

Université de Montréal

Études cinétiques de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase purifiée de reins de rat  
et recombinante humaine provenant des levures *Pichia pastoris*

par

Roselyne Castonguay

Département de chimie  
Faculté des arts et sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en chimie

Septembre 2004

© Roselyne Castonguay, 2004



PD

3

USB

2004

V.028

0

0

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Études cinétiques de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase purifiée de reins de rat  
et recombinante humaine provenant des levures *Pichia pastoris*

présentée par :

Roselyne Castonguay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Joelle Pelletier		Président-rapporteur
Pr. Jeffrey W. Keillor		Directeur de recherche
Pr. William D. Lubell		Membre du jury
Pr. Karine Auclair		Membre externe
Pr. Joelle Pelletier		Président du doyen de la FES

## Résumé

La  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT) est une enzyme hétérodimérique hautement glycosylée présente dans toutes les espèces du règne vivant. Elle est impliquée dans le transport des acides aminés grâce au cycle du  $\gamma$ -glutamyle, la détoxification cellulaire et l'homéostasie du glutathion. Elle joue également un rôle dans des désordres physiologiques tels le diabète, les maladies cardio-vasculaires et l'inhibition de l'apoptose. Son substrat donneur *in vivo*, le glutathion, est clivé entre les entités  $\gamma$ -glutamyle et cystéinyglycine dans une étape d'acylation afin de former un intermédiaire acyl-enzyme. Par la suite, elle transfère cette entité  $\gamma$ -glutamyle sur un substrat accepteur, typiquement un acide aminé ou un dipeptide, dans une étape de désacylation menant à la formation d'un composé avec un lien isopeptidique, ou sur une molécule d'eau dans une réaction d'hydrolyse menant à l'acide glutamique. Le mécanisme proposé est donc de type ping-pong modifié. Cependant, très peu d'informations sont connues quant au mécanisme exact de cette enzyme, malgré l'importance de la GGT au niveau physiologique.

Pour débiter, des études quant à l'existence réelle de l'intermédiaire acyl-enzyme doivent être faites. En effet, le mécanisme ping-pong proposé est fondé sur des évidences indirectes obtenues avec de l'enzyme partiellement inhibée. La preuve de l'existence de cet intermédiaire démontrerait hors de tout doute la pertinence du mécanisme. Des expériences en état pré-stationnaire ont été réalisées avec le D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide comme substrat donneur et de l'eau comme substrat accepteur. Un graphique biphasique pour la libération de la *p*-nitroaniline en fonction du temps a été obtenu, démontrant l'accumulation de l'intermédiaire acyl-enzyme. Le même type de graphique a été observé en présence de L-méthionine comme substrat accepteur, confirmant la présence de cet intermédiaire dans la réaction de désacylation. Ces expériences effectuées avec de l'enzyme non modifiée et de manière directe ont donc permis de démontrer que la GGT fonctionne bien selon un mécanisme de type ping-pong.

Ensuite, l'étude de l'étape de désacylation par aminolyse, très peu étudiée dans la littérature, a été effectuée. Des substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine possédant divers  $pK_a$  au niveau du groupement  $\alpha$ -ammonium ont été synthétisés et caractérisés. Ils ont été utilisés dans des études cinétiques avec le D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide comme substrat donneur. Un graphique de type Brønsted a été obtenu et a indiqué qu'une charge partiellement positive est développée à l'état de transition de l'étape limitante. De plus, des études de pH et d'effet isotopique de solvant ont montré qu'un proton était en vol à l'état de transition. Celui-ci a été attribué à une base générale nécessaire à la déprotonation du substrat accepteur. L'étape limitante dans la désacylation par aminolyse a été proposée comme étant l'attaque nucléophile du substrat accepteur sur l'intermédiaire acyl-enzyme concertée avec la déprotonation du substrat. Ce mécanisme permet également de comprendre la faible réactivité d'autres classes de composés comme substrat accepteur et de proposer que la transpeptidation catalysée par la GGT est plus importante que l'hydrolyse au niveau physiologique.

Enfin, peu de systèmes efficaces d'expression de GGT recombinante permettant de faire de la mutagenèse dirigée et d'obtenir de l'enzyme en grande quantité existent. Un système d'expression de GGT humaine recombinante exempt de l'ancre transmembranaire et liée à une séquence de six histidines (« His-tag ») a été mis au point. Ceci a nécessité la fabrication d'un plasmide contenant le gène de la GGT humaine modifiée, un facteur de sécrétion et le « His-tag ». Ce plasmide a ensuite été transformé dans des levures *P. pastoris*. La GGT sécrétée dans le milieu de culture a été exprimée efficacement et purifiée par précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie d'affinité grâce au « His-tag ». Les caractéristiques de cette GGT sont très similaires à celles de l'enzyme purifiée à partir d'organes. Ce système d'expression s'avère meilleur que ceux existant déjà et sera utile pour étudier en détail le mécanisme de la GGT et son importance au niveau physiologique.

Mots-clés : enzyme,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, études en état pré-stationnaire, cinétique, désacylation, aminolyse, levure, expression, purification.

## Summary

$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT) is a highly glycosylated heterodimeric enzyme found in every species in the living world. It is implicated in amino acid transport through the  $\gamma$ -glutamyl cycle, in cellular detoxification and in glutathione homeostasis. It plays a role in physiological disorders such as diabetes, cardiovascular disease and apoptosis inhibition. Its *in vivo* substrate, glutathione, is cleaved between the  $\gamma$ -glutamyl and the cysteinylglycine moieties through an acylation step to form an acyl-enzyme intermediate. Then, this  $\gamma$ -glutamyl moiety is transferred to an acceptor substrate, such as an amino acid or a dipeptide, through a deacylation step to form a compound containing an isopeptide bond, or to a water molecule through an hydrolysis reaction to give glutamic acid. A modified ping-pong mechanism is thus proposed for the enzyme. However, very little information is known about the exact mechanism of this enzyme, despite its broad physiological importance.

First, studies about the existence of the acyl-enzyme intermediate must be done. In fact, the modified ping-pong mechanism proposed for the enzyme is based on indirect evidence obtained by using a partially inhibited enzyme. Thus, a direct proof of the existence of this intermediate would show the pertinence of this mechanism. Some pre-steady state experiments were done with D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide as the donor substrate and water as the acceptor substrate. A biphasic curve for the *p*-nitroaniline release as a function of time was obtained, indicative of the acyl-enzyme accumulation. The same type of curve was observed in the presence of L-methionine as acceptor substrate, confirming the acyl-enzyme intermediate in the deacylation process. These experiments, performed with the native enzyme using a continuous assay, confirmed the ping-pong mechanism for GGT.

Studies on the deacylation of the acyl-enzyme intermediate by aminolysis, not extensively studied in the literature, were performed. Some acceptor substrates

derived from L-methionine with different  $\alpha$ -ammonium  $pK_a$ s were synthesized and characterized. They were used in kinetic studies where the donor substrate is D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide. A Brønsted plot was obtained and showed that a partially positive charge is formed at the transition state of the rate-limiting step. A pH-rate profile and some solvent kinetic isotope effect experiments were also done, showing a proton in flight at the transition state. This proton was ascribed to a general base necessary to deprotonate the acceptor substrate. The rate-limiting step in this aminolysis reaction was proposed to be the advanced nucleophilic attack by the acceptor substrate on the acyl-enzyme intermediate at the transition state concerted with the deprotonation of this substrate. This proposed mechanism also explains the low reactivity of some classes of compounds as acceptor substrates. It shows that GGT-catalysed transpeptidation is more relevant physiologically than hydrolysis.

Few efficient expression systems for recombinant GGT are available that allow site-directed mutagenesis and access to a large quantity of enzyme. An expression system of recombinant GGT without any transmembrane anchor and linked to a sequence of six histidines (« His-tag ») was obtained. The first step was the formation of a plasmid containing the modified human GGT gene, a secretion factor and the « His-tag » sequence. The *Pichia pastoris* yeast was then transformed with this plasmid. GGT secreted extracellularly was expressed successfully and purified by ammonium sulfate precipitation and affinity chromatography with the « His-tag ». The characteristics of this recombinant GGT are similar to those of the enzyme purified from tissue. This new system is better than the existing ones and will be very useful to study in more detail the GGT mechanism and its physiological importance.

Keywords : enzyme,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase, pre-steady state studies, kinetics, deacylation, aminolysis, yeast, expression, purification.

## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>iii</b>
<b>Summary .....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des schémas.....</b>	<b>xvii</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>xixx</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>xxii</b>
<b>Dédicace.....</b>	<b>xxvi</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>CHAPITRE 1 : Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La <math>\gamma</math>-glutamyltranspeptidase.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Localisation .....	3
1.1.2 Rôles physiologiques.....	6
1.1.3 Réactions catalysées.....	10
1.1.4 Substrats de la GGT .....	13
1.1.5 Site de liaison de la GGT .....	15
1.1.6 Site catalytique de la GGT .....	18
1.1.6.1 Nucléophile .....	18
1.1.6.2 Acide/base général .....	20
1.1.6.3 Importance de l'activité glutaminase de la GGT.....	21
<b>1.2 Objectifs de recherche.....</b>	<b>22</b>
1.2.1 Détecter l'intermédiaire acyl-enzyme de la GGT .....	22
1.2.2 Élucider le mécanisme de la désacylation de l'intermédiaire acyl-enzyme.....	22
1.2.3 Purifier et caractériser la GGT recombinante humaine exprimée dans des levures.....	23
<b>CHAPITRE 2 : Détection de l'intermédiaire acyl-enzyme de la GGT .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Introduction .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Résultats .....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Études à l'état pré-stationnaire avec le « rapid-mix quencher » .....	32
2.2.2 Études à l'état pré-stationnaire avec le « stopped-flow ».....	36
<b>2.3 Discussion.....</b>	<b>43</b>

**CHAPITRE 3 : Éluclation du mécanisme de l'étape de désacylation..... 47**

<b>3.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>52</b>
3.2.1	Évaluation de différents types de substrats accepteurs .....	52
3.2.1.1	Amines comme substrat accepteur .....	52
3.2.1.2	Alcools comme substrat accepteur .....	54
3.2.1.3	Thiols comme substrat accepteur .....	59
3.2.2	Synthèse des substrats accepteurs .....	60
3.2.3	Titrage des substrats accepteurs .....	63
3.2.4	Études cinétiques de l'étape de désacylation .....	64
3.2.5	Courbe de Brønsted .....	71
3.2.6	Études de l'effet du pH.....	75
3.2.7	Effets isotopiques de solvant.....	78
<b>3.3</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>81</b>

**CHAPITRE 4 : Expression et purification de la GGT humaine dans la levure *Pichia pastoris*..... 94**

<b>4.1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>95</b>
4.1.1	Purification de GGT endogène.....	95
4.1.2	Purification de GGT recombinante .....	100
<b>4.2</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>107</b>
4.2.1	Clonage du gène de la GGT humaine dans un plasmide et transformation des bactéries <i>E. coli</i> .....	107
4.2.2	Linéarisation du plasmide purifié et transformation des levures <i>P. pastoris</i> .....	115
4.2.3	Purification de l'ADN génomique et vérification de l'intégration du gène .....	120
4.2.4	Vérification de l'expression de la GGT dans <i>P. pastoris</i> .....	125
4.2.5	Optimisation des conditions d'expression de la GGT.....	132
4.2.5.1	Effet du pH .....	133
4.2.5.2	Effet du pourcentage de méthanol.....	135
4.2.5.3	Effet de la densité optique de départ dans le milieu de culture BMMY .....	137
4.2.5.4	Présence de « casamino acids ».....	140
4.2.5.5	Autres effets .....	143
4.2.5.6	Gel d'électrophorèse d'échantillons obtenus avec les meilleures conditions.....	145
4.2.6	Purification de la GGT humaine recombinante.....	148

4.2.6.1	Précipitation à l'acétone .....	152
4.2.6.2	Précipitation au sulfate d'ammonium.....	160
4.2.7	Caractérisation de la GGT humaine recombinante .....	164
4.2.7.1	Présence de sucres .....	164
4.2.7.2	Stabilité thermique .....	165
4.2.7.3	Constantes cinétiques pour les substrats donneur et accepteur ...	167
<b>4.3</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>169</b>
4.3.1	Construction du plasmide.....	170
4.3.2	Transformation des levures <i>P. pastoris</i> et intégration dans le génome .....	173
4.3.3	Expression de la GGT humaine recombinante.....	176
4.3.4	Purification de la GGT humaine recombinante.....	179
4.3.5	Caractérisation de la GGT.....	181
<b>CHAPITRE 5</b>	<b>: Conclusion .....</b>	<b>185</b>
<b>CHAPITRE 6</b>	<b>: Partie expérimentale.....</b>	<b>190</b>
<b>6.1</b>	<b>Détection de l'intermédiaire acyl-enzyme de la GGT.....</b>	<b>191</b>
6.1.1	Matériel .....	191
6.1.2	Méthode expérimentale .....	191
6.1.2.1	Utilisation du mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher »).....	191
6.1.2.2	Utilisation du mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow ») .....	193
<b>6.2</b>	<b>Élucidation du mécanisme de l'étape de désacylation .....</b>	<b>193</b>
6.2.1	Matériel .....	193
6.2.2	Méthode expérimentale .....	195
6.2.2.1	Tests des autres substrats accepteurs possibles .....	195
6.2.2.2	Synthèse des dérivés de la L-méthionine.....	198
6.2.2.3	Titration des substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine .....	207
6.2.2.4	Études cinétiques en état stationnaire avec les substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine .....	207
6.2.2.5	Études de l'effet du pH.....	208
6.2.2.6	Effets isotopiques de solvant.....	209
<b>6.3</b>	<b>Expression et purification de la GGT humaine dans la levure <i>P. pastoris</i> .....</b>	<b>210</b>
6.3.1	Matériel .....	210
6.3.2	Méthode.....	211
6.3.2.1	Clonage du gène de la GGT humaine dans un plasmide et transformation des bactéries <i>E. coli</i> .....	211

6.3.2.2	Linéarisation du plasmide purifié et transformation des levures <i>P. pastoris</i> .....	216
6.3.2.3	Purification de l'ADN génomique et vérification de l'intégration du gène .....	217
6.3.2.4	Vérification de l'expression de la GGT dans <i>P. pastoris</i> .....	218
6.3.2.5	Optimisation des conditions d'expression de la GGT .....	220
6.3.2.6	Purification de la GGT humaine recombinante .....	222
6.3.2.7	Caractérisation de la GGT humaine recombinante .....	225
<b>Références</b> .....		<b>227</b>

## Liste des figures

- Figure 1.** Substrats donneurs de la GGT : les dérivés du glutathion et le L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (L-GPNA). ..... 14
- Figure 2.** Structure de divers inhibiteurs pour la GGT. Composé **A**, le 6-diazo-5-oxonorleucine (DON); composé **B**, l'azasérine; composé **C**, l'acivicine; composé **D**, complexe L-sérine-borate. .... 18
- Figure 3.** Représentation avec des courbes de type Lineweaver-Burk des mécanismes ping-pong (a) et séquentiel ordonné (b)<sup>86</sup> ..... 26
- Figure 4.** Substrats donneurs de type  $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para*. ..... 28
- Figure 5.** Courbe de Hammett pour la réaction de transpeptidation effectuée avec les substrats donneurs L- $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para* et le substrat accepteur Gly-Gly (●)<sup>83</sup> et pour la réaction d'hydrolyse avec les substrats donneurs de configuration D et uniquement de l'eau comme substrat accepteur (■)<sup>93</sup>.  $\sigma^-$  représente le paramètre de Hammett. .... 29
- Figure 6.** Graphique typique obtenu en état pré-stationnaire lors de la libération rapide d'un produit, suivi par sa libération lente à la suite de l'accumulation d'un intermédiaire covalent de l'enzyme. .... 31
- Figure 7.** Représentation d'un mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher »). Les explications du fonctionnement de l'appareil se retrouvent dans le texte. .... 33
- Figure 8.** Graphique de la concentration de *p*-nitroaniline libérée par la GGT (6,2  $\mu$ M) à 37 °C en fonction du temps dans une réaction d'hydrolyse du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (1 mM) suivie avec un mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher »). Chaque point représente la moyenne de deux expériences. .... 35
- Figure 9.** Représentation d'un mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow »)<sup>49,97</sup>. Les explications pour le fonctionnement de l'appareil se retrouvent dans le texte. . 37
- Figure 10.** Graphique typique de l'absorbance à 410 nm de la *p*-nitroaniline libérée par la GGT (8,0  $\mu$ M) à 37 °C en fonction du temps par une réaction d'hydrolyse du substrat D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (604  $\mu$ M) suivie de manière continue par un mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow »). .... 39
- Figure 11.** Graphique typique de l'absorbance de la *p*-nitroaniline à 410 nm libérée par la GGT (8,0  $\mu$ M) à 37 °C en fonction du temps par une réaction de

- transpeptidation du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (604  $\mu$ M) et du substrat accepteur L-méthionine (0,3 mM) suivie de manière continue par un mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow »). ..... 42
- Figure 12.** Graphique de type Lineweaver-Burk de la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et le substrat accepteur glycyglycine (20 mM) en présence de différentes concentrations fixes de l'acide L-lactique (**13**) à pH 8,0 et à 37 °C..... 57
- Figure 13.** Graphique de type Lineweaver-Burk de la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (1 mM) et le substrat accepteur glycyglycine en présence de différentes concentrations fixes de l'acide L-lactique (**13**) à pH 8,0 et à 37 °C..... 58
- Figure 14.** Graphique Lineweaver-Burk de la vitesse de transpeptidation du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide en absence et en présence de différentes concentrations du substrat accepteur L-méthionyl(2-fluoroéthylamide) (**19c**) à pH 8,0 et à 37 °C.  $\text{int}_0$  correspond à l'ordonnée à l'origine pour la réaction d'hydrolyse et  $\text{int}_x$ , pour la réaction de transpeptidation à une concentration du substrat accepteur. .... 66
- Figure 15.** Courbe secondaire de l'inverse de la différence de l'ordonnée à l'origine entre la réaction d'hydrolyse et la réaction de transpeptidation en fonction de l'inverse de la concentration du substrat accepteur L-méthionyl(2-fluoroéthylamide) (**19c**), selon les valeurs obtenues à la Figure 14. L'inverse de la constante de partage est identifié..... 67
- Figure 16.** Courbe de Brønsted de  $\log(k_{cat,b}^{norm} / K_b)$  en fonction du  $pK_a$  pour la réaction d'aminolyse de la GGT en présence du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et de différents substrats accepteurs. Chacun des substrats accepteurs utilisés est représenté par la valeur de  $pK_a$  retrouvée au Tableau VIII. .... 72
- Figure 17.** Courbe de Brønsted du  $\log(k_{cat,b}^{norm})$  en fonction du  $pK_a$  pour la réaction d'aminolyse de la GGT en présence du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et de différents substrats accepteurs. Chacun des substrats accepteurs utilisés est représenté par une valeur de  $pK_a$  retrouvée au Tableau VIII. .... 74
- Figure 18.** Courbe pH-vitesse pour la réaction de transpeptidation catalysée par la GGT entre le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et le substrat accepteur L-méthionylpropylamide (**19d**) à 37 °C..... 76
- Figure 19.** Dégradation de l'intermédiaire tétraédrique formé au cours de la réaction de désacylation. a) Intermédiaire tétraédrique formé d'un lien C-O et d'un lien

C-N, b) Intermédiaire tétraédrique formé d'un lien C-O et d'un lien C-S. R représente la modification effectuée sur la L-méthionine dans cette étude et R' représente une chaîne alkyle..... 91

**Figure 20.** Caractéristiques du plasmide pPICZ $\alpha$ A commercial<sup>151</sup> ..... 108

**Figure 21.** Séquence d'ADN de la GGT humaine et séquence des amorces utilisées au cours de la réaction de PCR. Les bases azotées soulignées correspondent aux sites de restriction *EcoRI* (Amorce 1) et *NotI* (Amorce 2)..... 111

**Figure 22.** Gel d'agarose (1 %) de l'ADN obtenu à la suite de l'amplification par réaction de PCR à différentes températures du gène de la GGT sans ancre transmembranaire. Les détails expérimentaux sont donnés au chapitre 6. .... 113

