



## CONCEPTION ET SYNTHÈSE DE PEPTIDES A ACTIVITÉ CYTOLYTIQUE

Jacques PUSSET, A. MENEZ, J. COTTON et G. MOURIER

*Laboratoire d'Ingénierie des Protéines, Direction des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique, CE/Saclay, 91191 Gif/Yvette, France*

### Introduction

Il existe de nombreuses substances cytolytiques d'origine naturelle telles que la Melittin, le Mastoparan, diverses phospholipases ou les vibrilysines.

Les structures des différentes toxines ont peu de points communs aussi bien au niveau des séquences en acides aminés que des structures secondaires et tertiaires.

- longueur variable pouvant aller de quinze à plusieurs centaines d'acides aminés
- degré d'homologie des séquences peptidiques faible voire insignifiant
- fragments présentant des structures variables selon les différents types d'acides aminés qui les composent (basiques, hydrophobes, hydrophiles, neutres)

Parmi ces éléments les différentes toxines présentent toutes une partie basique comme le montre la Table 1.

TOXINE	Nombre A.A.	SEQUENCE dont partie
MYOTOXIN	111	NLVQFSYVITCANHNRRSSLDYADYGCYCGAGGSGTFVDELDRC CKIHDDCYGEAEKQGYPKMLMYDYYCGSNPYC DCDVAAAECFARNAYNNANYNIDTKRCK
CROTAMINE	42	Y CFPKERICLPPSSDFGRMDCRWRWKCKCRKSG
MELITTIN	26	GIGAVLKVLTTGLPALISWIK
HEMOLYSIN	26	HAQDIISTIGDLVRWIIDTVN
CECROPIN A	37	KW VVGQNI RDGI I KAGPAVAVVGGQATQIAR
MAOANIN	23	GIGKFL AFVGEIMKS
VIBRIOLYSIN	Frag. 40-70	TN DVYQSVFTTSGTRKWLTSYM
AEROLYSIN	Frag. 410-433	FAGNIEIGAPVPLAADS

TABLE 1











D'autres fragments possédant des structures secondaires bien définies, en particulier celle en hélice  $\alpha$ , jouent également un rôle prépondérant dans l'activité de ces toxines.



Diverses représentations de ces éléments de structure permettent de les comparer entre elles et des programmes de prédiction de structure donnent des informations sur la présence potentielle de ces éléments pour une séquence donnée. Ces programmes donnent également des informations sur l'hydrophatie des peptides en fonction de leur séquence en acides aminés (voir diagrammes).

A partir de ces différents éléments on peut donc construire des séquences avec des degrés d'homologie très faibles mais présentant des profils voisins pouvant conduire à des types d'activité semblables. On peut également assembler des fragments de protéines dont la structure secondaire a déjà été démontrée. Enfin on peut essayer de mettre en évidence le rôle particulier de certains acides aminés.

Sur ces bases, nous avons donc construit plusieurs peptides (figurant sur la table 2), effectué leur synthèse et testé leur activité sur erythrocytes en comparant celle-ci à celle de la Melittin.

PEPTIDE	Nombre A.A.	SEQUENCE dont partie 
PEPCYTOL 2	20	K L E A L E G K W E A L E G P 
PEPCYTOL 3	20	K L E A L E G K W E A L E G G 
PEPCYTOL 6	19	K L E A I E G K L E A I E G 
PEPCYTOL 7	26	K L E A I E G K L E A I E G K L E A I E G 
PEPCYTOL 8	26	L I E G L A G L I V G L A E G L A I E G 
PEPCYTOL 8*	26	L I E*G L A G L I V G L A E*G L A I E*G 
PEPCYTOL 9	23	A I A V G I A G I L L A A V V G A 
PEPCYTOL 11	23	 A I A V G I A G I L L A A V V G A
PEPCYTOL 12	26	L I E G L A G L I V G L A E G L A I W I 

\* Acides aminés estérifiés par MeOH

TABLE 2

### Matériel et méthodes

Les peptides Pepcytols 6 à 12 ont été synthétisés en phase solide sur résine MBHA au moyen d'un synthétiseur automatique Applied biosystems (ABI 430) en utilisant la chimie t-Boc.

