Febs Letters (1986) **203**(2), 111-115.

ONO Y., KIKKAWA U., OGITA K., FUJII T., KURUKAWA T., ASAOKA Y.,
SERIGUCHI K., ASE K., IGARASHI K., NISHIZUKA Y.

Expression and properties of two types of protein kinase C:
alternative splicing from a single gene.

Science (1987a) **236**, 1116-1120.

- ONO Y., FUJII T., OGITA K., KIKKAWA U., IGARASHI K., NISHIZUKA Y.
Identification of three additional members of rat protein kinase C family: δ -, ϵ -, ζ -subspecies.
Febs Letters (1987b) **226(1)**, 125-128.
- ONO Y., KIKKAWA U., FUJII T., OGITA K., KIKKAWA U., IGARASHI K., NISHIZUKA Y.
The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family.
J. Biol. Chem. (1988) **263(14)**, 6927-6932.
- PARKER P.J., COUSSENS L., TOTTY N., RHEE L., YOUNG S., CHEN, E., STABEL S., WATERFIELD M.D., ULLRICH A.
The complete primary structure of protein kinase C- the major phorbol ester receptor.
Science (1986) **233**, 853-859.
- PEARSON R.B., WOODGETT J.R., COHEN P., KEMP B.E.
Substrate specificity of a multifunctional calmodulin-dependent protein kinase.
J. Biol. Chem. (1985) **260(27)**, 14471-14476.
- PELOSIN J.M., VILGRAIN I., CHAMBAZ E.M.
A single form of protein kinase C is expressed in bovine adrenocortical tissue, as compared to four chromatographically resolved isozymes in rat brain.
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1987) **147(1)**, 382-391.
- RUEGG U.T., RUDINGER J.
Methods in enzymology (1977) **47**, 111-116.
- SAP J., MUNOZ A., DAMM K., GOLDBERG Y, GHYSDAEL J., LEUTZ A, BEUG H., VENNSTROM B.
The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone.
Nature (1986) **324**, 635-640.
- SARIN V.K., KENT S.B.H., TAM J.P., MERRIFIELD R.B.
Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction.
Analytical Biochemistry (1981) **117**, 147-157.

SCHATZMAN R.C., TURNER R.S., KUO J.F.

Phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein phosphorylation.
Calcium and Cell function. Vol V, 33-66.

TAKAI Y., KISHIMOTO A., INOUE M., NISHIZUKA Y.

Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and
its proenzyme in mammalian tissues.

J. Biol. Chem. (1977) **252**(21), 7603-7609.

TAKAI Y., KISHIMOTO A., IWASA Y., KAWAHARA Y., MORI T.,
NISHIZUKA Y.

Calcium-dependent activation of a multifunctional protein
kinase by membrane phospholipids

J. Biol. Chem. (1979) **254**, 3692-3695.

TURNER R.S., KEMP B.E., HUAI-DE SU, KUO J.F.

Substrate specificity of phospholipid/ Ca^{2+} -dependent protein
kinase as probed with synthetic peptide fragments of the bovine
myelin basic protein.

J. Biol. Chem. (1985) **260**(21), 11503-11507.

TYERS M., RACHUBINSKI R.A., STEWART M.L., VARRICHIO A.M., SHORR
R.G.L., HASLAM R.J., HARLEY C.B.

Molecular cloning and expression of the major protein kinase C
substrate of platelets.

Nature (1988) **333**, 470-473.

UTSUMI T., YOSHINAGA K., KOGA D., IDE A., NOBORI K., OKIMASU E.,
TERADA S., UTSUMI K.

Association of a myristoylated protein with a biological
membrane and its increased phosphorylation by protein kinase C.

Febs Letters (1988) **238**(1), 13-16.

VON ARX E., FAUPEL P., BRUGGER M.

Das 4,4'-tetramethyldiamino-diphenylmethan reagens (TDM). Eine
modifikation der chlor-o-tolidin farbereaktion für die
dünnschicht-chromatographie.

Journal of chromatography (1976) **120**, 224-228.

WHITEHOUSE S., WALSH D.A.

Mg.ATP²⁻-dependent interaction of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase with the catalytic subunit.

J. Biol. Chem. (1983a) **258 (6)**, 3682-3692.

WHITEHOUSE S., FERAMISCO J.R., CASNELLIE J.E., KREBS E.G., WALSH D.A.

Studies on the kinetic mechanism of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase

J. Biol. Chem. (1983b) **258 (6)**, 3693-3701.

WISE B.C., GLASS D.B., JEN CHOU C.H., RAYNOR R.L., KATOH N., SCHATZMAN R.C., TURNER R.S., KIBLER R.F., KUO J.F.

Phospholipid-sensitive Ca²⁺-dependent protein kinase from heart.

II. Substrate specificity and inhibition by various agents.

J. Biol. Chem. (1982) **257 (14)**, 8489-8495.

WOODGETT J.R., GOULD K.L., HUNTER T.

Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements.

Eur. J. Biochem. (1986) **161**, 177-184.

ZETTERQVIST O., RAGNARSSON U., HUMBLE E., BERGLUND L., ENGSTRÖM L.

The minimum substrate of cyclic AMP-stimulated protein kinase, as studied by synthetic peptides representing the phosphorylatable site of pyruvate kinase (type L) of rat liver.

Biochem. Biophys. Res. Comm. (1976) **70 (3)**, 696-703.



Annie RICOUART

CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE STRUCTURES PEPTIDIQUES APPLIQUÉES À LA
CARACTÉRISATION ET L'INHIBITION DE LA PROTÉINE KINASE C

RESUME

La protéine kinase C ou PKC (Protéine kinase dépendante du calcium et des phospholipides) a un rôle crucial dans le transfert d'informations extracellulaires au travers de la membrane ; elle constitue aussi le récepteur physiologique des esters de phorbol, puissants promoteurs tumoraux.

L'étude de la PKC basée sur la chimie peptidique en phase solide a consisté dans un premier temps à préparer des substrats spécifiques de l'enzyme. Des substrats de bonne affinité ont ensuite été modifiés par remplacement du résidu phosphorylable ou inversion du squelette peptidique (rétro-inverso peptide) pour conduire à des inhibiteurs d'activité intéressante (K_i de l'ordre de 10 μM). La fonctionnalisation d'un inhibiteur compétitif de l'ATP (second substrat de l'enzyme) puis sa fixation en N-terminus d'un substrat peptidique selon le concept de bisubstrat, ont permis un accroissement important de l'activité inhibitrice (K_i de l'ordre de 100nM). D'autre part, les études récentes de cDNA codant pour la PKC ayant révélé l'existence d'une famille d'enzymes de structures très proches, la caractérisation de ces sous espèces a été réalisée grâce à l'emploi d'anticorps, produits en réponse à des peptides immunogènes spécifiques de chaque isoenzyme.

MOTS-CLES

Protéine kinase , Phosphorylation des protéines, Concept bisubstrat, Peptide synthétique, Antigène synthétique, Inhibiteurs de protéine kinase.