**Figure 23.** Gel d'agarose (1 %) de l'ADN de 12 colonies digérées avec l'enzyme de restriction *BamHI*. Les premier et septième puits contiennent un marqueur de fragments d'ADN contenant différents nombres de nucléotides (en paires de base (pb)) et certaines bandes sont identifiées par des flèches à gauche. Les bandes attendues de 4289 et 887 pb sont indiquées par des flèches à droite. .. 114

**Figure 24.** Gel d'agarose 1 % de l'ADN obtenu à la suite de l'amplification par réaction de PCR d'un fragment correspondant au gène de la GGT tronquée. a) Le puits 1 contient un marqueur de nombre de paires de bases, les puits 2 à 5 correspondent à la réaction effectuée sur le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  à différentes températures (puits 2, 50 °C; 3, 52,8 °C; 4, 56 °C et 5, 60 °C) et les puits 6 à 9 correspondent à l'amplification effectuée sur l'ADN génomique isolé d'une colonie de levures *P. pastoris* X-33 transformée avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  aux mêmes températures que dans les puits 2 à 5. b) Même type de gel, mais la réaction a été effectuée sur l'ADN génomique isolé de levures *P. pastoris* X-33 transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A. La description des puits correspond à celle des puits 1 à 5 de la figure a)..... 124

**Figure 25.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 6,0 et une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour deux clones (clone 1, ●, clone 2, ▲) ayant été transformés avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et pour un clone avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A (■). b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction. .... 128

**Figure 26.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le culot, obtenu après centrifugation, d'aliqots prélevés en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour un clone ayant été transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  (●) ou avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A (▲). b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction. .... 131

**Figure 27.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 et une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour deux clones (clone 1, ●, clone 2, ▲) ayant été transformés avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction. .... 133

**Figure 28.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture BMMY avec une densité optique de départ de 1,0 à différents pH en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone ayant été transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction dans les mêmes conditions. .... 134

**Figure 29.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 et une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de différents pourcentages de méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes caractéristiques. .... 136

**Figure 30.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et resuspendu à différentes densités optiques dans le milieu de culture BMMY. b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions. .... 137

**Figure 31.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 avec une densité optique de départ de 15,0 en fonction du temps d'induction en présence de différents pourcentages de méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions. .... 139

**Figure 32.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 avec une densité optique de départ de 15,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et en présence ou non de « casamino acids ». b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions. .... 141

**Figure 33.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 avec une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  en présence ou non de

« casamino acids ». b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions. .... 142

**Figure 34.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 avec une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  sous forme de cellules « fraîches » d'une semaine ou d'un mois. b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions..... 144

**Figure 35.** Gel d'électrophorèse d'acrylamide (12 % gel de séparation, 4 % gel de concentration) SDS-PAGE de surnageants concentrés provenant d'aliqots prélevés lors de l'induction de levures *P. pastoris* à une densité optique initiale de 15,0 à pH 7,0 avec 1 % de méthanol et 1 % de « casamino acids », puis centrifugés. .... 146

**Figure 36.** Immunobuvardage de surnageants concentrés provenant d'aliqots prélevés lors de l'induction de levures *P. pastoris* à une densité optique initiale de 15,0 à pH 7,0 avec 1 % de méthanol et 1 % de « casamino acids », puis centrifugés. .... 147

**Figure 37.** Liaison d'une protéine contenant un « His-tag » sur une matrice contenant un atome de nickel complexé à différents ligands (Ni-NTA)<sup>164</sup> ..... 150

**Figure 38.** Précipitation des protéines en présence d'un solvant organique<sup>159</sup> ..... 153

**Figure 39.** Gel d'électrophorèse de protéines d'échantillons de la purification de la GGT humaine recombinante par précipitation à l'acétone et chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA. .... 158

**Figure 40.** Immunobuvardage du gel d'électrophorèse d'échantillons de la purification de la GGT humaine recombinante par précipitation à l'acétone et chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA. .... 159

**Figure 41.** Immunobuvardage d'échantillons de GGT humaine recombinante ayant subi, ou non, une déglycosylation. .... 165

**Figure 42.** Graphique du pourcentage d'activité spécifique résiduelle en fonction de la température de pré-incubation pour la GGT de rein de rat (●) et pour la GGT humaine recombinante du système des levures (▲). .... 166

**Figure 43.** Graphique Michaelis-Menten pour la détermination des constantes cinétiques  $K_M$  et  $k_{cat}^{norm}$  pour le substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence d'une concentration saturante de 20 mM du substrat accepteur glycyglycine dans du tampon 0,1 M Tris-HCl à pH 8,0 et à 37 °C. .... 167

**Figure 44.** Structure de sucres liés à l'azote de certaines asparagines dans les glycoprotéines. .... 182

## Liste des schémas

- Schéma 1.** Représentation du cycle du  $\gamma$ -glutamyle dans une cellule. Les enzymes sont la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (**a**), la  $\gamma$ -glutamyl cyclotransférase (**b**), la 5-oxoprolinase (**c**), la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase (**d**), la glutathion synthétase (**e**) et une protéase intracellulaire (**f**). R représente une chaîne latérale d'un acide aminé..... 6
- Schéma 2.** Série de réactions provenant de l'hydrolyse du glutathion par la GGT et menant à la formation de peroxydes dans les cellules<sup>35</sup> ..... 9
- Schéma 3.** Différentes réactions catalysées par la GGT..... 10
- Schéma 4.** Mécanisme ping-pong modifié proposé pour la GGT. .... 12
- Schéma 5.** Types de mécanisme enzymatique possibles lorsque deux substrats se lient à une enzyme qui va générer deux produits, selon la nomenclature de Cleland. a) Mécanisme de type ping-pong, b) Mécanisme de type séquentiel ordonné..... 25
- Schéma 6.** Mécanisme ping-pong proposé pour les étapes d'acylation et d'hydrolyse catalysées par la GGT..... 30
- Schéma 7.** Méthode de dérivation par diazotation de la *p*-nitroaniline libérée par la GGT. R représente l'entité  $\gamma$ -glutamyle. .... 34
- Schéma 8.** Mécanisme proposé pour l'étape d'acylation de la réaction de transpeptidation catalysée par la GGT entre des substrats donneurs de type L- $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para* et le substrat accepteur glycyglycine.. .... 49
- Schéma 9.** Méthodologie utilisée pour l'étude des étapes de désacylation (aminolyse) et d'hydrolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme..... 51
- Schéma 10.** Synthèse des dérivés de la L-méthionine couplée avec diverses amines.  
a) Le dérivé **18e** a plutôt été synthétisé par 1) *p*-nitrophényl chloroformate, DMAP, triéthylamine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, puis 2) éthylamine, THF, 0 °C (69 %). .... 61
- Schéma 11.** Synthèse de la 3,3,3-trifluoropropylamine<sup>112</sup>..... 62
- Schéma 12.** Mécanisme proposé pour l'étape limitante dans la réaction de désacylation par aminolyse de la GGT..... 87
- Schéma 13.** Diagramme d'énergie représentant les étapes d'acylation<sup>83</sup> et de désacylation de la réaction de transpeptidation de la GGT. .... 89

- Schéma 14.** Protocole de purification de la GGT de rein de rat par clivage à la papaïne ou par détergent<sup>21,83</sup>. Les acides aminés de l'ancre transmembranaire sont représentés par un code à une lettre<sup>3</sup>..... 96
- Schéma 15.** Étapes à suivre pour effectuer le sous-clonage de la GGT tronquée dans le plasmide pPICZ $\alpha$ A et la transformation dans les bactéries *E. coli*..... 110
- Schéma 16.** Étapes à suivre pour effectuer la transformation des levures *P. pastoris* et l'intégration de l'ADN plasmidique dans leur génome<sup>150</sup>..... 115
- Schéma 17.** Processus de recombinaison au niveau du promoteur *AOX1* entre le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et le génome de *P. pastoris*<sup>148,151</sup>..... 116
- Schéma 18.** Processus de recombinaison au niveau des régions 5' promoteur *AOX1* et 3'*AOX1* menant au remplacement du gène *AOX1* dans le génome de la levure *P. pastoris*<sup>151</sup> par l'ADN plasmidique..... 117
- Schéma 19.** Étapes à suivre pour vérifier l'intégration du gène de la GGT tronquée dans l'ADN génomique de la levure *P. pastoris*..... 121
- Schéma 20.** Étapes à suivre pour l'expression de la GGT humaine tronquée à partir de levures *P. pastoris* X-33 transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ .  
..... 126
- Schéma 21.** Étapes à suivre pour effectuer un immunobuvardage à partir d'un gel d'électrophorèse de protéines (ou électrophorégramme)<sup>3</sup>..... 146
- Schéma 22.** Étapes à suivre pour purifier la GGT humaine tronquée recombinante formée à partir d'un système d'expression utilisant les levures *P. pastoris* transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ ..... 149
- Schéma 23.** Dénaturation possible de la protéine en présence d'un solvant organique à plus haute température<sup>159</sup>..... 154

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Classification des enzymes selon le type de réaction catalysée <sup>3</sup> . .....	3
<b>Tableau II.</b> Pourcentage d'identité entre les séquences primaires de la GGT de différentes espèces <sup>6</sup> . .....	4
<b>Tableau III.</b> Localisation, orientation et présence de l'ancre transmembranaire de la GGT dans diverses espèces. ....	5
<b>Tableau IV.</b> Constantes cinétiques $k_{cat}^{norm}$ obtenues pour les phases rapide et lente des réactions d'hydrolyse et de transpeptidation de la GGT en présence du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide et divers substrats accepteurs à pH 8,0 et à 37 °C. ....	43
<b>Tableau V.</b> Vitesse de catalyse du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (1 mM) en présence de 25 mM de différentes amines comme substrat accepteur à pH 8,0 et à 37 °C après correction pour la vitesse d'hydrolyse enzymatique. ....	53
<b>Tableau VI.</b> Effet obtenu par l'utilisation d'alcools simples et d'alcools ayant une structure similaire à un acide aminé sur la vitesse d'hydrolyse par la GGT du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (1 mM) à 37 °C et à pH 8,0. ....	55
<b>Tableau VII.</b> Vitesse de catalyse effectuée par la GGT du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide (1 mM) en présence de 25 mM de différents thiols à pH 8,0 et à 37 °C après correction pour la vitesse d'hydrolyse enzymatique. ....	59
<b>Tableau VIII.</b> Valeur du pK <sub>a</sub> du groupement $\alpha$ -ammonium de la série de substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine. ....	63
<b>Tableau IX.</b> Valeurs de $\log(k_{cat,b}^{norm} / K_b)$ obtenues pour la réaction de transpeptidation de la GGT en présence de D- $\gamma$ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide comme substrat donneur et de différents dérivés de la L-méthionine comme substrat accepteur à pH 8,0 et à 37 °C. ....	69
<b>Tableau X.</b> Valeurs de $\log(k_{cat,b}^{norm})$ et de K <sub>b</sub> déterminées pour la réaction de transpeptidation de la GGT entre le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide et différents substrats accepteurs à pH 8,0 et à 37 °C. ....	70
<b>-Tableau XI.</b> Effets isotopiques de solvant $((k_{cat,b}^{norm} / K_b)^{H_2O/D_2O})$ pour la réaction d'aminolyse effectuée par la GGT en présence de D- $\gamma$ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide comme substrat donneur et différents substrats accepteurs à pH (ou pD) 8,0 et à 37 °C. ....	79

- Tableau XII.** Effets isotopiques de solvant ( $(k_{cat,b}^{norm})^{H_2O/D_2O}$ ) et valeurs des constantes d'affinité  $K_b$  dans l'oxyde de deutérium et dans l'eau pour la réaction d'aminolyse de la GGT en présence du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et de différents substrats accepteurs à pH (ou pD) 8,0 et à 37 °C... 80
- Tableau XIII.** Comparaison de la valeur de  $\beta_{nuc}$  de diverses enzymes selon le type de nucléophile et de substrats utilisés durant l'étude. .... 84
- Tableau XIV.** Résumé de l'expression de GGT recombinante effectuée dans différents systèmes dans la littérature. .... 100
- Tableau XV.** Liste des différentes étapes à franchir afin de mettre au point un nouveau système d'expression de GGT humaine recombinante dans la levure *P. pastoris*..... 106
- Tableau XVI.** Valeurs de la quantité de protéines, d'activité spécifique et de rendement obtenues pour chacun des échantillons récupérés au cours de la purification de la GGT tronquée recombinante effectuée avec une précipitation à l'acétone et une chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA..... 156
- Tableau XVII.** Valeurs de la quantité de protéines, d'activité spécifique et de rendement obtenues pour chacun des échantillons récupérés au cours de la purification de la GGT tronquée recombinante effectuée avec une précipitation au sulfate d'ammonium et une chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA. .... 162
- Tableau XVIII.** Constantes cinétiques  $K_M$  et  $k_{cat}^{norm}$  des substrats L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et glycylglycine pour la GGT humaine recombinante tronquée provenant du système des levures et pour d'autres types de GGT..... 168

## Liste des abréviations

Ac	Groupement acétyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Ar	Groupement aryle
Arg	Arginine
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine triphosphate
BMGY	« Buffered Glycerol-complex Medium »
BMMY	« Buffered Methanol-complex Medium »
Boc	Groupement protecteur <i>tert</i> -butoxycarbonyle
c	Concentration
ccm	Chromatographie sur couche mince
CHES	Acide 3-[cyclohexylamino]-2-hydroxy-1-propanesulfonique
CHO	Cellules ovariennes de hamster chinois
cm	Centimètre
COS	Cellules de singe modifiées par un virus
Cys	Cystéine
d	Doublet
D	Isomère de configuration absolue D
Da	Dalton
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMAP	Diméthylaminopyridine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Désoxyribonucléotides
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucine
E	Enzyme
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzyme Commission (numéro de classification des enzymes)
éq	Équivalent

Et	Groupement éthyle
g	Gramme
Gal	Galactose
GEA	Groupe électro-attracteur
GED	Groupe électro-donneur
GGT	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
GlcNAc	Sucre <i>N</i> -acétylglucosamine
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
Gly-Gly	Glycylglycine
GPNA	$\gamma$ -Glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide
GSH	Glutathion
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
hGGT	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase humaine
hGGT $\Delta$	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase humaine tronquée
His	Histidine
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
Hz	Hertz
<i>i</i> -Pr	Groupement isopropyle
<i>J</i>	Constante de couplage
$k_{cat}^{norm}$	Constante de vitesse de la réaction catalysée normalisée
kDa	Kilodalton
$K_i$	Constante d'inhibition réversible
$K_M$	Constante de Michaelis
L	Isomère de configuration absolue L
LB	Luria Bertani
Lys	Lysine
m	Multiplet
M	Molaire
MAB	Metastable atom bombardment (en spectrométrie de masse)
Man	Mannose

MES	Acide 2-morpholinoéthanesulfonique
Met	Méthionine
mg	Milligramme
MHz	Mégahertz
min	Minute
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
mmol	Millimole
MOPS	Acide 3-[ <i>N</i> -morpholino]propanesulfonique
ms	Milliseconde
mU	Milliunité d'enzyme
Mut <sup>+</sup>	Souche de levure poussant rapidement sur un milieu contenant du méthanol
Mut <sup>S</sup>	Souche de levure poussant lentement sur un milieu contenant du méthanol
nm	Nanomètre
Ni-NTA	Chromatographie d'affinité Nickel-acide nitrilotriacétique
Ntn	« <i>N</i> -terminal nucleophile »
<i>N. meningitidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>p</i>	Substituant en position <i>para</i> sur un cycle aromatique
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Paires de bases (ou de nucléotides)
PBS	« Phosphate-buffered saline »
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
p.f.	Point de fusion
pH	Logarithme négatif de la concentration de proton
pht	Groupe protecteur phthalyle
P <sub>i</sub>	Phosphate inorganique
pK <sub>a</sub>	Logarithme de la constante d'acidité d'un acide
PMSF	Fluorure de phénylméthane sulfonyle
ppm	Partie par million

q	Quadruplet
<i>r</i>	En statistique, corrélation entre les points d'une courbe
R, R', R''	Chaîne alkyle
R <sub>f</sub>	Mobilité relative
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
SA	Acide sialique
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Gel d'électrophorèse de polyacrylamide avec sodium dodécyl sulfate
Ser	Sérine
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SMHR	Spectre de masse à haute résolution
sxt	Sextet
t	Triplet
td	Triplet dédoublé
TBTU	Tétrafluoroborate de benzotriazol-1-yl-oxy-1,1,3,3-tétraméthyluronium
TCA	Acide trichloroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
Thr	Thréonine
TOF	Time-of-flight (en spectrométrie de masse)
Tris	Tampon tris(hydroxyméthyl)méthane
U	Unité d'enzyme
UV-Vis	Spectrophotométrie dans les longueurs d'onde ultra-violet et visible
V	Volt
V <sub>MAX</sub>	Vitesse maximale de catalyse de l'enzyme
YNB	Source d'azote « Yeast Nitrogen Base »

YPD	Milieu de culture « Yeast Peptone Dextrose »
$\beta_{gp}$	Pente de la courbe de Hammett pour un groupe partant
$\beta_{nuc}$	Pente de la courbe de Hammett pour une attaque nucléophile
$\lambda$	Longueur d'onde
$\sigma$	Paramètre sigma de Hammett, relié au $pK_a$
$\mu\text{L}$	Microlitre
$\mu\text{M}$	Micromolaire
$\mu\text{mol}$	Micromole

À toi, grand-maman,  
pour ta volonté, ton courage  
et ton amour inconditionnel

## Remerciements

Tout d'abord, je veux remercier mon directeur de recherche, le Pr. Jeffrey W. Keillor, pour m'avoir permis d'effectuer mes études supérieures dans son groupe de recherche. Il m'a donné la possibilité de travailler sur un projet passionnant dans un environnement très enrichissant permettant un accomplissement tant professionnel que personnel. Je le remercie sincèrement pour son immense confiance au cours de ces années et son soutien continu. Également, je lui dis merci pour la chance qu'il m'a donnée de faire un stage de recherche en Écosse et pour les connaissances acquises sur les différents types de scotch !!

Je tiens également à dire merci à tous les membres du groupe de recherche, tant passé que présent. Ils m'ont tous soutenu durant ces années et ce fut un grand plaisir de travailler en leur compagnie. Je tiens spécialement à remercier les membres du groupe GGT, soit Annie Ménard, Christian Lherbet, Caroline Rivard et Mylène Morin, pour la belle complicité et l'esprit d'équipe que nous avons eus dans le laboratoire. Un merci tout spécial est également adressé à Christophe Pardin pour le soleil et la bonne humeur quotidienne qui l'ont toujours accompagnés.

Les correcteurs de cette thèse méritent également d'être chaudement remerciés pour leur grande patience. Il s'agit de Christian Lherbet, Mylène Morin, Caroline Rivard et Nicolas Paquin. Vous m'avez tous été d'un grand soutien au cours de ces derniers mois et je vous en remercie chaleureusement.

Au fil de mes années d'étude, j'ai également pu rencontrer des personnes extraordinaires que je suis fière de considérer comme mes amis et que je remercie du fond du coeur. Il s'agit notamment de Christian Lherbet, Cécile Gauchet, Dr. Maxime Buffat, Caroline Chenel et Kamal Fettis. Malgré la distance qui nous séparera, j'espère toujours continuer à garder cette belle complicité avec eux.

Je tiens également à remercier plusieurs personnes pour leur apport en matériel ou en expertise au cours des expériences. Il s'agit notamment de la Pr. Joelle Pelletier et de ses étudiants Nicolas Doucet, Jordan Volpato (« conseiller technique » !!), Audrey Tousignant, Audrey Nisole, Roberto Chica, Steve Gillet (leur appartenance également au groupe de recherche Keillor en fait des personnes remerciées deux fois !!) et la Pr. Andreea Schmitzer, du Pr. Stephen Michnick et de ses étudiants Jean-François Turcotte, Ingrid Rémy et François-Xavier Campbell-Valois, du Pr. Guy Boileau, du Pr. Pascal Chartrand et de son étudiant Nicolas Paquin, du Dr. Robert Lortie, de la compagnie BioMep, de Louise Cournoyer et de Marie-France Gaumont-Leclerc.

Ce travail aurait été rendu plus difficile sans l'aide financière des organismes subventionnaires CRSNG et FCAR au cours des études doctorales. Ils sont chaudement remerciés.