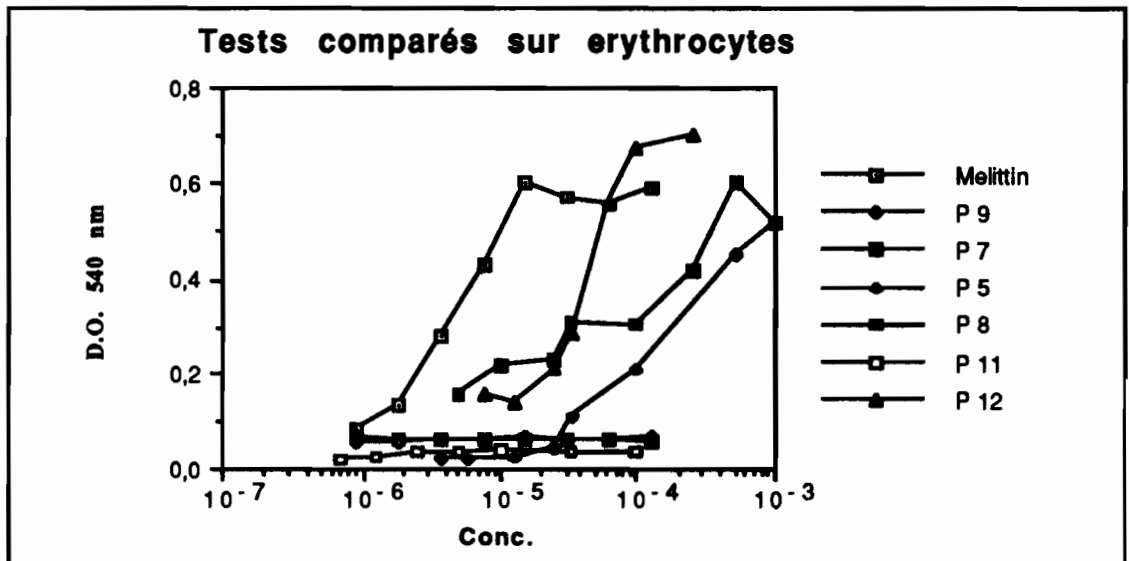
Les acides aminés sont protégés par les groupements protecteurs suivants : Trp (For), Lys (Clz), Arg (Tos), Glu (Chex), Ser (Bzl). Les couplages ont été réalisés en anhydride symétrique.

Le clivage peptide-résine a été effectué par l'acide fluorhydrique (HF), le peptide a été ensuite dessalé sur colonne Biogel P2, purifié par CLHP semi-préparative et son homogénéité contrôlée par CLHP analytique, analyse en acides aminés et spectrométrie de masse (Fab-MS).

Les tests ont été réalisés sur des érythrocytes humains ( $3 \cdot 10^7$  cellules par puits) et la mesure de D.O. à 540 nm effectuée après 30 minutes d'incubation à température ambiante.

### Résultats et discussion

La construction des peptides Pepcytols 6 à 12 selon les critères précédemment indiqués a donné les résultats suivants :



- les peptides Pepcytols 6 et 7 n'ont aucune activité significative sur les érythrocytes,
  - le peptide Pepcytol 8 a une activité modérée sur érythrocytes, environ cent fois inférieure à celle de la Melittin, mais qui augmente lorsque l'on estérifie les trois acides glutamiques inclus dans la séquence
  - les peptides Pepcytol 9 et Pepcytol 11 ont été construits par couplage de deux fragments appartenant à deux toxines différentes en inversant la position des deux fragments:
    - le premier fragment, particulièrement hydrophobe est structuré en hélice  $\alpha$
    - le second constitue la partie C-terminale basique de la Melittin
- Seul Pepcytol 9 présente une activité du même ordre de grandeur que le peptide Pepcytol 8 modifié.
- Enfin l'introduction dans la séquence de Pepcytol 8 d'un tryptophane dans la même position que dans celle de la Melittin augmente l'activité de façon significative.

### Conclusion

L'examen attentif des structures de différentes toxines possédant une activité cytolytique a montré l'existence de plusieurs éléments qui semblent impliqués dans la manifestation de l'activité.

A partir de ces observations, nous avons conçu des peptides dont les séquences n'ont pas d'homologie particulière avec celles de toxines connues mais possèdent par contre des éléments de structures qui pourraient leur permettre de jouer un rôle semblable.

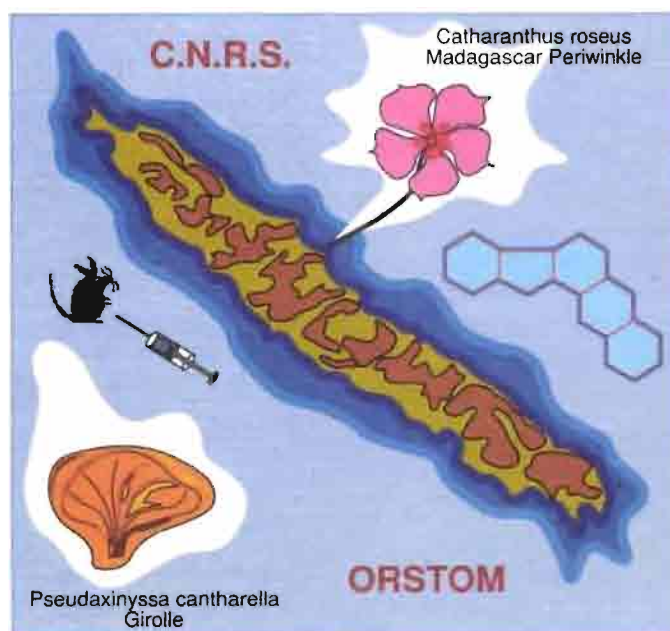
Nous avons déjà obtenu plusieurs peptides ayant une activité significative sur les érythrocytes.

En fonction des résultats acquis, il existe plusieurs possibilités de modifier ces structures ; d'une part en remplaçant sélectivement certains acides aminés qui peuvent apparaître comme plus importants que d'autres, d'autre part en améliorant certaines structures secondaires dans les peptides déjà obtenus.

# Troisième Symposium sur les substances naturelles d'intérêt biologique de la région Pacifique-Asie

Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 26-30 Août 1991

## ACTES



Editeurs : Cécile DEBITUS, Philippe AMADE,  
Dominique LAURENT, Jean-Pierre COSSON