

Rationalisation de certains aspects de l'enrichissement d'un phosphopeptide en vue de l'étude de la localisation de peptides vecteurs après internalisation

Mathéron L.(1,2) • Sachon E.(1,2) • Burlina F.(1) • Sagan S.(1) • Lequin O.(1) • Bolbach G.(1,2)

(1)Labo. des Biomolécules, Ecole Normale Supérieure (ENS), Univ. P. et M. Curie, UMR-CNRS 7203, Paris • (2)Plateforme de Spectrométrie de Masse et Protéomique, IFR83, Univ. P. et M. Curie, Paris, France

Les peptides vecteurs (CPPs) sont des peptides basiques amphiphiles capables de passer les membranes plasmiques et d'entrer dans les cellules, seuls ou en vectorisant d'autres molécules (cargos) incapables de s'internaliser par elles-mêmes. Plusieurs mécanismes d'entrée coexistent probablement, en particulier l'endocytose et la translocation directe [1]. Selon le mécanisme, le peptide vecteur sera adressé dans des compartiments cellulaires différents. En particulier, une translocation directe entraînera une internalisation dans le cytosol.

Notre étude vise à déterminer si différents CPPs s'internalisent dans le cytosol. Pour cela, ils seront couplés par un pont disulfure à un cargo qui sera modifié selon sa localisation intracellulaire. Les cargos utilisés sont basés sur une séquence substrat de la Protéine Kinase C (PKC) cytosolique (partie du domaine C-terminal de la protéine adducine) à laquelle sont ajoutés une étiquette biotine, 4 résidus G (bras espaceur hydrogéné ou deutéré pour effectuer des quantifications) et un résidu C (couplage au CPP). Le peptide initialement étudié (biot-Add) a la séquence suivante : {biot-G4}COF1R2T3P4S5F6L7K8K9-NH₂. Les conjugués CPP / cargo sont vectorisés dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary). Après lyse cellulaire, les cargos, porteurs d'une étiquette biotine, sont extraits par purification d'affinité, et analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF [2]. L'observation d'une phosphorylation révèle alors une localisation cytosolique du CPP après internalisation.

La faible efficacité d'ionisation des phosphopeptides et le faible rendement de phosphorylation rendent incontournables une étape d'enrichissement de l'échantillon en peptide phosphorylé avant l'analyse par MALDI-TOF. Nous avons travaillé sur plusieurs techniques (IMAC et MOC utilisant du dioxyde de titane). L'inefficacité de ces méthodes d'enrichissement a été observée pour le peptide cargo initial (biot-Add). Pour connaître l'origine de cette inefficacité, nous avons testé les étapes de piégeage et d'éluion du peptide par spectrométrie de masse et RMN du proton 1D et 2D. Nous avons déterminé que deux facteurs diminuaient l'affinité du peptide biot-Add pour les phases de TiO₂ et IMAC : (i) la basicité élevée de ce substrat de kinases, et

donc un nombre de charges positives important à pH acide et (ii) la position de l'étiquette (biotine-G4) en N-terminal. En conséquence, la séquence du cargo a été modifiée pour tendre vers un enrichissement optimal :

- Afin de contrebalancer les charges positives, 2 résidus E ont été ajoutés au cargo : biotEE-Add, dont la séquence est la suivante : biot-EG4ECFRTPSFLKK-NH₂ ;

- L'étiquette (biotine-G4) a été transférée en C-terminal en synthétisant le peptide Add-biot de séquence AC-CFRTPSFLKKG4-NH-(CH₂)₂-NH-biot.

Ces cargos modifiés, une fois phosphorylés, peuvent être enrichis à la fois par IMAC et par TiO₂. Il a également été vérifié qu'ils sont bien des substrats de la PKC, à la fois in vitro et sur des lysats cellulaires. Ces peptides biotEE-Add et Add-biot ont été couplés à la pénétratine, un peptide vecteur bien caractérisé (AC-CRQIKIWFQNRRMKWKK). L'étude de l'internalisation de ces conjugués nous permettra d'avancer vers l'élucidation du mécanisme d'internalisation de ce peptide vecteur, avant de pouvoir être élargie à d'autres CPPs.

[1] Lindgren M., Hallbrink M., Prochiantz A., Langel U., *TIPS* 2000, 21(3), 99-103

[2] Burlina F., Sagan S., Bolbach G., Chassaing G., *Nat. Protocols* 2006, 1(1), 200-205