Enfin, tout ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien sans faille et l'immense patience de ma famille et de mes amis dans les bons et les mauvais moments que donne la recherche. Je les remercie du fond du cœur.

# **CHAPITRE 1**

## **Introduction**

Le corps humain est constitué en grande partie de macromolécules dont les fonctions sont notamment de maintenir l'intégrité cellulaire, de perpétuer les informations génétiques et de catalyser diverses réactions dans le métabolisme. Les enzymes, membres de la famille des protéines, sont des macromolécules formées d'acides aminés et agissent en tant que catalyseurs d'une ou plusieurs réactions chimiques. La transformation des aliments en énergie ou le processus de la respiration serait impossible sans leur existence.

Les enzymes sont notamment très importantes lors de réactions chimiques cruciales. L'hydrolyse de monoesters et de diesters de phosphates en est un exemple. En présence de la phosphatase alcaline de *E. coli*, la vitesse de la réaction est augmentée par un facteur de  $10^{15}$  à  $10^{17}$  par rapport à l'hydrolyse spontanée<sup>1</sup>. Ceci serait principalement dû à la stabilisation de l'état de transition de la réaction par l'enzyme<sup>2</sup>. Il s'agit donc d'un des meilleurs exemples de l'efficacité enzymatique. Les enzymes permettent également d'accélérer les vitesses de réaction dans des conditions assez douces de température et de pH, peuvent être précisément régulées et sont très spécifiques par rapport aux substrats, évitant ainsi les réactions secondaires. Les études de la structure, de la fonction et du mécanisme détaillé d'une enzyme sont donc nécessaires pour mieux comprendre le fonctionnement du corps humain<sup>3</sup>.

Les enzymes sont la plupart du temps identifiées en fonction de leur structure ou d'un substrat utilisé. Cependant, afin d'éviter toute ambiguïté, un système de classification selon le type de réaction catalysée a été créé. Ainsi, chaque enzyme porte un code de quatre chiffres séparés par des points et précédé par les lettres EC pour Enzyme Commission<sup>3</sup>. Le premier chiffre correspond au type de réaction catalysée. Le Tableau I contient la signification de ce premier chiffre.

**Tableau I.** Classification des enzymes selon le type de réaction catalysée<sup>3</sup>.

Premier chiffre	Classe d'enzyme	Type de réaction catalysée
1	Oxydo-réductase	Oxydation-réduction
2	Transférase	Transfert de groupes fonctionnels
3	Hydrolase	Hydrolyse
4	Lyase	Élimination de groupes
5	Isomérase	Isomérisation
6	Ligase	Formation de lien liée à l'hydrolyse d'ATP

Le deuxième chiffre correspond à une sous-classification de la réaction catalysée. Par exemple, dans les réactions de transfert de groupes fonctionnels, il y a le transfert des groupements acyle, alkyle, phosphate, etc. Ensuite, un troisième chiffre correspond à un autre sous-groupe et le quatrième chiffre est purement donné selon un ordre numérique dans cette catégorie. Ainsi, la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase possède le code EC 2.3.2.2, donc il s'agit d'une transférase d'un groupe acyle à partir d'acides aminés. Cette classification permet de faire des études comparatives entre diverses enzymes ayant les mêmes « chiffres » au début de leur code, pouvant ainsi offrir des informations intéressantes quant au mécanisme et à la structure. La classe des transpeptidases (EC 2.3.2.-) a été peu étudiée jusqu'à maintenant, malgré l'importance au niveau physiologique de ce type de réaction. L'objet de cette thèse consiste à mieux connaître et comprendre le mécanisme de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase.

## 1.1 La $\gamma$ -glutamyltranspeptidase

### 1.1.1 Localisation

La  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT) est une enzyme présente dans plusieurs organismes vivants. Ainsi, il est possible de la retrouver dans les bactéries (*E. coli*)<sup>4</sup>

et *N. meningitidis*<sup>5</sup> par exemple), la levure *S. cerevisiae*<sup>6</sup>, les plantes<sup>7,8</sup> et les animaux<sup>9</sup>. Le pourcentage d'identité au niveau des séquences primaires de la GGT de ces différents organismes est montré au Tableau II. Une grande différence entre les séquences des mammifères et des micro-organismes est observable.

**Tableau II.** Pourcentage d'identité entre les séquences primaires de la GGT de différentes espèces<sup>6,10</sup>.

Type de GGT	GGT humaine	GGT de rat	GGT de <i>S. cerevisiae</i>
GGT de <i>E. coli</i>	31 %	31 %	27 %
GGT de <i>S. cerevisiae</i>	32 %	30 %	
GGT de rat	79 %		

La GGT est normalement constituée de deux sous-unités différentes dont la masse varie selon l'espèce. Ainsi, chez le rat, selon la séquence primaire de la protéine, la petite sous-unité possède un poids moléculaire de 20 kDa et une grande sous-unité de 42 kDa<sup>11</sup>, mais chez la GGT de *E. coli*, les poids sont respectivement de 20 et de 39 kDa<sup>10,12</sup>. La différence n'est pas très grande au niveau du poids moléculaire, mais une faible homologie existe entre les séquences primaires de ces espèces. Des valeurs très différentes de celles-ci ont été reportées dans la littérature, mais la variation est probablement due au protocole de purification utilisé pour obtenir l'enzyme<sup>13</sup>. La grande sous-unité est encodée par la partie *N*-terminale de la protéine et la petite sous-unité, par la partie *C*-terminale.

La GGT est le plus souvent liée à une membrane grâce à une ancre transmembranaire située sur la grande sous-unité<sup>14</sup>. En position *N*-terminale se trouvent quelques acides aminés hydrophiles, puis environ 20 acides aminés hydrophobes qui forment une ancre transmembranaire simple. Le reste de l'enzyme (environ 90 % des acides aminés qui forment le reste de la grande sous-unité et la petite sous-unité) est situé de l'autre côté de la membrane. Selon l'espèce,

l'orientation et la membrane où est liée la GGT sont différentes. Le Tableau III résume les diverses informations quant à la localisation de la GGT.

**Tableau III.** Localisation, orientation et présence de l'ancre transmembranaire de la GGT dans diverses espèces<sup>15,16,17,18</sup>.

Type de GGT	Localisation	Orientation <sup>a</sup>	Ancre transmembranaire ?
GGT de <i>E. coli</i>	Espace périplasmique	---	Non
GGT de <i>N. meningitidis</i>	Membrane plasmidique	Surface interne	Oui
GGT de <i>S. cerevisiae</i>	Membrane des vacuoles	Intérieur vacuole	Oui
GGT de rat	Membrane plasmidique	Surface externe	Oui
GGT humaine	Membrane plasmidique	Surface externe	Oui

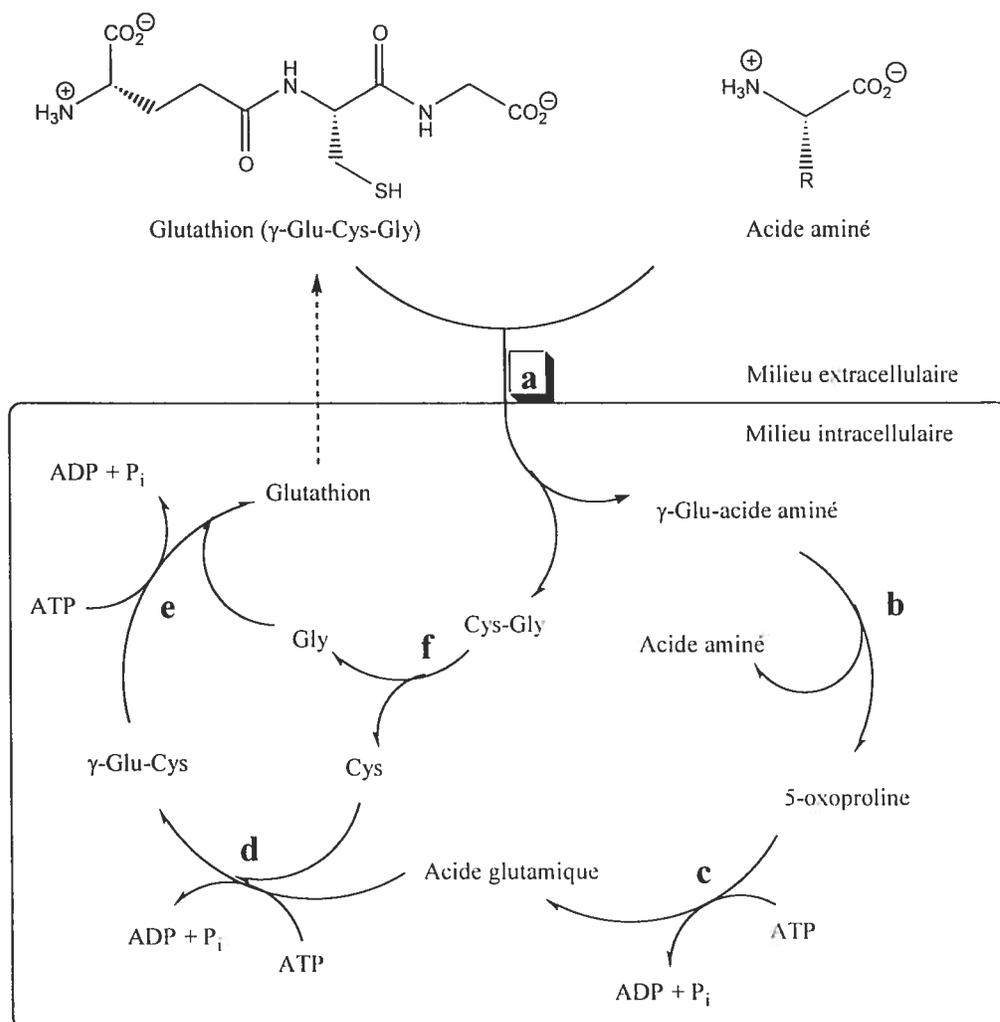
<sup>a</sup> Côté vers lequel se retrouve la majorité de la grande sous-unité et la petite sous-unité.

Dans le cas de la GGT de rat, l'extrémité *N*-terminale de la protéine est dans le cytoplasme et le domaine catalytique est entièrement situé à l'extérieur de la cellule. Des exceptions existent, telles la GGT de *E. coli* qui constitue la seule forme de GGT native soluble et la GGT de *N. meningitidis* qui possède une orientation unique. Aussi, tous les types de GGT, sauf celle de bactérie, sont hautement glycosylés<sup>9</sup>, mais quelques différences dans la nature des sucres sont présentes selon l'organe où la GGT est retrouvée<sup>9</sup>.

Chez les mammifères, la GGT est retrouvée principalement dans les reins, mais également dans le pancréas, le sérum, le cerveau<sup>19</sup> et le foie<sup>20</sup>. Cela explique pourquoi la GGT a longtemps été purifiée à partir des reins de rat et d'humain<sup>21</sup>.

### 1.1.2 Rôles physiologiques

La GGT joue plusieurs rôles physiologiques qui sont reliés en grande partie à la nature de son substrat naturel, le glutathion ( $\gamma$ -glutamylcystéinyglycine, GSH, Schéma 1). Ce tripeptide est impliqué dans plusieurs réactions de protection contre les agents oxydants grâce à la présence du soufre de la cystéine<sup>22</sup>. La dégradation et la formation du glutathion chez les mammifères sont régulées par la GGT grâce au cycle du  $\gamma$ -glutamyle qui est représenté au Schéma 1<sup>23,24</sup>.



**Schéma 1.** Représentation du cycle du  $\gamma$ -glutamyle dans une cellule. Les enzymes sont la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (a), la  $\gamma$ -glutamyl cyclotransférase (b), la 5-oxoprolinase (c), la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase (d), la glutathion synthétase (e) et une protéase intracellulaire (f). R représente une chaîne latérale d'un acide aminé.

Ce cycle est présent dans la plupart des types de cellule<sup>24</sup>. La GGT (a) est la seule enzyme extracellulaire de ce cycle et dégrade le lien amide en position  $\gamma$  dans le GSH pour transférer l'entité  $\gamma$ -glutamyle sur un acide aminé. Cette réaction forme le dipeptide Cys-Gly et un  $\gamma$ -Glu-acide aminé. Par la suite, ces deux composés pénètrent à l'intérieur de la cellule où le premier sera dégradé par une protéase (f) pour donner la Cys et la Gly séparément pendant que le deuxième subira des transformations à la suite de l'action des  $\gamma$ -glutamyl cyclotransférase (b) et 5-oxoprolinase (c) pour donner le Glu et l'acide aminé. La synthèse du GSH est possible grâce à la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase (d) et la glutathion synthétase (e). Le glutathion joue par la suite son rôle au niveau intracellulaire et peut se retrouver à l'extérieur de la cellule. Ainsi, grâce à la GGT, le glutathion a pu être dégradé à l'extérieur de la cellule et être reformé à l'intérieur tout en faisant pénétrer à la fois un acide aminé. Le cycle du  $\gamma$ -glutamyle permet donc également le transport d'acides aminés à l'intérieur des cellules<sup>23</sup>.

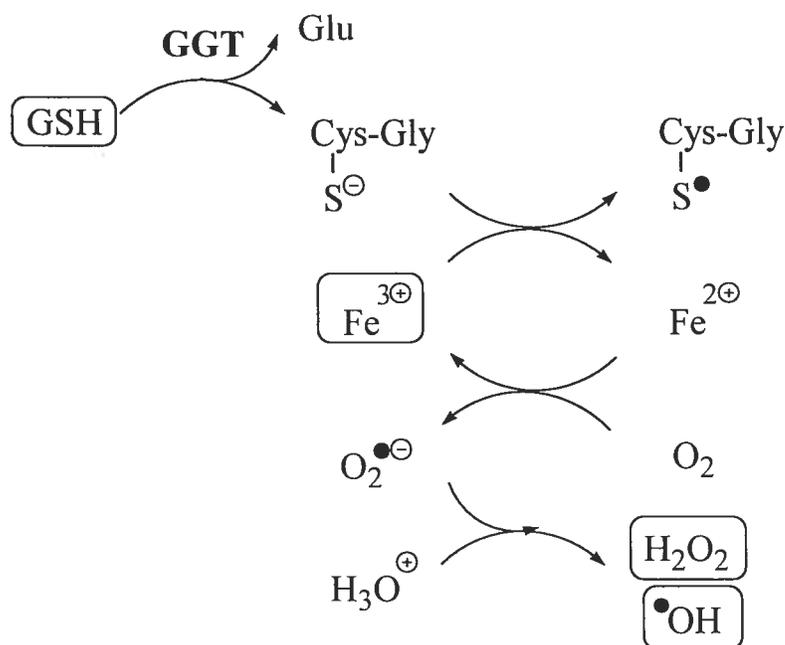
Le glutathion est souvent couplé par son soufre à des composés chimiques pouvant être éliminés du corps par des isoenzymes de glutathion-S-transférase<sup>9</sup>. La GGT clive le lien  $\gamma$ -glutamyle de ce nouveau composé glutathion S-conjugué, puis la glycine est clivée et une acétylation à la position N-terminale de la cystéine est effectuée, permettant ainsi l'élimination dans l'urine de cet acide mercapturique. La GGT joue donc un rôle dans la détoxification cellulaire. Cette même réaction est également réalisée par la GGT dans la conversion des leucotriènes C<sub>4</sub> en D<sub>4</sub><sup>25</sup>. Il est possible d'utiliser cette enzyme pour activer des prodrogues, comme il a déjà été fait avec la dermorphine<sup>26</sup>, l'acivicine<sup>27</sup> et des dérivés du phénol<sup>28</sup>.

L'enzyme est aussi couramment utilisée comme marqueur hépatique. Des études poussées ont été réalisées afin de promouvoir son utilisation dans le diagnostic du cancer. Cependant, il semble que les changements apportés à la GGT au niveau du foie soient seulement au niveau des sucres présents sur l'enzyme et qu'il soit difficile de relier la nature des isoenzymes à une maladie précise<sup>29</sup>. Puisque la GGT est capable de créer un nouveau lien amide en position  $\gamma$ , comme il a

été montré au Schéma 1, certains groupes de recherche ont déjà utilisé la GGT pour synthétiser des dipeptides utiles en alimentation<sup>30</sup> et des prodrogues en ajoutant une entité  $\gamma$ -glutamyle à la dopamine<sup>31</sup>.

Le rôle exact de la GGT de bactérie est cependant plus difficile à définir. Dans le cas de la GGT de *N. meningitidis*, il a déjà été démontré que l'enzyme était nécessaire à la croissance de la bactérie dans le fluide cébrospinal chez l'humain infecté<sup>5</sup>. Il semble que la GGT servirait à fournir la bactérie en cystéine grâce à son rôle dans l'hydrolyse du glutathion.

La GGT est également impliquée dans des désordres physiologiques. Cette enzyme hydrolyse rapidement les complexes formés entre le glutathion et le cisplatine, ce qui a pour effet de les éliminer rapidement du corps humain<sup>32</sup> et de créer une résistance aux médicaments<sup>9</sup>. La GGT semble aussi impliquée dans diverses maladies impliquant des désordres oxydo-réductifs telles la maladie de Parkinson<sup>33</sup>, l'inhibition de l'apoptose<sup>34,35</sup>, le diabète et les maladies cardiovasculaires<sup>36</sup>. D'une part, le glutathion est reconnu pour jouer le rôle d'un antioxydant dans la cellule. Ainsi, une augmentation de l'activité de la GGT pourrait se traduire par la formation d'une plus grande concentration de GSH intracellulaire<sup>9</sup>. D'autre part, il semble que la GGT, en présence d'ion ferrique, puisse former des espèces oxygénées réactives, comme il est montré au Schéma 2<sup>35</sup>.

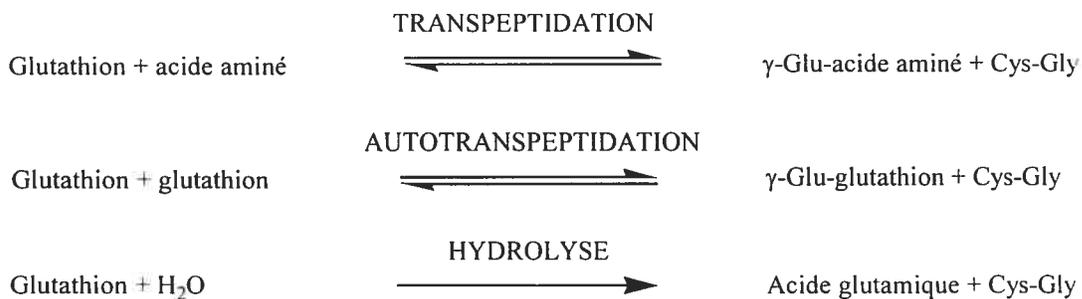


**Schéma 2.** Série de réactions provenant de l'hydrolyse du glutathion par la GGT et menant à la formation de peroxydes dans les cellules<sup>35</sup>.

Ainsi, la GGT catalyse le clivage du GSH, menant à la formation de Cys-Gly. Ce dernier peut réduire l'ion  $\text{Fe}^{3+}$  afin de former l'ion ferreux  $\text{Fe}^{2+}$  qui peut réagir à son tour avec de l'oxygène pour former une espèce oxygénée hautement réactive radicalaire. Celle-ci va réagir avec de l'eau pour former du peroxyde qui peut sévèrement endommager les cellules<sup>35</sup> grâce à la formation de radicaux hydroxydes<sup>37</sup>. Ces radicaux peuvent créer des dommages irréparables à l'ADN. Cependant, pour faire ces réactions, la présence de fer est nécessaire. Il a déjà été démontré que la quantité de fer augmente avec l'âge<sup>38</sup> et est impliquée dans des désordres tels les maladies neurodégénératives<sup>39</sup>, le diabète<sup>40</sup> et l'athérosclérose<sup>41</sup>. De plus, le foie contient de grandes réserves de fer<sup>42</sup>. Le Schéma 2 pourrait donc expliquer l'importance de l'activité de la GGT dans tous ces désordres physiologiques qui serait dû à son rôle dans le clivage du glutathion menant à la formation d'espèces oxygénées réactives.

### 1.1.3 Réactions catalysées

La GGT catalyse le bris du lien amide en position  $\gamma$  du glutathion (appelé substrat donneur) et transfère l'entité  $\gamma$ -glutamyle ainsi formée sur un substrat accepteur. Les diverses réactions catalysées par l'enzyme sont indiquées au Schéma 3.



**Schéma 3.** Différentes réactions catalysées par la GGT.<sup>43</sup>

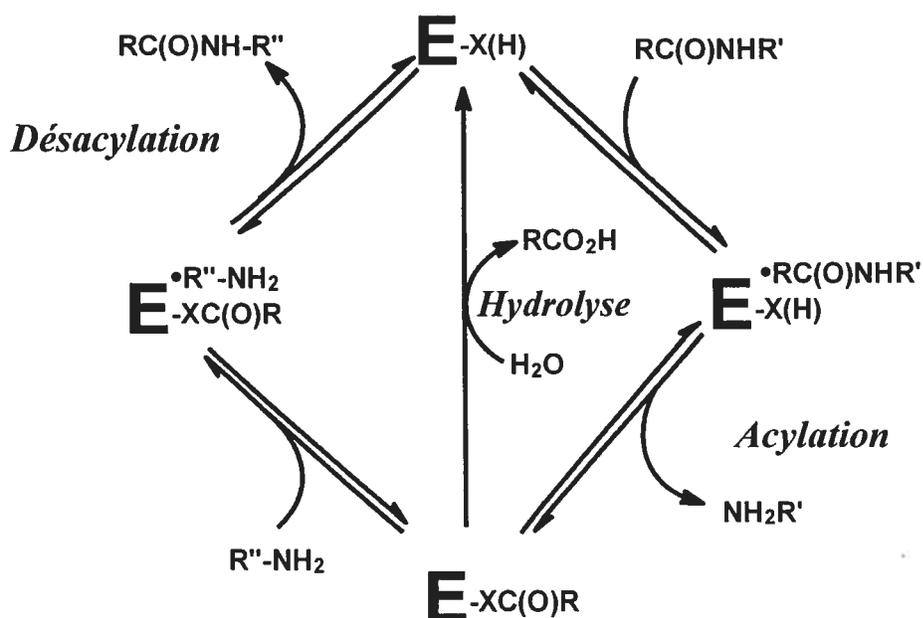
Dans le cas de la réaction de transpeptidation, l'entité  $\gamma$ -glutamyle est transférée sur un acide aminé ou un dipeptide comme substrat accepteur pour former le  $\gamma$ -glutamyl-acide aminé (ou dipeptide) contenant un nouveau lien amide en position  $\gamma$  et la cystéinylglycine. Lorsqu'une deuxième molécule de glutathion agit comme substrat accepteur, une réaction d'autotranspeptidation a lieu et conduit à la formation du  $\gamma$ -glutamyl-glutathion et de Cys-Gly. Enfin, lorsque le substrat accepteur est une molécule d'eau, le GSH est hydrolysé de manière irréversible pour mener à l'acide glutamique et à Cys-Gly<sup>9</sup>.

Il est possible de changer les conditions réactionnelles afin de privilégier une réaction par rapport à une autre<sup>9,43</sup>. Ainsi, si la réaction de transpeptidation est étudiée, une concentration assez élevée de substrat accepteur doit être utilisée afin d'éviter la réaction d'autotranspeptidation. Pour étudier la réaction d'autotranspeptidation, le substrat accepteur doit être omis du mélange réactionnel, mais la réaction d'hydrolyse subsistera, modifiant ainsi un peu les résultats des cinétiques enzymatiques. Pour étudier la réaction d'hydrolyse, il est nécessaire

d'utiliser un substrat donneur de configuration D ou une très faible concentration de substrat donneur<sup>44</sup>. Comme il sera vu un peu plus tard dans la section 1.1.4, la GGT reconnaît aussi bien les substrats donneurs de configuration D et L, mais seulement les acides aminés de configuration L sont reconnus comme substrats accepteurs. Ainsi, l'absence de substrat accepteur aminé et l'utilisation d'un substrat donneur de configuration absolue D permettent l'étude de l'étape d'hydrolyse seulement.

Il est difficile de connaître la nature exacte de la réaction physiologique privilégiée par la GGT. Ainsi, certains croient que l'hydrolyse est la réaction la plus importante catalysée par la GGT au pH physiologique et que cette enzyme agit donc comme une glutathionase *in vivo*<sup>45</sup>. Cependant, ces études ont été effectuées *in vitro* en présence de la L-méthionine comme seul acide aminé agissant en tant que substrat accepteur, ce qui ne ressemble pas aux conditions physiologiques. Un autre groupe de recherche a montré que la transpeptidation est la réaction la plus importante en considérant la concentration de tous les acides aminés pouvant se trouver dans le rein près de la GGT<sup>46</sup>. Par contre, selon l'état métabolique, une modification dans la nature et la concentration des acides aminés présents au niveau du rein est possible. De ce fait, il est difficile de connaître la réaction privilégiée *in vivo*<sup>9</sup>.

Avec toutes ces informations, plusieurs mécanismes catalytiques ont été proposés pour la GGT, dont le plus plausible est de type ping-pong modifié. Celui-ci est représenté au Schéma 4.



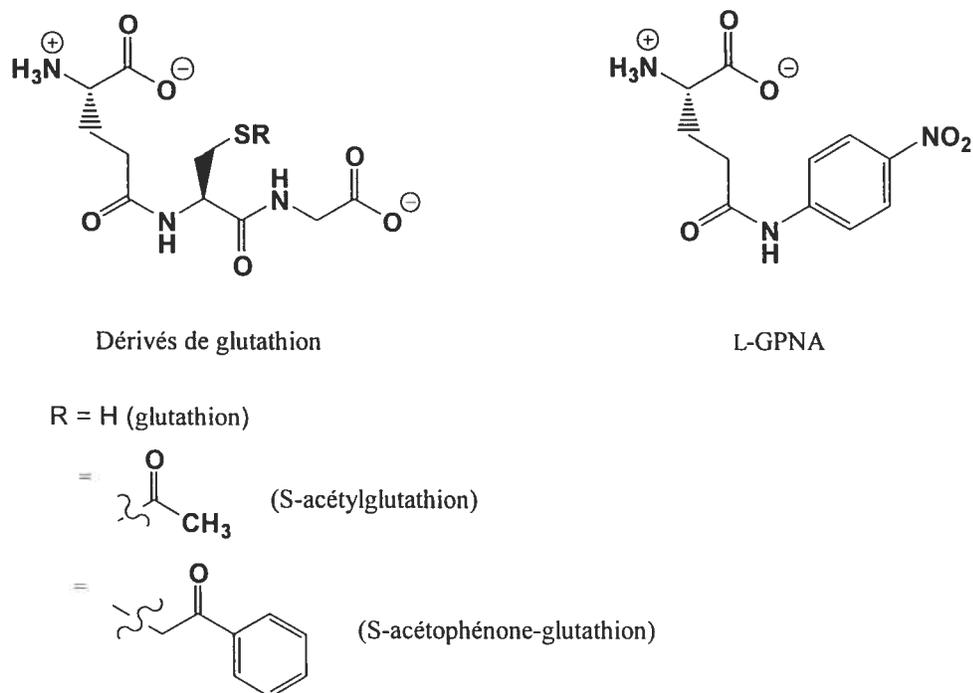
**Schéma 4.** Mécanisme ping-pong modifié proposé pour la GGT. E représente la GGT libre. X est le nucléophile non identifié. R, R' et R'' sont des chaînes alkyles.

Ainsi, l'enzyme libre (E) se lie au substrat donneur (par exemple le glutathion) pour former un complexe Michaelis qui se dégrade pour générer le premier produit (dans ce cas-ci, la Cys-Gly) et un intermédiaire  $\gamma$ -glutamyl-enzyme dans une étape d'acylation de l'enzyme. Cet intermédiaire peut par la suite réagir avec un acide aminé comme substrat accepteur pour faire un nouveau complexe Michaelis qui se décompose pour former le deuxième produit (un  $\gamma$ -glutamyl-acide aminé) et régénérer l'enzyme libre dans une étape de désacylation. Cependant, si l'intermédiaire  $\gamma$ -glutamyl-enzyme est attaqué par une molécule d'eau, une réaction irréversible d'hydrolyse a lieu pour former l'acide glutamique et régénérer l'enzyme libre, ce qui modifie le mécanisme ping-pong. De plus, l'intermédiaire acyl-enzyme a été proposé comme étant covalent<sup>9,47</sup>, mais son existence n'a pas été directement prouvée et des études sont nécessaires à ce niveau afin de démontrer ce mécanisme. Aussi, certains pensent plutôt que le mécanisme de la GGT est de type séquentiel avec une addition désordonnée des substrats et une libération ordonnée des produits,

ce qui est montré par l'existence d'un complexe enzyme - substrat donneur – substrat accepteur<sup>48</sup>. Cependant, très peu de résultats expérimentaux corroborent cette idée.

#### 1.1.4 Substrats de la GGT

Les substrats donneurs de la GGT contiennent tous une entité  $\gamma$ -glutamyle. Le substrat *in vivo* de la GGT, tel qu'indiqué au Schéma 1, est le glutathion. Cependant, le glutathion *S*-conjugué est également bien reconnu par la GGT, parfois même mieux que le composé parent<sup>45</sup>, selon les valeurs de  $K_M$  (constante de Michaelis reliée à une constante d'affinité d'une enzyme pour un substrat<sup>49</sup>). Il s'agit d'excellents substrats également au niveau de la vitesse de catalyse<sup>50</sup>. Cependant, ces composés sont plus difficiles à détecter (une détection des produits par HPLC peut être effectuée<sup>51</sup>) et sont donc moins utilisés dans les cinétiques enzymatiques. La partie Cys-Gly du glutathion peut être remplacée par un groupement *p*-nitroaniline, donnant ainsi le composé L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (L-GPNA)<sup>52</sup>. Ce dernier, lorsque clivé par la GGT au niveau du lien amide, permet la libération d'un groupement *p*-nitroaniline facilement suivi par spectrophotométrie UV-Vis et possède sensiblement les mêmes caractéristiques cinétiques que le glutathion<sup>21</sup>. Ce composé constitue donc un substrat donneur largement utilisé dans les tests d'activité de la GGT et dans les tests cliniques. La structure de ces divers substrats donneurs est montrée à la Figure 1.



**Figure 1.** Substrats donneurs de la GGT : les dérivés du glutathion et le L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (L-GPNA).

Il existe également d'autres substrats donneurs pouvant être facilement détectés. Il s'agit du L- $\gamma$ -glutamyl-naphthylamide<sup>53</sup> (détecté par fluorescence) et de la glutamine. La GGT libère, après avoir catalysé le bris du lien amide de la glutamine, de l'ammoniac qui peut être détecté de manière continue grâce à l'enzyme glutamate déshydrogénase<sup>54</sup>.

Très peu de modifications de l'entité  $\gamma$ -glutamyle sont acceptées par l'enzyme de mammifère. Ainsi, la configuration absolue D ou L de cette entité comme substrat donneur est bien acceptée et des constantes cinétiques assez comparables sont obtenues<sup>44</sup>. Cependant, une unité méthylène de plus (dérivé homoglutamine) ou de moins (dérivé asparagine) sur la chaîne latérale donne un composé non reconnu par la GGT<sup>55</sup>. La présence d'un substituant sur la chaîne latérale d'une entité  $\gamma$ -glutamyle empêche le composé d'être reconnu comme substrat donneur, sauf à la position  $\alpha$ , où un groupement méthyle est accepté<sup>56</sup>. Il a été déterminé auparavant dans notre laboratoire que le groupement  $\alpha$ -ammonium devait demeurer libre et que le

groupement  $\alpha$ -carboxylate pouvait être remplacé par un méthyl ester ou un amide primaire sans observer une grande perte de l'affinité du composé pour le site de liaison du substrat donneur<sup>57</sup>. De plus, un hétéroatome à la position  $\gamma$  sur la chaîne latérale est également accepté par l'enzyme, mais le composé agit alors uniquement comme substrat accepteur, et non pas comme substrat donneur<sup>58</sup>.

Les substrats accepteurs, quant à eux, doivent absolument posséder la configuration absolue L<sup>54</sup>. Il peut s'agir d'acides aminés ou de dipeptides, mais les tripeptides ne sont pas bien reconnus<sup>55</sup>. Il semble que les amines primaires puissent être des substrats accepteurs de la GGT de plante, mais cette particularité n'a pas encore été étudiée en détail<sup>7,43</sup>. Dans les acides aminés, les meilleurs substrats accepteurs sont la L-cystine, la L-glutamine et la L-méthionine. Les acides aminés possédant des chaînes latérales substituées sont de pauvres substrats accepteurs alors que la proline et les substrats substitués en position  $\alpha$  sont complètement inactifs<sup>43,54</sup>. Dans le cas des dipeptides, la glycine est l'acide aminé de choix pour la deuxième position et le meilleur dipeptide est la L-Met-Gly<sup>54</sup>.

Dans le cas de l'enzyme purifiée de *E. coli*, moins d'études ont été effectuées quant à la spécificité des substrats<sup>4</sup>. Il semble cependant que les substrats accepteurs les mieux reconnus soient les acides aminés basiques ou aromatiques, mais les constantes de Michaelis sont très élevées, ce qui laisse supposer aux auteurs que la réaction de transpeptidation n'est pas la réaction principale de cette enzyme. Il existe donc une variation dans la spécificité pour le substrat accepteur selon l'espèce d'où provient la GGT.

### 1.1.5 Site de liaison de la GGT

Peu d'informations sont disponibles quant à la structure de la GGT. En effet, jusqu'à maintenant, seule une structure par rayons-X de la GGT libre de *E. coli* a pu être obtenue, mais la résolution n'est pas suffisamment bonne pour déterminer la position exacte des résidus<sup>59,60</sup>. Il semble, selon des études cinétiques, que le site de

liaison du glutathion, le substrat donneur, soit situé à l'interface des deux sous-unités<sup>9</sup>. Il serait possible de diviser le site de liaison du glutathion en trois sous-sites, selon chacun des acides aminés qui le constituent. Le site de liaison de l'entité  $\gamma$ -glutamyle du glutathion (sous-site 1) serait situé sur la petite sous-unité de la GGT humaine et serait similaire à celui du rat<sup>11</sup>. Les sous-sites 2 et 3 seraient formés par l'interface des deux sous-unités. Quant au site de liaison du substrat accepteur, il a été proposé comme étant formé des sous-sites 2 et 3 du site de liaison du substrat donneur<sup>54</sup>. De plus, le maléate, un activateur de la réaction d'hydrolyse catalysée par la GGT, serait lié au sous-site 3 grâce à sa ressemblance, au niveau de la structure, avec la glycine normalement située dans ce sous-site<sup>61</sup>. Cependant, puisque la GGT semble agir selon un mécanisme ping-pong, un changement de conformation a été proposé pour expliquer la différence de liaison entre les substrats donneurs et accepteurs malgré le fait qu'ils pourraient être reconnus au même endroit par l'enzyme<sup>54</sup>.

Des études de mutagenèse dirigée et de modification par des agents chimiques ont été effectuées afin de déterminer la nature des acides aminés impliqués dans la liaison des substrats donneurs et accepteurs. Lorsque la GGT est incubée en présence de [<sup>14</sup>C]phénylglyoxal, agent modificateur des arginines et des lysines, une inhibition irréversible est obtenue<sup>62</sup>. Après identification des peptides modifiés et les expériences témoins nécessaires, il semble que les résidus Arg-111 et Lys-99, de la grande sous-unité de la GGT de rat, soient responsables de cette perte d'activité lorsqu'ils sont modifiés par l'agent chimique. L'Arg-111 a été proposée comme étant impliquée dans la liaison de l'entité  $\alpha$ -carboxyle libre du glutathion et la Lys-99, dans la liaison de cette entité présente au niveau de la glycine de ce substrat.

Pour vérifier cette possibilité, ces résidus ont été modifiés par mutagenèse dirigée de la GGT humaine exprimée dans des cellules de mammifère COS<sup>63</sup>. La mutation de l'Arg-112 (correspondant à l'Arg-111 chez la GGT de rat) et de la Lys-100 (Lys-99 chez le rat) n'a montré aucune perte d'activité significative. Cependant, la mutation de l'Arg-107 de la GGT humaine a montré une baisse de l'affinité du

substrat donneur, ce qui pourrait être expliqué par l'interaction de ce résidu avec l'entité  $\alpha$ -carboxyle du glutathion chez la GGT humaine par comparaison avec celle provenant du rat. De plus, à la suite de la mutation pour une lysine, la réaction de transpeptidation est complètement supprimée (la réaction d'hydrolyse est toujours possible mais moins efficace) malgré la rétention d'une charge positive. Ainsi, le résidu Arg-107 aurait également un rôle à jouer dans la liaison du substrat accepteur. La Lys-99 identifiée chez le rat était probablement accessible, mais peu importante au niveau de la liaison. Le résidu Glu-108 de la grande sous-unité chez la GGT humaine a également été muté. Il semble que l'affinité de l'enzyme pour le substrat accepteur Gly-Gly soit beaucoup plus faible, ainsi il pourrait jouer un rôle dans la liaison de celui-ci au niveau du groupement  $\alpha$ -aminé libre.

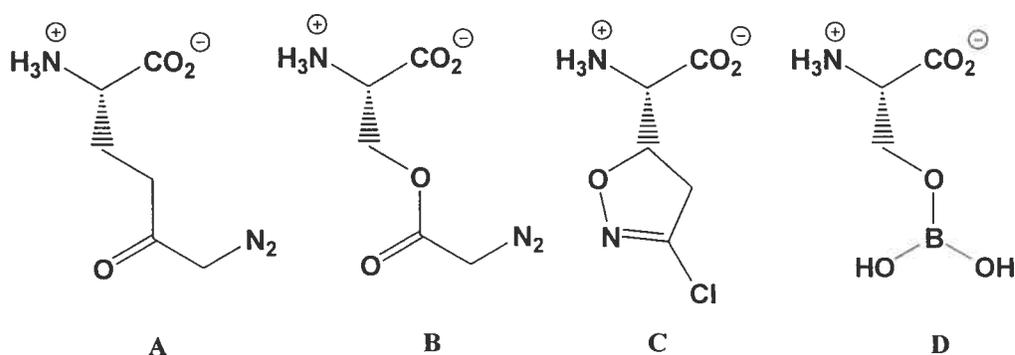
Des études d'inactivation de la GGT de rat par le composé iodo[ $^{14}\text{C}$ ]acétamide ont été effectuées<sup>64</sup>. Après digestion enzymatique de l'enzyme marquée, le résidu Asp-422 de la petite sous-unité a été identifié comme étant possiblement important dans la liaison du substrat donneur au niveau du groupement  $\alpha$ -ammonium libre. Les résidus Asp-422 et Asp-423 de la GGT humaine exprimée dans un système de cellules d'insectes infectées par des baculovirus ont été mutés séparément et en même temps<sup>65</sup>. La mutation du résidu Asp-423 a grandement diminué l'affinité de la GGT pour le substrat donneur. Quant au résidu Asp-422, il affecte également l'activité enzymatique, mais beaucoup moins. Ainsi, le rôle de ces résidus réside dans la liaison du substrat donneur.

L'importance de ces résidus dans la liaison des substrats donneurs a également été démontrée en utilisant des analogues de substrats donneurs déjà décrits en partie dans la section 1.1.4<sup>57</sup>. Ainsi, lorsque le groupement  $\alpha$ -ammonium ou le groupement  $\alpha$ -carboxylique ont été modifiés, une perte de l'affinité de ces composés par la GGT de rat a été observée. Ceci démontre donc l'importance des résidus Asp et Arg possiblement impliqués dans la liaison du substrat donneur.

## 1.1.6 Site catalytique de la GGT

### 1.1.6.1 Nucléophile

Plusieurs études ont également été effectuées afin de déterminer le nucléophile de la GGT. Différents inhibiteurs ayant une structure similaire à une entité  $\gamma$ -glutamyle, dont le 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) et la L-diazoacétylsérine (L-azasérine), ont montré une inhibition complète et irréversible de l'enzyme<sup>66</sup>. La structure de ces inhibiteurs se retrouve à la Figure 2.



**Figure 2.** Structure de divers inhibiteurs pour la GGT. Composé A, le L-6-diazo-5-oxonorleucine (DON); composé B, la L-diazoacétylsérine (azasérine); composé C, l'acivicine; composé D, complexe L-sérine-borate.

L'utilisation de DON et d'azasérine radioactifs a permis de localiser le site d'inhibition sur la petite sous-unité. La GGT est aussi rapidement inhibée de manière irréversible par l'acivicine (AT-125, acide L-( $\alpha$ S,5S)- $\alpha$ -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacétique, Figure 2C) qui se lie à la petite sous-unité de la GGT<sup>67</sup>. Grâce à de l'acivicine marquée avec un radio-isotope  $^{14}\text{C}$ , le résidu Thr-523 de la petite sous-unité a pu être identifié comme étant lié à l'inhibiteur<sup>68</sup>. Un complexe sérine-borate (Figure 2D) semble pouvoir se lier de manière réversible au site de liaison du substrat donneur grâce à des expériences de compétition avec ce type de substrat<sup>69</sup>. Dans ce dernier cas, le mode d'action proposé pour l'inhibition est la complexation d'un groupement hydroxyle provenant de l'enzyme sur l'atome de bore. Cette conclusion a été vérifiée par la synthèse de l'acide  $\gamma$ -glutamylboronique qui a montré une

inhibition réversible de l'ordre du nanomolaire<sup>70</sup>. Aussi, l'incubation de fluorure de phénylméthane sulfonyle (PMSF), reconnu pour être un inhibiteur des protéases à sérine, a permis d'inactiver la GGT lorsque mise en présence de maléate<sup>71</sup>. Toutes ces expériences permettent de penser à une sérine ou à une thréonine comme nucléophile pour la GGT.

Des expériences de mutagenèse dirigée ont également été effectuées afin de déterminer la nature exacte du nucléophile. Le résidu identifié comme étant le nucléophile grâce à l'inhibition par l'acivicine dans divers organismes (Thr-523 chez le rat, Ser-406 chez l'humain) a été muté par une alanine<sup>72</sup>. Aucune modification de l'activité n'a été observée. Une attaque par le nucléophile de la GGT, suivie d'une transestérification sur le résidu identifié préalablement, pourrait expliquer ces résultats<sup>72</sup>. Alors, afin de déterminer un autre résidu possiblement impliqué, la mutation de chaque sérine dans la petite sous-unité de la GGT humaine a été effectuée et a mené à l'identification des résidus Ser-451 et Ser-452 comme étant importants dans la catalyse<sup>73</sup>. Cependant, ceux-ci pourraient être directement impliqués comme nucléophile ou indirectement comme stabilisateurs de l'intermédiaire tétraédrique au niveau du trou oxyanionique<sup>9,10</sup>.

Une autre étude a été effectuée sur la GGT de *E. coli*. Des études d'inhibition avec un dérivé  $\gamma$ -fluorophosphonate de l'acide glutamique et la spectrométrie de masse ont montré que la Thr-391 de cette GGT est le nucléophile<sup>74</sup>. Il faut noter que ce résidu, à la position *N*-terminale de la petite sous-unité, est conservé parmi toutes les GGT dont la séquence est connue. Il a donc été proposé que la GGT soit un membre de la famille des Ntn-hydrolases, Ntn correspondant à « *N*-terminal nucleophile ».

La superfamille des Ntn-hydrolases regroupe des enzymes ayant certaines caractéristiques mécanistiques et structurales. Ainsi, chacune possède un résidu catalytique situé en position *N*-terminale d'une de leurs sous-unités. Selon l'enzyme, il peut s'agir, par exemple, d'une sérine (acylase de l'acide glutaryl 7-

aminocéphalosporanique<sup>75</sup>), d'une thréonine (glycosylasparaginase<sup>76</sup>, sous-unité  $\beta$  du protéasome<sup>75</sup>) ou d'une cystéine (pénicilline V acylase<sup>77</sup>). Toutes les enzymes faisant partie de cette famille proviennent de l'auto-activation d'un précurseur pour donner une forme active. Il a été proposé pour la céphalosporine acylase qu'une molécule d'eau, correctement positionnée près du résidu sérine identifié comme le nucléophile, agit comme base générale pour permettre cette activation<sup>78</sup>. De plus, le site catalytique de l'enzyme doit notamment posséder une structure formée d'une hélice  $\alpha$ , de deux feuillets  $\beta$  et d'une hélice  $\alpha$  l'un au-dessus de l'autre<sup>78</sup> et permet l'hydrolyse d'un lien amide<sup>79</sup>. Il est également proposé que le groupement  $\alpha$ -ammonium libre de ce résidu en position *N*-terminale agisse comme base générale pour déprotoner le nucléophile lors d'une réaction enzymatique<sup>75,80</sup>.

La GGT possède toutes ces caractéristiques, ce qui en fait potentiellement un membre de cette famille. Ainsi, comme il a été dit plus tôt, un résidu Thr a été identifié comme étant le nucléophile de la GGT d' *E. coli*<sup>74</sup>. De plus, la mutation de ce résidu en alanine mène à la formation d'une GGT sans activité sous forme de précurseur. La mutation de ce résidu en sérine ou en cystéine permet l'auto-activation du précurseur, mais de manière beaucoup moins efficace<sup>81</sup>. Aussi, malgré l'absence d'une structure cristalline assez précise pour la GGT, la topologie des hélices  $\alpha$  et  $\beta$  est connue et permet de conclure que la GGT possède cette structure  $\alpha\beta\beta\alpha$  au site catalytique<sup>60</sup>.

#### 1.1.6.2 Acide/base général

Certains groupes de recherche ont tout de même cherché à déterminer la nature d'une base générale qui serait possiblement impliquée dans la déprotonation du nucléophile. Deux résidus His conservés dans les GGT de diverses espèces et présents dans la petite sous-unité ont été mutés chez la GGT humaine<sup>82</sup>. Le résidu His-383 ainsi muté semble jouer un rôle prépondérant au niveau catalytique dans l'étape de désacylation et le résidu His-505, dans la formation du complexe acyl-enzyme – substrat accepteur, et non dans l'étape d'acylation. Les auteurs de cette

recherche concluent à la non-pertinence de ces résidus dans le mécanisme catalytique puisque de l'activité est encore observée chez les mutants. Cependant, il est possible que ces résidus, spécialement l'His-383, joue un rôle dans la déprotonation du substrat accepteur au cours de l'étape de désacylation. L'enzyme mutante chez l'humain au niveau du résidu Glu-108, préalablement discutée dans la section 1.1.5, a montré une grande diminution dans la valeur du  $V_{MAX}$  (vitesse maximale de la réaction catalysée par l'enzyme) pour le substrat accepteur. Ainsi, en plus de son rôle dans la liaison de ce substrat, il pourrait également être impliqué dans la catalyse effectuée par l'enzyme en permettant l'abstraction d'un proton du substrat afin de permettre l'attaque sur l'intermédiaire acyl-enzyme<sup>63</sup>.

Au cours de la première étape catalysée par la GGT, un résidu jouant le rôle d'un acide général est nécessaire afin de permettre la protonation du groupe partant. Des recherches effectuées dans notre laboratoire ont montré, grâce à la réalisation d'une courbe de van't Hoff, la possibilité d'un résidu His pouvant jouer ce rôle<sup>83</sup>. Cependant, sans mutagenèse dirigée d'autres résidus His présents dans la grande sous-unité de la GGT, il sera difficile de l'identifier spécifiquement.

#### 1.1.6.3 Importance de l'activité glutaminase de la GGT

Selon les informations disponibles jusqu'à maintenant au niveau des résidus impliqués dans la liaison et la catalyse des substrats de la GGT, le site catalytique serait vraisemblablement situé sur la petite sous-unité et la grande sous-unité serait importante pour la liaison des substrats accepteurs pour la GGT<sup>9</sup>. Il a déjà été proposé que la petite sous-unité pourrait provenir d'une glutaminase et que la grande sous-unité aurait été ajoutée pour permettre la réaction de transpeptidation<sup>9,11</sup>. Il est intéressant de noter que la petite sous-unité de la GGT a déjà été démontrée comme étant capable de dégrader la grande sous-unité, ce qui en fait une protéase<sup>84,85</sup>. De plus, dans la même étude, la petite sous-unité purifiée (ou l'enzyme complète dans de l'urée) semble dégrader l'albumine, mais non pas les substrats modèles normalement

utilisés pour étudier les protéases (*p*-nitrophénylacétate, etc). Ce rôle de la GGT en tant que protéase reste à étudier plus en détail.

## **1.2 Objectifs de recherche**

Une meilleure compréhension du mécanisme de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase est nécessaire afin de mieux comprendre son véritable rôle physiologique. Ceci peut être effectué en partie grâce à ces trois objectifs de recherche.

### **1.2.1 Détecter l'intermédiaire acyl-enzyme de la GGT**

Le cycle catalytique de la GGT semble fonctionner selon un mécanisme ping-pong modifié. Cependant, les expériences effectuées jusqu'à maintenant n'ont pas permis d'observer directement l'intermédiaire acyl-enzyme, des conditions dénaturantes et des molécules non spécifiques à la GGT ayant été utilisées. L'objectif est d'observer cet intermédiaire acyl-enzyme grâce à des appareils permettant le suivi de réactions enzymatiques à de faibles temps réactionnels, en état pré-stationnaire, tels un mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher ») et un mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow »). Les études effectuées à ce niveau ainsi que l'impact au niveau des étapes d'hydrolyse et de désacylation par un substrat accepteur seront présentés au chapitre 2.

### **1.2.2 Élucider le mécanisme de la désacylation de l'intermédiaire acyl-enzyme**

L'intermédiaire acyl-enzyme peut être dégradé en réagissant avec un substrat accepteur tel un acide aminé ou avec une molécule d'eau dans les étapes de désacylation (aminolyse) ou d'hydrolyse, respectivement. Cependant, il y a peu d'informations concernant le mécanisme de l'étape de désacylation par aminolyse. Par exemple, la nature de l'étape limitante de cette réaction n'est pas connue. Il est donc nécessaire d'obtenir ces informations afin de mieux connaître le véritable rôle physiologique de la GGT et de comparer l'efficacité de ces deux étapes. Ceci est

possible grâce à l'utilisation de substrats accepteurs dont les groupements  $\alpha$ -ammoniums libres possèdent différents  $pK_a$ . L'utilisation de ceux-ci permettra la réalisation d'une courbe de type Brønsted et des expériences impliquant des effets isotopiques et de pH. Ainsi, une approche de type physico-chimie organique est proposée pour tenter de répondre à cette importante question et sera présentée au chapitre 3.

### **1.2.3 Purifier et caractériser la GGT recombinante humaine exprimée dans des levures**

La détermination d'un mécanisme pour une enzyme passe souvent par la mutagenèse dirigée des différents résidus importants dans les diverses réactions catalysées. Cependant, il existe peu de méthodes pour obtenir de la GGT recombinante de mammifère en grande quantité avec les mêmes caractéristiques que celle directement purifiée d'un organe de l'animal. Ainsi, il est nécessaire de développer un système permettant l'accès à ce type d'enzyme. Un système d'expression dans les levures pourrait répondre à tous ces besoins. Le clonage du gène de la GGT humaine dans un vecteur, puis l'expression et la purification de l'enzyme formée à partir d'un système de levure pourraient s'avérer une excellente alternative à l'enzyme purifiée directement des organes. Les différentes étapes menant à la purification de cette enzyme recombinante et la caractérisation de cette dernière seront présentées au chapitre 4. Cette nouvelle source de GGT humaine pourrait permettre d'obtenir encore plus d'informations sur son mécanisme et sa structure.

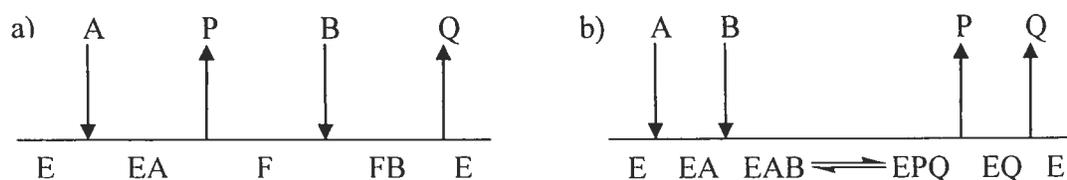
## **CHAPITRE 2**

### **Détection de l'intermédiaire acyl- enzyme de la GGT**

## 2.1 Introduction

Comme il a été présenté au chapitre 1, l'étude du mécanisme de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase est nécessaire afin d'obtenir plus d'informations sur son rôle physiologique. Il est donc important de connaître le type de substrats liés à l'enzyme, mais également l'ordre d'addition de ceux-ci et l'existence d'intermédiaires réactionnels (covalents ou non) au niveau de la GGT.

Ainsi, lorsqu'une enzyme possède deux substrats, comme c'est le cas pour la GGT, ceux-ci peuvent être liés de manière ordonnée ou non sur l'enzyme. De plus, cela peut se réaliser avant ou après la formation et la libération de produits par l'enzyme. Il est donc très important de déterminer cet ordre afin de mieux étudier l'enzyme. Le Schéma 5 permet de visualiser de manière un peu plus claire les types de mécanisme possibles.

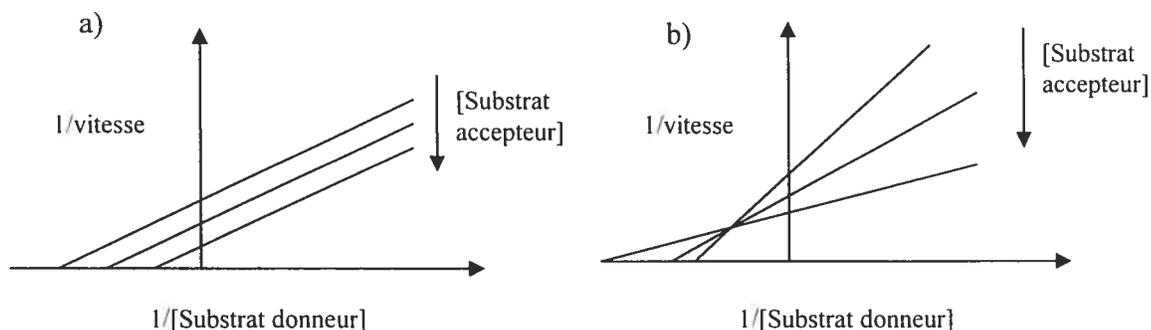


**Schéma 5.** Types de mécanisme enzymatique possibles lorsque deux substrats se lient à une enzyme qui va générer deux produits, selon la nomenclature de Cleland<sup>86</sup>. a) Mécanisme de type ping-pong, b) Mécanisme de type séquentiel ordonné.

Dans le cas de la GGT (Schéma 5a), il a été proposé qu'un premier substrat, le substrat donneur (A), se lie à l'enzyme (E) pour donner le complexe EA. Par la suite, la libération d'un premier produit (P) aura lieu et l'enzyme sera modifiée de manière covalente, donnant ainsi une nouvelle forme d'enzyme (F). Ensuite, un deuxième substrat, le substrat accepteur (B), se lie à cet intermédiaire et permet de former un deuxième produit (Q) et régénérer l'enzyme libre<sup>43</sup>. Ainsi, les deux substrats ne devraient pas être liés par l'enzyme libre en même temps, ce qui constitue une caractéristique d'un mécanisme appelé ping-pong et implique la modification

covalente de l'enzyme. Par comparaison, un mécanisme de type séquentiel ordonné (Schéma 5b) va permettre une liaison ordonnée des deux substrats (pour donner le complexe EAB), puis la libération ordonnée des deux produits sans modifier l'enzyme<sup>49</sup>.

Pour distinguer ces deux possibilités de mécanisme (d'autres possibilités dérivées du mécanisme ordonné existent<sup>49</sup>, mais ne seront pas discutées ici), il existe différentes évidences expérimentales. Ainsi, la première est la réalisation de courbes cinétiques de type Lineweaver-Burk. Ce type de courbe représente l'inverse de la vitesse de la réaction catalysée par l'enzyme en fonction de l'inverse de la concentration de substrat utilisé<sup>3</sup>. Pour la GGT, ces courbes sont faites avec différentes concentrations de substrat donneur en abscisse et à diverses concentrations fixes de substrat accepteur. Selon des équations mathématiques complexes, un patron de lignes parallèles est normalement obtenu lorsqu'il s'agit d'un mécanisme de type ping-pong contrairement à des lignes qui se croisent pour un mécanisme de type séquentiel ordonné. Des graphiques typiques sont montrés à la Figure 3.



**Figure 3.** Représentation avec des courbes de type Lineweaver-Burk des mécanismes ping-pong (a) et séquentiel ordonné (b)<sup>86</sup>.

Dans le cas de la GGT, des courbes parallèles ont été obtenues, faisant conclure à un mécanisme de type ping-pong<sup>87,88</sup>. Cependant, l'intermédiaire acyl-enzyme, formé à la suite de la liaison du substrat donneur et de la formation du premier produit, peut être dégradé par deux types de substrats accepteurs (acides

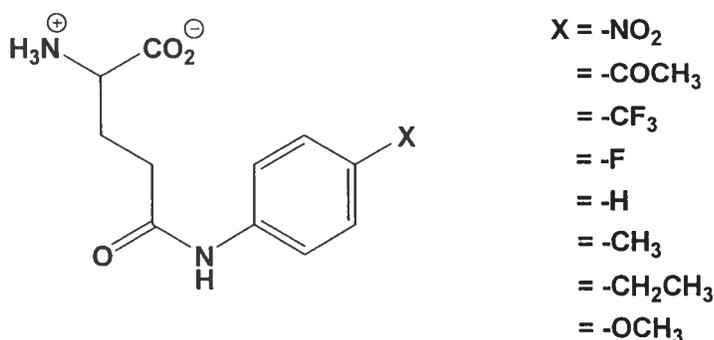
aminés et molécule d'eau), ce qui peut modifier le parallélisme des courbes selon les conditions expérimentales. De plus, il est possible de voir une inhibition de l'enzyme à de très grandes concentrations de substrats accepteurs grâce à la liaison de ceux-ci dans le site de liaison du substrat donneur<sup>43</sup>, donnant ainsi l'impression d'un mécanisme plutôt séquentiel puisqu'un graphique de type Lineweaver-Burk avec des droites convergentes est alors obtenu<sup>48</sup>.

Une deuxième évidence d'un mécanisme de type ping-pong est l'observation d'un intermédiaire enzymatique modifié de manière covalente. Ceci est la preuve qu'un produit a été libéré et qu'un deuxième substrat est nécessaire pour régénérer l'enzyme libre. Pour la GGT, la comparaison des constantes cinétiques obtenues en utilisant des mauvais et des très bons substrats accepteurs a permis de prédire la formation de ce type d'intermédiaire sans beaucoup d'évidences expérimentales<sup>88</sup>. Ensuite, la GGT a été incubée avec le glutathion, son substrat donneur *in vivo*, marqué avec un isotope <sup>14</sup>C sur son entité glutamyle et un isotope <sup>3</sup>H sur son entité glycine dans une réaction d'hydrolyse<sup>87</sup>. La réaction est arrêtée après un délai de 10 secondes grâce à de l'acide trichloroacétique. Après isolation de l'enzyme potentiellement modifiée, il y avait plus de radio-activité liée à l'isotope <sup>14</sup>C qu'à l'isotope <sup>3</sup>H, ce qui prouverait donc que l'entité  $\gamma$ -glutamyle marquée demeure liée à l'enzyme pour former un intermédiaire dans la réaction<sup>87</sup>.

Par la suite, le même groupe de recherche a modifié la GGT grâce au *N*-acétylimidazole<sup>89</sup>. Ceci a partiellement inhibé l'enzyme, mais n'a pas empêché la liaison de [glutamate-<sup>14</sup>C]glutathion de se faire afin de donner un intermédiaire acyl-enzyme. Selon les tests de stabilité effectués dans diverses conditions expérimentales, il semblerait qu'un lien amide est présent entre l'entité  $\gamma$ -glutamyle provenant du substrat donneur et l'enzyme, mais l'intermédiaire n'a pas pu être isolé. Ensuite, le même type d'expérience a été effectué par un autre groupe de recherche quelques années plus tard. Le *N*-acétylimidazole a également inhibé partiellement l'enzyme (purifiée différemment de celle de l'autre groupe de recherche) tout en effectuant un changement de conformation<sup>64</sup>. La liaison et la réactivité du substrat

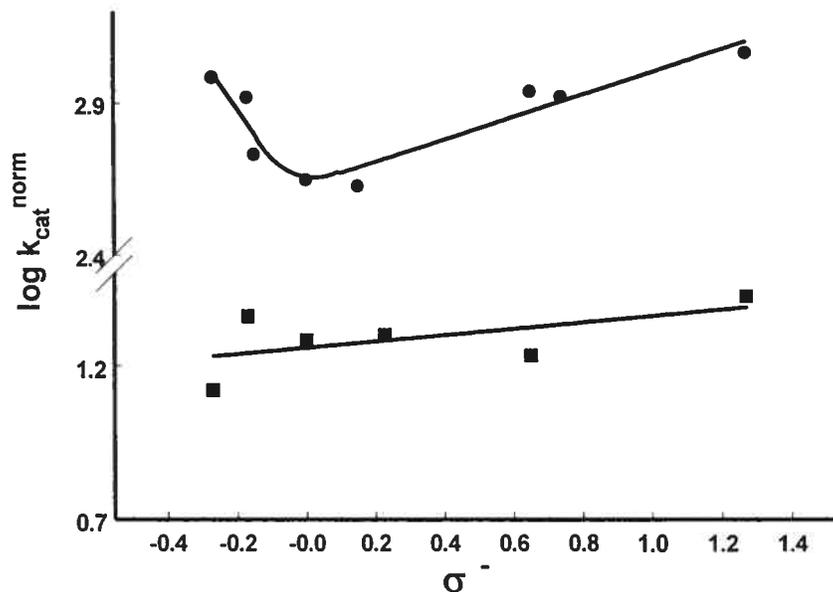
L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide ont pu être observées en suivant la libération de la *p*-nitroaniline. Cependant, la réaction enzymatique semblait complètement arrêtée après 20 secondes, aucune libération de *p*-nitroaniline n'étant plus observée. De plus, des tests de stabilité ont montré qu'un lien ester unirait le substrat et l'enzyme dans ce cas-ci. Dans ces dernières expériences, l'intermédiaire acyl-enzyme a pu être observé en « inhibant » l'enzyme et en changeant la conformation de cette dernière<sup>64</sup>. Cependant, rien n'indique que le substrat se soit lié de la même manière que dans les conditions *in vivo*. L'utilisation d'enzyme non modifiée est donc nécessaire pour parvenir à observer l'intermédiaire acyl-enzyme.

Dans le cadre d'études sur l'étape d'acylation, des substrats de type L- $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para* par des groupements électrodonneurs et électroattracteurs ont été utilisés dans notre laboratoire<sup>83</sup>. Les substrats utilisés sont représentés à la Figure 4.



**Figure 4.** Substrats donneurs de type  $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para*.

La force du lien amide clivé par la GGT est donc modifiée. Le  $pK_a$  du groupe anilinium ainsi libéré peut être transformé en paramètre  $\sigma$  de Hammett. La valeur de ce paramètre peut ensuite être modifiée afin de tenir compte de l'encombrement stérique, de l'effet inductif, de l'effet de résonance, etc<sup>90,91</sup>. Un graphique de type Hammett pour l'étude de l'étape d'acylation de la GGT a été obtenu et une courbe vers le haut a été observée, tel qu'indiqué à la Figure 5.



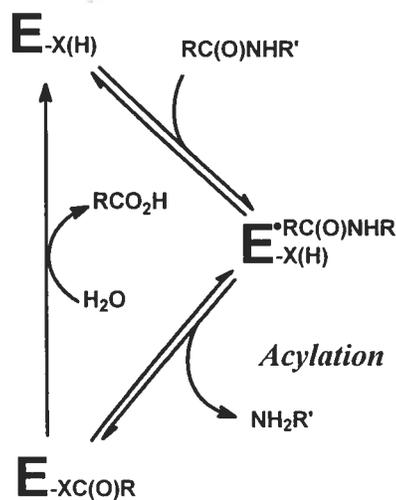
**Figure 5.** Courbe de Hammett pour la réaction de transpeptidation effectuée avec les substrats donneurs L- $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para* et le substrat accepteur Gly-Gly (●)<sup>83</sup> et pour la réaction d'hydrolyse avec les substrats donneurs de configuration D et uniquement de l'eau comme substrat accepteur (■)<sup>93</sup>.  $\sigma^-$  représente le paramètre de Hammett.

Il a donc été proposé que l'étape limitante de l'acylation dans la réaction de transpeptidation implique le bris du lien C-N. Cette forme un peu inusitée de la courbe a été expliquée par un changement de géométrie à l'état de transition de l'étape la plus lente selon les substituants en position *para* présents sur les substrats donneurs utilisés<sup>83,90,92</sup>.

La même étude a également été effectuée avec des D- $\gamma$ -glutamylanilides substitués (Figure 4) comme substrat donneur et seulement l'eau comme substrat accepteur afin d'étudier l'importance du bris du lien C-N dans la vitesse de la réaction catalysée<sup>93</sup>. Le graphique obtenu est montré à la Figure 5.

La pente de la droite représentant l'étape d'hydrolyse est de  $0,055 \pm 0,067$  et des valeurs similaires sont obtenues lorsque d'autres types de paramètres  $\sigma$  de Hammett sont utilisés<sup>93</sup>. Cette valeur, pas significativement différente de zéro, semble indiquer que l'étape limitante dans la réaction d'acylation et d'hydrolyse ne dépend pas du clivage du lien amide du substrat donneur. Il a donc été postulé que l'étape d'acylation doit être très rapide et indépendante de la nature du substituant en position *para* du substrat donneur. Il semble alors que l'étape d'acylation soit très efficace et que l'étape limitante dans cette réaction soit la décomposition de l'intermédiaire acyl-enzyme par la molécule d'eau.

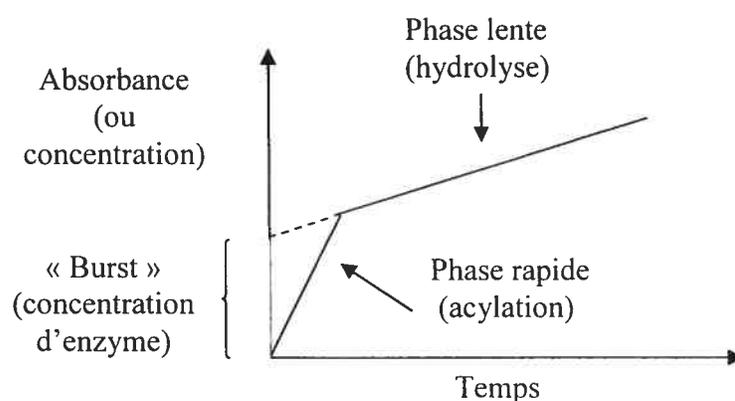
À la lumière de ces dernières expériences, il serait peut-être possible de détecter cet intermédiaire acyl-enzyme dans la réaction d'hydrolyse sans devoir passer par des modifications chimiques préalables. Cependant, ceci nécessite des techniques de suivi de la réaction à de faibles temps de réaction, en état pré-stationnaire. Le Schéma 6 représente le mécanisme proposé pour la GGT uniquement pour la réaction d'hydrolyse.



**Schéma 6.** Mécanisme ping-pong proposé pour les étapes d'acylation et d'hydrolyse catalysées par la GGT. X représente le nucléophile. R et R' sont des chaînes alkyles.

Ainsi, selon le Schéma 6 et les résultats obtenus avec la courbe de Hammett de la Figure 5, lorsque l'enzyme et les substrats sont mélangés ensemble, l'acylation

est effectuée de manière efficace. Le premier produit est alors libéré et la réaction d'hydrolyse, quoique moins efficace selon les résultats de la Figure 5, est réalisée à la moindre formation de l'intermédiaire acyl-enzyme<sup>49</sup>. La vitesse globale de la réaction dépend alors de la vitesse de l'acylation de l'enzyme. Par la suite, puisque l'hydrolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme se fait plus lentement que l'acylation de l'enzyme, l'accumulation de cet intermédiaire aura lieu. La vitesse de la réaction sera alors contrôlée par la vitesse de l'étape d'hydrolyse de celui-ci et un état stationnaire sera atteint. Un graphique de la libération du premier produit en fonction du temps permettra de voir une libération rapide au départ, puis une libération plus lente grâce à l'accumulation de l'intermédiaire acyl-enzyme. Cependant, pour voir ce type de signal, il est nécessaire d'utiliser des concentrations stœchiométriques d'enzyme. Un exemple de ce type de graphique est montré à la Figure 6.



**Figure 6.** Graphique typique obtenu en état pré-stationnaire lors de la libération rapide d'un produit, suivi par sa libération lente à la suite de l'accumulation d'un intermédiaire covalent de l'enzyme.

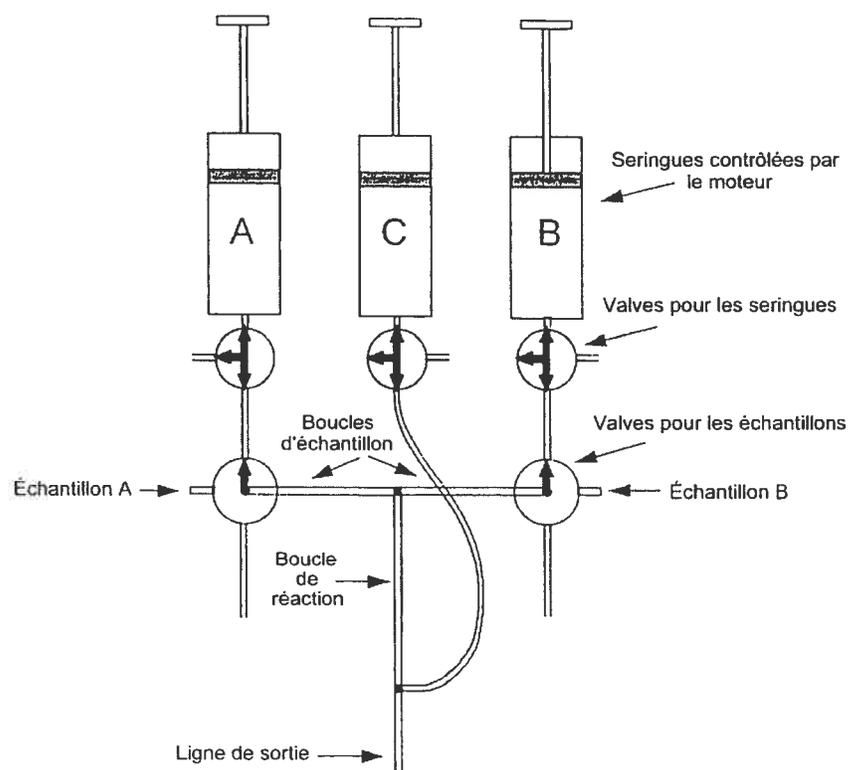
Il est possible de prolonger la droite correspondant à la phase lente jusqu'à l'axe des ordonnées. La valeur ainsi obtenue (« burst ») correspond à la concentration de l'enzyme présente dans le système sous forme d'intermédiaire acyl-enzyme, selon les équations mathématiques décrivant ce type de graphique<sup>49</sup>. Ce graphique biphasique est une preuve directe de l'existence d'un intermédiaire acyl-enzyme entre deux étapes de réaction, donc de l'existence d'un mécanisme de type ping-pong. Cependant, cette accumulation se fait souvent après quelques millisecondes de réaction enzymatique, ainsi il est nécessaire d'utiliser des appareils

suffisamment précis permettant de suivre la réaction sur une échelle de temps de l'ordre de la milliseconde. Ce type d'étude est fait depuis de nombreuses années et a permis d'obtenir plusieurs informations au niveau du mécanisme d'enzymes, le cas le plus connu étant celui de l'étude de la chymotrypsine avec le *p*-nitrophényl éthyl carbonate comme substrat donneur et l'eau comme substrat accepteur<sup>94</sup>. Ce type d'étude serait donc intéressant afin de s'assurer que la GGT agisse bien selon un mécanisme de type ping-pong.

## **2.2 Résultats**

### **2.2.1 Études à l'état pré-stationnaire avec le « rapid-mix quencher »**

Différents appareils permettent d'étudier des réactions enzymatiques à de faibles temps réactionnels. L'appareil utilisé est un mélangeur à inhibition rapide, également appelé « rapid-mix quencher ». Celui-ci permet d'arrêter une réaction enzymatique à de faibles temps de réaction<sup>95</sup>. Le « temps mort » est généralement de 2 ms. Une représentation de l'appareil se retrouve à la Figure 7.

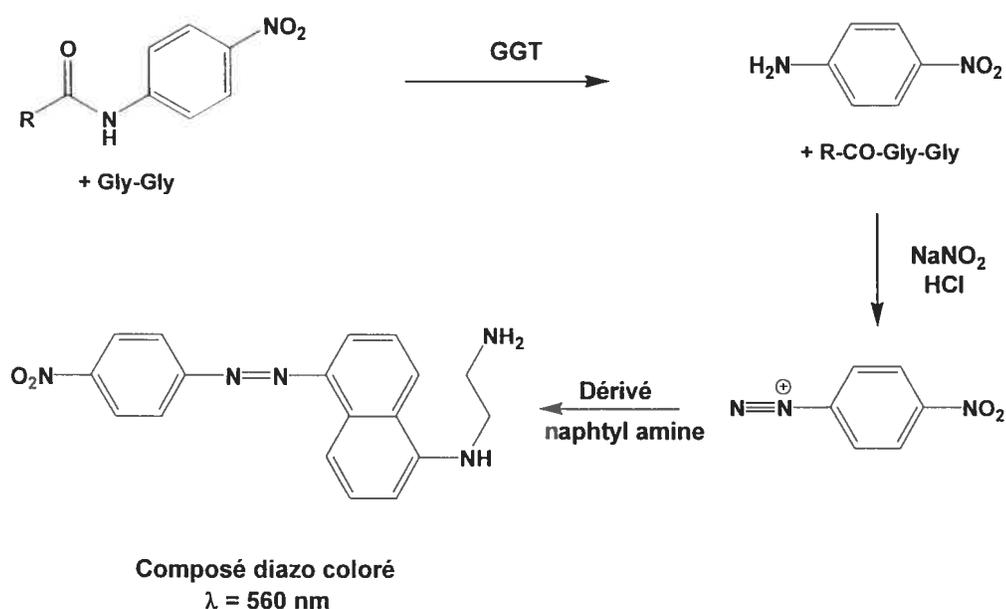


**Figure 7.** Représentation d'un mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher »)<sup>96</sup>. Les explications du fonctionnement de l'appareil se retrouvent dans le texte.

Les échantillons A et B représentent l'enzyme et le substrat donneur, respectivement, et occupent des boucles d'échantillon dont le volume est d'environ 15  $\mu\text{L}$ . Les seringues en verre A et B contiennent du tampon et la seringue C, un composé inhibant la réaction enzymatique, habituellement de l'acide trichloroacétique. Sous l'effet d'un moteur, les trois seringues en verre sont poussées simultanément<sup>96</sup>. Grâce à la bonne disposition des valves, le contenu des seringues A et B permettra aux échantillons A et B, présents dans leur boucle d'échantillon respective, de se mélanger ensemble dans la boucle de réaction. À la sortie de celle-ci, il y aura contact avec le contenu de la seringue C, ce qui arrêtera immédiatement la réaction enzymatique. Selon la longueur de la boucle de la réaction et la vitesse à laquelle les seringues sont poussées, il est possible de varier le

temps de réaction possible entre l'enzyme et le substrat avant l'inhibition de la réaction. Le mélange réactionnel est récupéré à la fin de la ligne de sortie. Cet appareil possède l'avantage de pouvoir être utilisé avec une grande variété de substrats qui ne contiennent pas nécessairement de chromophores<sup>95</sup>.

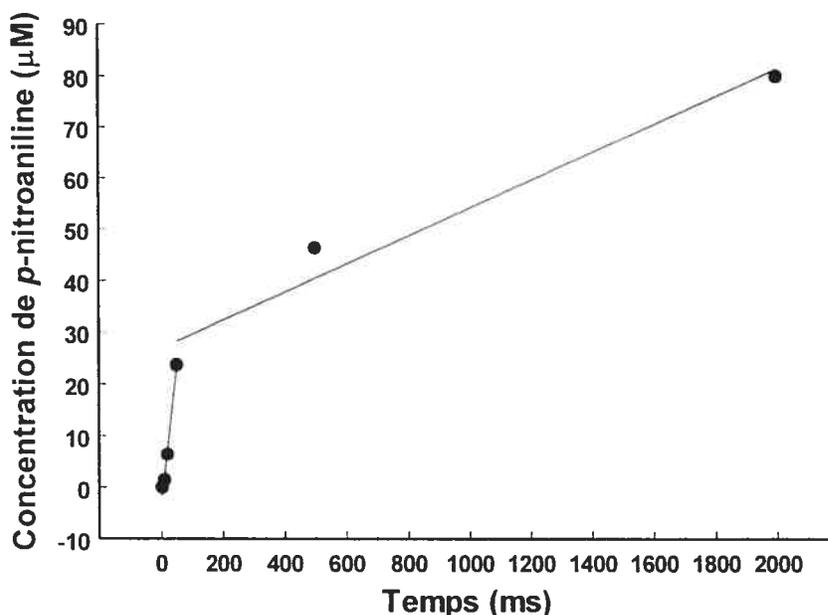
L'expérience a été effectuée en utilisant une grande concentration de GGT purifiée à partir du rein de rat et une concentration saturante de D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide. Ce substrat a été choisi parce qu'il ne peut pas être utilisé dans la réaction d'autotranspeptidation grâce à sa configuration absolue<sup>43</sup>. De plus, la *p*-nitroaniline formée au cours de la réaction enzymatique et présente dans l'échantillon récupéré à la fin de la boucle de sortie pourra être facilement dérivée pour former un nouveau composé chromophore possédant un coefficient d'extinction molaire assez élevé de  $0,057 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ <sup>83</sup> selon la méthode de dérivation par diazotation montrée au Schéma 7.



**Schéma 7.** Méthode de dérivation par diazotation de la *p*-nitroaniline libérée par la GGT. R représente l'entité  $\gamma$ -glutamyle.

Il est certain que la *p*-nitroaniline pourrait être suivie directement, mais elle possède alors un coefficient d'extinction molaire plus faible ( $0,0088 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ <sup>13</sup>), alors une plus grande quantité d'enzyme serait nécessaire afin de détecter un bon signal. Parmi tous les substrats donneurs de la Figure 4, la *p*-nitroaniline libérée, puis dérivée, est celle ayant le plus haut coefficient<sup>83</sup>.

Ainsi, des expériences de mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher ») ont été effectuées avec une concentration assez élevée de  $6,2 \mu\text{M}$  de GGT et une concentration de  $1 \text{mM}$  de substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide comme concentrations finales. Cette concentration pour le substrat donneur est bien au-delà de son  $K_M$  dans la réaction d'hydrolyse<sup>44</sup>. À des temps de réaction entre 2 et 2000 ms, la réaction est arrêtée, le mélange réactionnel est recueilli et la dérivation de la *p*-nitroaniline présente ainsi libérée est effectuée selon le protocole décrit à la section 6.1.2. Les résultats de cette expérience sont montrés à la Figure 8.



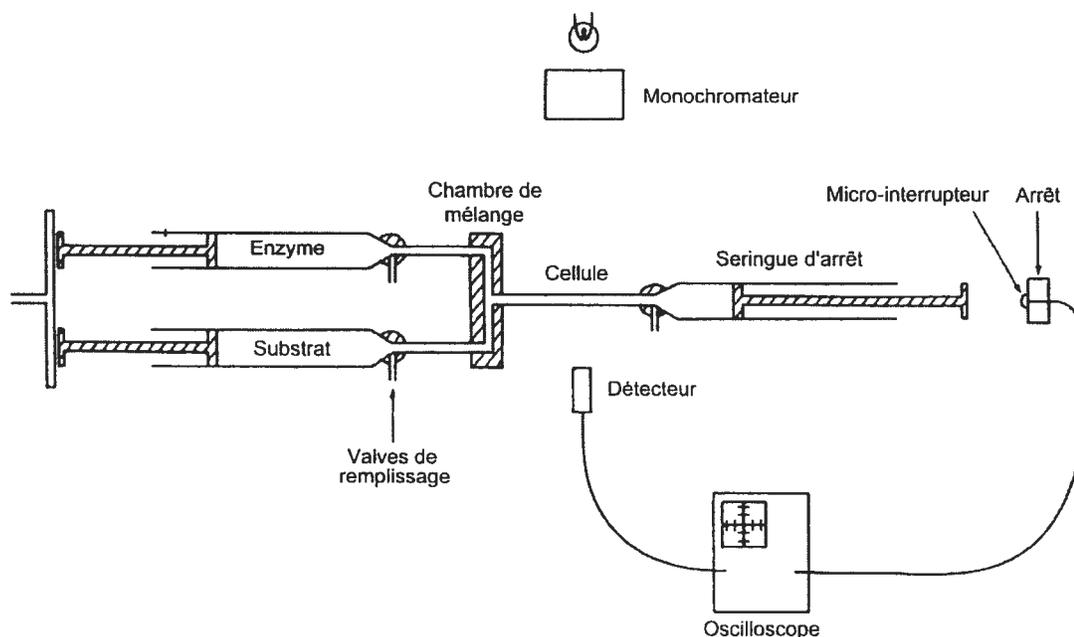
**Figure 8.** Graphique de la concentration de *p*-nitroaniline libérée par la GGT ( $6,2 \mu\text{M}$ ) à  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  en fonction du temps dans une réaction d'hydrolyse du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide ( $1 \text{mM}$ ) suivie avec un mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher »). Chaque point représente la moyenne de deux expériences.

La présence de deux phases dans cette réaction enzymatique est clairement démontrée à la Figure 8 et correspond au graphique typique montré à la Figure 6. Le changement de pente a lieu autour de 50 ms et les pentes ont des valeurs de  $k_{cat}^{norm}$  d'environ  $80 \text{ s}^{-1}$  pour la phase rapide et d'environ  $4 \text{ s}^{-1}$  pour la phase lente. Ces valeurs ont été corrigées pour l'hydrolyse chimique possible du substrat donneur. Il semble donc qu'un intermédiaire acyl-enzyme soit présent. Dans ce cas-ci, la taille du « burst » correspondant à la concentration de l'intermédiaire acyl-enzyme est d'environ  $24 \text{ }\mu\text{M}$ , soit quatre fois plus élevée que la concentration réelle de GGT utilisée. Ceci pourrait être expliqué par l'imprécision des données. En effet, plusieurs erreurs expérimentales peuvent être présentes, notamment au niveau du remplissage de chaque boucle d'échantillon et lors de la dérivation de la *p*-nitroaniline. Cette technique est également très coûteuse en terme de quantité d'enzyme utilisée pour chaque point. Ainsi, il a été impossible d'obtenir plus de valeurs que celles montrées à la Figure 8 en utilisant cet appareil.

Grâce à cette technique, il a été possible de voir une acylation rapide de l'enzyme, suivie de l'accumulation de l'intermédiaire acyl-enzyme. Cependant, une autre technique, moins coûteuse en enzyme et plus précise, permettrait d'obtenir des informations plus précises par rapport à chacune des phases de cette courbe. Un mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow ») permet de prendre des mesures de manière continue sans faire appel à une solution inhibitrice.

### 2.2.2 Études à l'état pré-stationnaire avec le « stopped-flow »

Le mélangeur à flux arrêté (également appelé « stopped-flow ») est un appareil permettant de mélanger rapidement des solutions d'enzyme et de substrat. La représentation des pièces principales de cet appareil se retrouve à la Figure 9<sup>97</sup>.



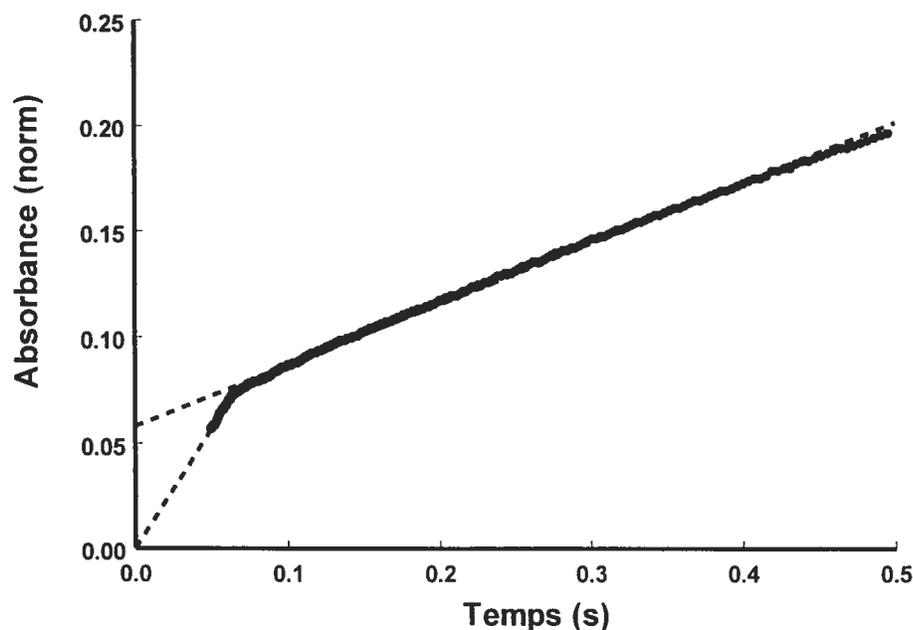
**Figure 9.** Représentation d'un mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow »)<sup>49,97</sup>. Les explications pour le fonctionnement de l'appareil se retrouvent dans le texte.

Pour le mélangeur rapide à flux arrêté (« stopped-flow »), une seringue est remplie d'enzyme et l'autre, de substrat. Ces seringues peuvent avoir différentes capacités. Lorsque l'expérience est lancée, le contenu des deux seringues est mélangé, grâce à une forte pression exercée sur les seringues, dans une chambre de mélange, puis envoyé dans une cellule liée à une seringue d'arrêt. Lorsque cette seringue est remplie, l'extrémité de son piston touche un micro-interrupteur qui va enclencher la détection du signal à mesurer dans le mélange réactionnel. Le processus prend au minimum environ 2 ms pour permettre le mélange des réactifs et le déclenchement du détecteur. Il est possible de faire des mesures d'absorbance, de fluorescence ou de dichroïsme circulaire, selon la configuration de cet appareil dans notre laboratoire. La Figure 9 représente le cas d'un détecteur pour l'absorbance. L'avantage de cette technique est la possibilité d'observer une réaction enzymatique de manière continue sur une grande échelle de temps (de l'ordre de la milliseconde à la minute) sans avoir à arrêter la réaction, comme c'est le cas dans le mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher »). Cependant, il faut généralement remplir les seringues d'échantillon et faire une série de six expériences. Les trois premières

expériences permettent habituellement de bien remplir les tubes et la chambre de mélange et les trois dernières expériences peuvent être utilisées pour l'analyse des données. Il y a donc perte d'une quantité d'enzyme, mais pas aussi grande qu'avec le mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher ») lorsque la quantité de points obtenus par chacune des techniques est comparée. Cependant, le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline est de  $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>44</sup>, ce qui est moins élevé que pour le complexe diazo formé dans l'expérience avec le mélangeur à inhibition rapide ( $57\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Cet appareil a été utilisé afin de confirmer les résultats du mélangeur à inhibition rapide montrés à la Figure 8 et pour obtenir des résultats plus précis de manière continue. Pour y parvenir, la seringue pour l'enzyme, d'une capacité de 1 mL, a été remplie avec une solution de GGT faite dans un tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 pour une concentration de  $8,8 \mu\text{M}$ . La seringue pour le substrat, d'une capacité de 0,1 mL, a quant à elle été remplie d'une solution de  $6,64 \text{ mM}$  de D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide. Le choix des seringues répond à plusieurs critères. Lors d'une poussée effectuée par l'appareil, la chambre de mélange doit totalement se remplir afin d'éliminer le mélange réactionnel présent auparavant et afin de s'assurer que la réaction enzymatique effectuée puisse bien être détectée par l'appareil. Le volume de la seringue d'arrêt étant de  $150 \mu\text{L}$ , il est impossible d'utiliser deux seringues de 0,1 mL pour les échantillons et faire une série de six expériences du même coup sans devoir remplir à nouveau les seringues. À la suite du mélange du contenu des deux seringues (dans un rapport de 10:1), les concentrations finales pour l'enzyme et le substrat sont de  $8,0 \mu\text{M}$  et de  $604 \mu\text{M}$  respectivement. Dans le cas du substrat donneur, un problème d'insolubilité a rendu impossible l'obtention de la même concentration que celle utilisée dans l'expérience avec un mélangeur à inhibition rapide (1 mM). Cependant, cette concentration demeure tout de même très largement supérieure à la valeur du  $K_M$  pour ce substrat dans la réaction d'hydrolyse<sup>44</sup>.

Ces expériences ont été effectuées en triplicata. Un résultat typique obtenu est représenté à la Figure 10.



**Figure 10.** Graphique typique de l'absorbance à 410 nm de la *p*-nitroaniline libérée par la GGT (8,0  $\mu\text{M}$ ) à 37 °C en fonction du temps par une réaction d'hydrolyse du substrat *D*- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (604  $\mu\text{M}$ ) suivie de manière continue par un mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow »).

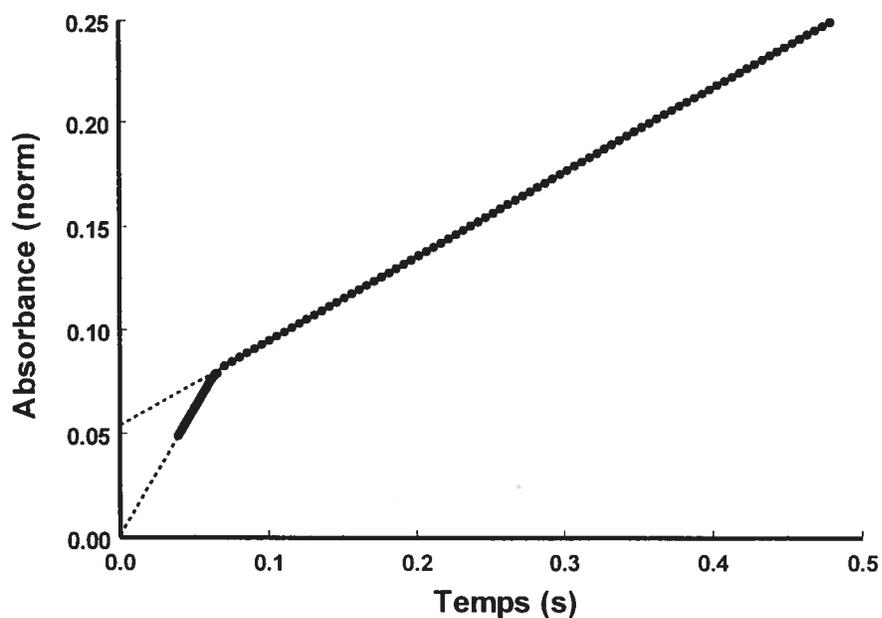
Sur l'axe des ordonnées, la valeur de l'absorbance a été normalisée afin de tenir compte de l'absorbance de l'enzyme et du substrat donneur à cette longueur d'onde. Il est possible de constater qu'il y a, comme dans le cas de la Figure 8, deux phases bien distinctes dans l'expérience utilisant le mélangeur à flux arrêté. Ceci confirme donc l'existence de l'intermédiaire acyl-enzyme. Ensuite, le changement de phase survient autour de 65 ms et les pentes de chacune des droites possèdent des valeurs de  $k_{cat}^{norm}$  de  $(50 \pm 5)$  et de  $(14 \pm 2)$   $\text{s}^{-1}$  pour les phases rapide et lente, respectivement. Ces résultats représentent la moyenne de trois expériences effectuées dans différentes séries d'essais (voir la section 6.1.2.2). Il est possible de remarquer à la Figure 10 que les premières données sont disponibles à partir

d'environ 50 ms. Ceci est dû en grande partie à la grosseur des seringues utilisées pour faire les expériences. La seringue de 0,1 mL est très petite et flexible. Sous l'effet de la poussée exercée par l'appareil, un problème d'équilibre entre les différents réactifs est possible dû au rapport 10:1 des deux seringues. De plus, la poussée doit avoir un effet différent sur ces deux types de seringue, ce qui mène à un délai plus grand que le 2 ms normalement observé<sup>98</sup>.

Les résultats obtenus ici se comparent très bien avec des résultats préalablement obtenus dans le laboratoire lors d'études en état stationnaire. Ainsi, lorsque le même substrat donneur est utilisé en présence de concentrations saturantes de glycyglycine, l'un des meilleurs substrats accepteurs utilisés avec la GGT<sup>43</sup>, l'étape d'acylation est limitante. La réaction entre l'enzyme libre et ce substrat donneur dans ces conditions donne une valeur de  $k_{cat}^{norm}$  de  $297 \text{ s}^{-1}$ , ce qui est six fois plus élevé que la valeur obtenue avec le mélangeur à flux arrêté pour l'étape d'hydrolyse<sup>93</sup>. Cependant, il est difficile de savoir si la glycyglycine a réellement un effet sur la liaison du substrat donneur avec la GGT ou si la différence obtenue n'est pas assez grande. Une étude en présence d'un substrat accepteur est nécessaire et sera montrée un peu plus loin. Des expériences ont été effectuées en état stationnaire pour déterminer la vitesse d'hydrolyse en présence du D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide sur une échelle de temps en minutes. Une valeur de  $k_{cat}^{norm}$  de  $14 \text{ s}^{-1}$  a été obtenue, ce qui se compare très bien à la valeur obtenue pour la phase lente à la Figure 10 ( $14 \text{ s}^{-1}$ )<sup>93</sup>. De plus, la prolongation de la phase lente jusqu'à l'axe des ordonnées donne une taille de « burst » d'environ  $(6,3 \pm 1,3) \mu\text{M}$ , ce qui correspond assez bien à la concentration d'enzyme utilisée dans l'expérience ( $8,0 \mu\text{M}$ ).

Ces expériences ont donc démontré l'accumulation d'un intermédiaire acyl-enzyme covalent pour la réaction d'hydrolyse. Il serait intéressant de vérifier si cette accumulation se fait également en présence d'un substrat accepteur. En effet, dans le cas de l'étape de désacylation par aminolyse, il est possible que le mécanisme soit totalement différent et passe par le déplacement direct de l'entité *p*-nitroaniline par le

groupement  $\alpha$ -ammonium libre du substrat accepteur. Le substrat accepteur L-méthionine a été utilisé afin de refaire l'expérience en état pré-stationnaire. Il s'agit d'un des meilleurs acides aminés pouvant agir comme substrat accepteur<sup>43</sup>. De plus, il n'a pas beaucoup d'affinité pour le site de liaison du substrat donneur, ce qui empêche les résultats d'être faussés par cette liaison non désirée. La concentration de L-méthionine utilisée dans l'expérience est de 0,3 mM. Cette concentration est beaucoup plus faible que le  $K_M$  de ce composé (4,7 mM<sup>87</sup>), ce qui permet de s'assurer que l'étape d'acylation sera rapide et l'étape de désacylation, assez lente. Dans le cas contraire, il aurait été impossible d'observer l'intermédiaire acyl-enzyme à de faibles temps de réaction. Ainsi, si l'intermédiaire est formé, il sera possible de le voir. De plus, cette concentration sera probablement suffisante pour donner une réaction plus rapide que l'hydrolyse de base tout de même toujours présente. La même expérience que dans le cas de l'hydrolyse est effectuée, mais une concentration de 0,3 mM de L-méthionine est également présente dans la seringue du substrat donneur, afin d'étudier la réaction de transpeptidation. Un résultat typique obtenu est présenté à la Figure 11.



**Figure 11.** Graphique typique de l'absorbance de la *p*-nitroaniline à 410 nm libérée par la GGT (8,0  $\mu$ M) à 37 °C en fonction du temps par une réaction de transpeptidation du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (604  $\mu$ M) et du substrat accepteur L-méthionine (0,3 mM) suivie de manière continue par un mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow »).

Comme il est possible de le constater, il y a toujours accumulation de l'intermédiaire acyl-enzyme grâce à la présence de deux phases distinctes sur le graphique directement obtenu du mélangeur à flux arrêté. Le Tableau IV aide à mieux comparer les valeurs des pentes obtenues pour les réactions d'hydrolyse et de transpeptidation.

**Tableau IV.** Constantes cinétiques  $k_{cat}^{norm}$  obtenues pour les phases rapide et lente des réactions d'hydrolyse et de transpeptidation de la GGT en présence du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et divers substrats accepteurs à pH 8,0 et à 37 °C.

Substrat accepteur	Phase rapide : $k_{cat}^{norm}$ (s <sup>-1</sup> )	Phase lente : $k_{cat}^{norm}$ (s <sup>-1</sup> )	Taille du « burst » ( $\mu$ M)
H <sub>2</sub> O (hydrolyse)	50 $\pm$ 5	14 $\pm$ 2	6,3 $\pm$ 1,3
L-méthionine (0,3 mM) (transpeptidation)	54 $\pm$ 10	19 $\pm$ 1	6,0 $\pm$ 1,2

Ainsi, les constantes cinétiques de la phase rapide sont similaires, quelque soit la réaction catalysée. Ceci concorde avec le fait que cette étape correspondrait à l'acylation de l'enzyme libre avec le substrat donneur qui se réalise de la même manière quelque soit la nature du substrat accepteur présent. La phase lente, quant à elle, correspondrait à la désacylation de l'enzyme, que ce soit par hydrolyse ou par aminolyse. Les résultats montrent une différence selon le substrat accepteur utilisé. Il est connu que l'aminolyse est effectuée plus rapidement que l'hydrolyse<sup>43</sup>, ce qui est confirmé ici. Les mêmes concentrations d'enzyme étaient présentes dans les deux séries d'expérience, ce qui est montré ici par la taille du « burst » qui correspond très bien à la concentration d'enzyme utilisée. Ainsi, il semble que l'intermédiaire acyl-enzyme peut s'accumuler, même en présence d'un substrat accepteur. L'implication par rapport au mécanisme ping-pong sera discutée dans la prochaine section.

### 2.3 Discussion

Plusieurs expériences ont été effectuées afin de démontrer plus clairement l'existence d'un intermédiaire acyl-enzyme dans le mécanisme de la GGT, ce qui confirmerait le mécanisme ping-pong proposé. En effet, les évidences jusqu'à maintenant se limitent à des courbes presque parallèles sur un graphique de type Lineweaver-Burk et à l'utilisation d'inhibiteur non spécifique (*N*-acétylimidazole) pour obtenir une enzyme modifiée dont la réactivité est différente de l'enzyme native.

Afin d'obtenir des évidences plus directes, des études en état pré-stationnaire, à de faibles temps réactionnels, ont été effectuées. Celles-ci permettent de voir l'existence de cet intermédiaire grâce à un graphique biphasique typique montré à la Figure 6.

Le mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher ») a été utilisé pour obtenir ce type de graphique. L'avantage de cette technique est la possibilité de détecter la libération d'un produit de diverses manières. Dans notre cas, une dérivation de la *p*-nitroaniline avec un dérivé naphthylamine a permis d'obtenir un complexe diazo dont le coefficient d'extinction molaire est élevé, limitant ainsi la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir un graphique biphasique. Cependant, les multiples manipulations à effectuer et l'erreur due au remplissage des seringues à chaque réaction effectuée rendent les valeurs beaucoup plus imprécises. Cette technique a donc permis de détecter l'intermédiaire acyl-enzyme accumulé à partir d'environ 50 ms. Il y aurait donc acylation rapide de l'enzyme avec le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide, suivie par l'hydrolyse lente de l'intermédiaire acyl-enzyme. Ceci constitue donc une preuve de l'existence de cet intermédiaire pour la première fois sans l'utilisation d'enzyme modifiée chimiquement.

Afin d'obtenir des valeurs beaucoup plus précises pour chacune des phases de ce type de graphique, des études utilisant le mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow ») ont été effectuées. En présence d'eau comme unique substrat accepteur, une courbe biphasique a été obtenue, confirmant ainsi les résultats provenant de l'expérience avec le mélangeur à inhibition rapide. Les valeurs des phases rapide (acylation) et lente (hydrolyse) se comparent très bien entre les deux techniques, confirmant ainsi l'existence de l'intermédiaire acyl-enzyme. Les différences entre les deux courbes peuvent être dues aux erreurs expérimentales principalement présentes dans l'expérience avec le mélangeur à inhibition rapide. De plus, d'autres points autour de 50 ms au cours de cette expérience auraient permis de préciser le changement de phase observé. Les expériences effectuées avec un mélangeur à flux arrêté sont beaucoup plus précises, reproductibles et se sont avérées moins dispendieuses en enzyme.

Une expérience en état pré-stationnaire, mais en présence de L-méthionine comme substrat accepteur en plus de l'eau, a permis d'obtenir des informations quant à l'étape de désacylation. La Figure 11 montre un graphique biphasique, confirmant ainsi pour cette étape également l'accumulation de l'intermédiaire acyl-enzyme. La concentration de L-méthionine utilisée n'était pas suffisamment élevée pour changer l'étape limitante de l'enzyme, ni pour inhiber l'enzyme en se liant au site de liaison du substrat donneur<sup>43</sup>. Les valeurs de  $k_{cat}^{norm}$  obtenues pour la phase rapide sont identiques pour les réactions d'hydrolyse et d'aminolyse. Ceci confirme bien l'hypothèse que cette phase correspond à l'acylation rapide de l'enzyme libre par le substrat donneur. Cette étape est bien la même, quelque soit la nature du substrat accepteur présent. Il ne semble donc pas y avoir une participation de la part du substrat accepteur dans la liaison du substrat donneur au cours de cette étape. La valeur de  $k_{cat}^{norm}$  pour la phase lente de l'aminolyse est plus élevée que pour l'étape d'hydrolyse, confirmant ainsi d'autres résultats obtenus préalablement dans le groupe de recherche<sup>93</sup>.

La taille du « burst » correspond normalement à la concentration d'enzyme utilisée dans l'expérience. Celle-ci se retrouve, dans la phase lente, principalement sous forme d'intermédiaire acyl-enzyme. Le Tableau IV montre bien que ce « burst » est similaire dans les expériences d'hydrolyse et d'aminolyse et correspond assez bien à la concentration d'enzyme de l'expérience. Cependant, il a déjà été remarqué que cette concentration pouvait parfois ne pas correspondre parfaitement si le rapport de la vitesse des deux phases n'était pas très grand<sup>49</sup>. Ainsi, l'enzyme possède un taux de roulement (« turnover ») assez rapide au niveau de la deuxième réaction, ce qui se traduit par des molécules d'enzyme qui ne sont pas sous forme d'intermédiaire acyl-enzyme. Dans le cas présenté ici, le rapport des vitesses n'est que d'environ 3,5 fois pour la réaction d'hydrolyse. Ceci pourrait expliquer la légère différence remarquée entre la concentration de protéine mesurée par un test de Bradford et la taille du « burst », mais celle-ci n'est peut-être pas suffisamment importante pour s'y attarder.

Ainsi, ces expériences confirment pour la première fois de manière directe et continue l'existence de l'intermédiaire acyl-enzyme sans modifier préalablement l'enzyme. En effet, l'accumulation de cet intermédiaire est une preuve directe d'un mécanisme de type ping-pong. Il est certain que des expériences avec le substrat donneur glutathion à la place du D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide pourraient donner des informations plus précises pour la réaction effectuée *in vivo* par la GGT, mais ces deux substrats sont reconnus pour agir de manière très similaire<sup>13</sup>. Afin d'y parvenir, des expériences de mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher ») permettraient d'obtenir un mélange réactionnel inhibé pouvant être analysé par HPLC. Un autre projet dans le groupe vise justement à détecter les produits de la réaction enzymatique de la GGT en présence du substrat donneur glutathion grâce à cette technique<sup>51</sup>. De plus, il serait intéressant d'identifier le résidu marqué ainsi par le substrat donneur. Encore une fois, des études avec le mélangeur à inhibition rapide permettraient de recueillir de l'enzyme sous forme d'intermédiaire covalent et d'effectuer des digestions enzymatiques et de la spectrométrie de masse afin d'identifier ce résidu. Il est fort probable que la thréonine en position *N*-terminale de la petite sous-unité agisse comme nucléophile<sup>74</sup> et soit ainsi marquée par les expériences en état pré-stationnaire. Ce type d'expérience est en cours dans le groupe de recherche.

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article pour une édition spéciale du *Journal of Physical Organic Chemistry* sur les applications biologiques de la physico-chimie organique dédiée à W.P. Jencks<sup>99</sup>.

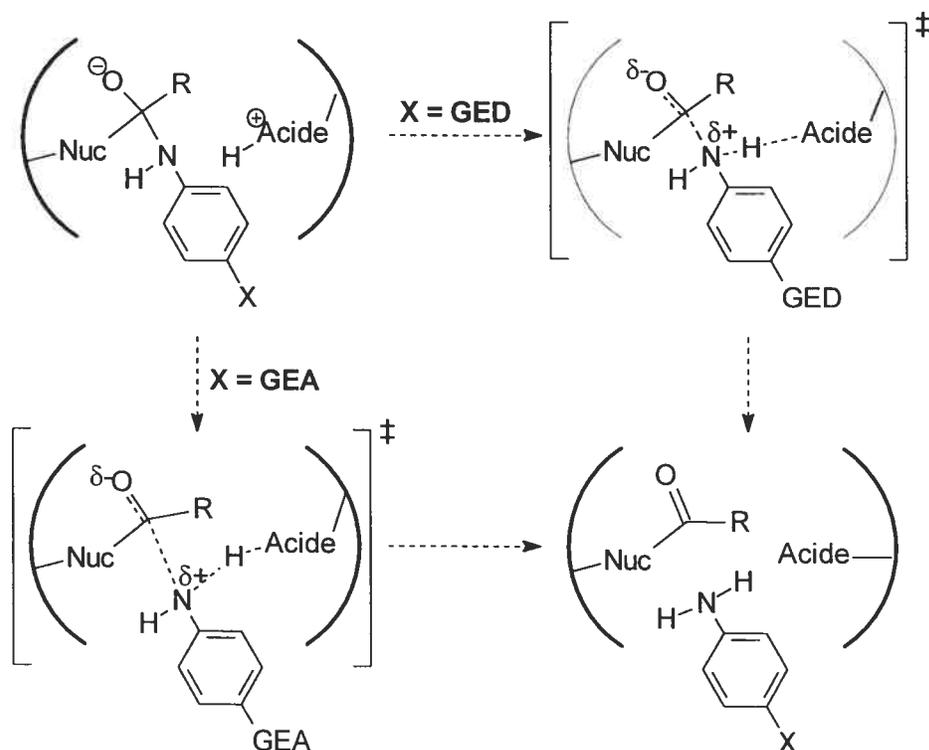
## **CHAPITRE 3**

### **Élucidation du mécanisme de l'étape de désacylation**

### 3.1 Introduction

Comme il a été décrit au chapitre 1, la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase est impliquée dans plusieurs réactions et désordres physiologiques. Cependant, peu d'informations sont disponibles quant à son rôle exact dans ceux-ci, donc il est important de connaître son mécanisme catalytique en détail. Le chapitre 2 a déjà permis de préciser la nature du mécanisme ping-pong modifié de la GGT en démontrant l'existence de manière directe d'un intermédiaire acyl-enzyme covalent.

Cette étude du mécanisme doit également se poursuivre de manière détaillée au niveau des étapes d'acylation et de désacylation de la réaction de transpeptidation de la GGT. Déjà, l'étape d'acylation a été étudiée en détail dans notre groupe de recherche grâce à une approche utilisant la physico-chimie organique avec des substrats donneurs de type L- $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para* par des groupements électrodonneurs et électroattracteurs<sup>83</sup>. La vitesse de la catalyse de ces composés en fonction du paramètre  $\sigma^-$  de Hammett (lié au  $pK_a$ ) du groupement anilinium ainsi libéré par l'enzyme a permis de tracer une courbe de Hammett biphasique (Figure 5, chapitre 2). De plus, des études d'effets isotopique du solvant, de pH et de température ont permis de proposer un mécanisme détaillé où l'étape limitante dans l'acylation est le bris de l'intermédiaire tétraédrique menant à la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme et à la libération d'un premier produit, tel que montré au Schéma 8.



**Schéma 8.** Mécanisme proposé pour l'étape d'acylation de la réaction de transpeptidation catalysée par la GGT entre des substrats donneurs de type L- $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para* et le substrat accepteur glycylglycine. Nuc représente le nucléophile de la GGT, X, un groupement en position *para*, R, l'entité  $\gamma$ -glutamyle, GED, un groupement électrodonneur et GEA, un groupement électroattracteur.

Il a été proposé que le clivage du lien C-N entre l'entité  $\gamma$ -glutamyle et le groupement aniline substitué en position *para* se fasse de manière concertée à la protonation du groupe partant. Si un groupement électroattracteur est présent, à l'état de transition, le clivage du lien C-N sera bien avancé (le lien sera long) et la protonation sera défavorisée (lien N-H long). Dans le cas contraire, l'état de transition sera formé par deux liens très courts. Ce changement de géométrie à l'état de transition explique la forme peu commune de la courbe de Hammett (biphasique). Ces informations ont permis pour la première fois de proposer un mécanisme détaillé pour cette réaction et ainsi comprendre un peu mieux le fonctionnement de la GGT au niveau physiologique<sup>83</sup>.

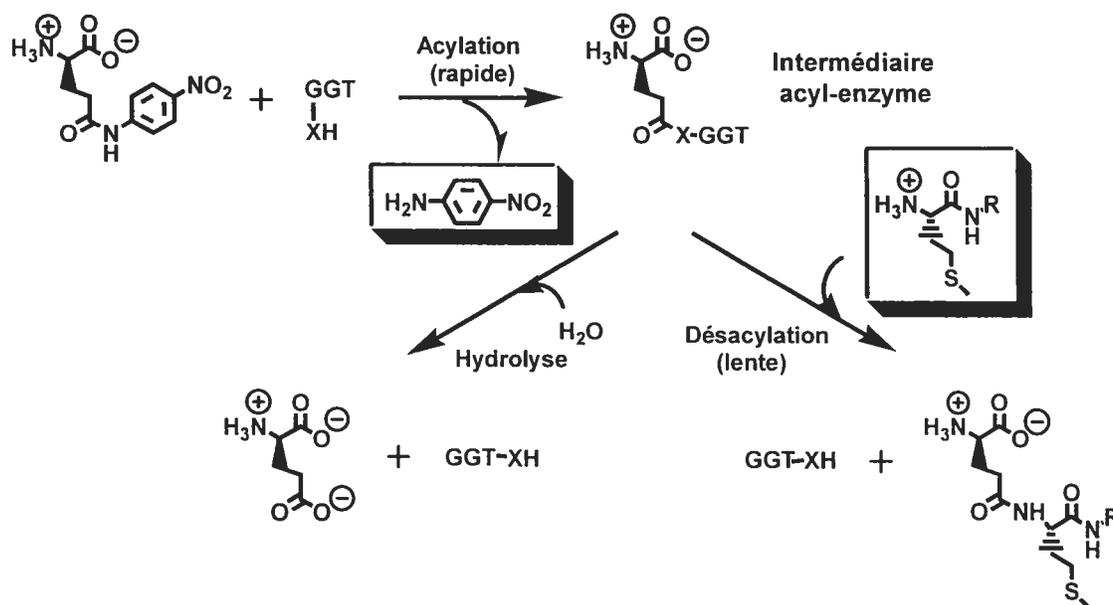
Cependant, peu d'études ont été effectuées sur l'étape de désacylation. Il est vrai que l'étape d'acylation ressemble aux autres protéases, ce qui peut expliquer l'étude exhaustive effectuée pour cette étape. Pourtant, seulement quelques enzymes sont capables de catalyser cette réaction de transpeptidation avec des amines comme substrat accepteur. Dans la classe d'enzyme EC 2.3.2.-, une enzyme nommée transglutaminase, notamment impliquée dans la coagulation sanguine<sup>100</sup>, la maladie d'Alzheimer<sup>101</sup> et la maladie céliaque<sup>102</sup>, est capable de catalyser cette deuxième réaction en transférant une entité glutamine d'une protéine ou d'un peptide sur une lysine d'une deuxième protéine ou un peptide<sup>100</sup>, créant ainsi un lien isopeptidique. Les protéases, plus étudiées, ne font généralement que le transfert d'un groupement acyle sur des molécules d'eau. Les enzymes effectuant de la transpeptidation méritent donc un peu plus d'attention afin de mieux connaître leur mécanisme pour la désacylation par aminolyse et ainsi bien comprendre l'implication de cette réaction dans leur rôle physiologique.

Jusqu'à maintenant, pour la GGT, les études de l'étape de désacylation ont plutôt porté sur la nature des substrats accepteurs généralement acceptés par l'enzyme. À ce chapitre, les dipeptides sont généralement mieux reconnus que les acides aminés libres<sup>43</sup>, ce qui est probablement dû à un  $pK_a$  plus faible pour le groupement  $\alpha$ -ammonium libre des dipeptides, conduisant à une meilleure désacylation par aminolyse<sup>103</sup>. Également, il a été proposé que les dipeptides occuperaient mieux tout l'espace du site de liaison du substrat accepteur, leur donnant ainsi une meilleure affinité pour l'enzyme<sup>103</sup>. Quelque soit le substrat accepteur, il doit être de configuration absolue L pour être reconnu<sup>104</sup>.

Nous désirons étudier plus en détail l'étape de désacylation de la GGT. En effet, des informations notamment quant à la nature de l'étape limitante dans cette réaction, le mouvement de protons et la nature d'autres substrats accepteurs pouvant être utilisés sont nécessaires pour une bien meilleure compréhension du mécanisme.

Des études impliquant des concepts de physico-chimie organique peuvent permettre l'accès à ce type d'informations.

Afin d'étudier l'étape de désacylation à partir de l'intermédiaire acyl-enzyme, il est possible de synthétiser des substrats accepteurs dont le  $pK_a$  du nucléophile est varié. Un graphique de type Brønsted, où la vitesse de la réaction de désacylation est mesurée en fonction du  $pK_a$  du substrat accepteur utilisé, permettra de mieux connaître l'étape limitante dans cette réaction. La méthodologie proposée dans le cas d'un substrat accepteur dérivé de la L-méthionine est représentée au Schéma 9.



**Schéma 9.** Méthodologie utilisée pour l'étude des étapes de désacylation (aminolyse) et d'hydrolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme. X représente l'hétéroatome du nucléophile de la GGT (possiblement un oxygène)<sup>74</sup> et R, une chaîne alkyle.

L'utilisation d'un substrat donneur en concentrations saturantes permettra la réalisation de l'étape d'acylation de manière très rapide par l'enzyme et l'accumulation de celle-ci sous forme d'intermédiaire acyl-enzyme. Par la suite, cet intermédiaire pourra être dégradé grâce à un substrat accepteur, comme une L-méthionine modifiée ou tout autre composé pouvant agir comme tel, pour l'étape

de désacylation dans le processus de transpeptidation, ou grâce à une molécule d'eau pour l'étape d'hydrolyse. Si les concentrations de substrat accepteur utilisées sont assez faibles, la dégradation de cet intermédiaire sera plus lente que sa formation, permettant ainsi, d'avoir la désacylation comme étape limitante. Ainsi, la libération de la *p*-nitroaniline du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide sera effectuée à la même vitesse que l'étape la plus lente, soit la dégradation de cet intermédiaire. Il n'est alors pas nécessaire de suivre spécifiquement la libération du deuxième produit formé. Cependant, la *p*-nitroaniline libérée peut provenir de l'aminolyse (alcoololyse ou thiololyse, selon le substrat accepteur utilisé) et/ou de l'hydrolyse de l'intermédiaire covalent. Une étude détaillée des constantes cinétiques obtenues sera donc nécessaire afin de séparer l'effet de chacune des réactions. La synthèse des différents substrats accepteurs utilisés, leur utilisation dans des études cinétiques et l'implication des résultats obtenus au niveau du rôle physiologique de la GGT seront présentées dans les prochaines sections.

## **3.2 Résultats**

### **3.2.1 Évaluation de différents types de substrats accepteurs**

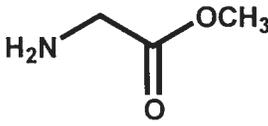
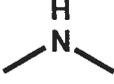
Jusqu'à présent, il est connu que les acides aminés et les dipeptides sont de bons substrats accepteurs pour la GGT<sup>43</sup>. Cependant, qu'en est-il des amines primaires, des alcools et des thiols ? Serait-il possible de dégrader différemment l'intermédiaire acyl-enzyme, ce qui pourrait donner des informations intéressantes quant au rôle physiologique de la GGT ? Certains de ces composés ont été testés afin de mieux connaître la structure minimale nécessaire à une bonne liaison dans le site de liaison du substrat accepteur de la GGT et du type de nucléophile nécessaire pour attaquer l'intermédiaire acyl-enzyme.

#### **3.2.1.1 Amines comme substrat accepteur**

Il a été proposé que les amines primaires pourraient agir comme substrat accepteur, mais seulement dans le cas de la GGT de plante<sup>7</sup>. Il serait donc intéressant

de pousser un peu plus loin cette étude pour voir si cette caractéristique s'applique également à la GGT de rat. Une série d'amines ayant différentes valeurs de  $pK_a$  a été testée et la vitesse de « transpeptidation » par rapport à celle d'hydrolyse a été comparée. Les résultats se retrouvent au Tableau V.

**Tableau V.** Vitesse de catalyse du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (1 mM) en présence de 25 mM de différentes amines comme substrat accepteur à pH 8,0 et à 37 °C après correction pour la vitesse d'hydrolyse enzymatique.

Numéro du composé	Amine testée	Vitesse obtenue ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$pK_a$
(3)		0,53	5,64 <sup>114</sup>
(5)		1,96	7,92 <sup>114</sup>
(4)		1,58	9,70 <sup>114</sup>
(1)	$\text{H}_3\text{C}-\text{NH}_2$	0,69	10,62 <sup>105</sup>
(2)		0,57	10,77 <sup>105</sup>

Cette gamme d'amines n'est pas très grande, mais elle a permis d'observer quelques tendances. Pour débiter, la vitesse indiquée est celle obtenue avec 25 mM de l'amine pouvant agir comme substrat accepteur. D'autres concentrations fixes ont été testées (tel que décrit au chapitre 6), mais aucune saturation du site de liaison du substrat accepteur n'a été observée, même en variant les concentrations d'amines jusqu'à 100 mM. Alors, aucune valeur de  $K_M$  n'a pu être déterminée. Ainsi, une concentration fixe a été choisie afin de pouvoir mieux comparer les résultats. La vitesse obtenue pour une amine primaire telle la méthylamine (1) ou pour une amine

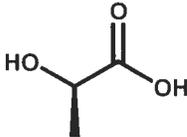
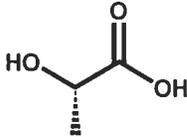
secondaire telle la diméthylamine (2) est la même, ce qui indique fort probablement que la différence d'encombrement stérique n'est pas très importante. Lorsque le  $pK_a$  de l'amine est varié, il y a une faible différence de réactivité, comme le montrent les résultats de l'aminonitrile (3) et du 2-(éthylthio)éthylamine (4). Ces valeurs sont beaucoup plus faibles que celle pouvant être obtenue avec la glycyglycine, l'un des meilleurs substrats accepteurs de la GGT, qui est de 414 mM/min<sup>43,54</sup>. Il est possible que l'absence d'un groupement  $\alpha$ -carboxylate nuise à la réaction de la molécule. Ainsi, la glycine méthyl ester (5) a été testée. Ce composé a permis d'obtenir une vitesse supérieure aux autres composés et a montré une tendance vers une saturation du site de liaison du substrat accepteur. Cependant, une valeur de  $K_M$  n'a pas pu être déterminée, dû à la présence d'inhibition effectuée par ce composé lorsqu'il va probablement se lier dans le site de liaison du substrat donneur à de plus hautes concentrations, empêchant le substrat donneur de se lier. Ceci rappelle l'inhibition que la glycine peut également faire lorsqu'elle est utilisée comme substrat accepteur<sup>43</sup>.

Il semble donc que les amines n'agissent pas réellement comme substrat accepteur pour la GGT de rat, mais plutôt comme un nucléophile aminé pouvant réagir avec l'intermédiaire acyl-enzyme dans un type de catalyse chimique. La vitesse de catalyse n'est également pas très élevée lorsqu'elle est comparée à d'autres substrats accepteurs de la GGT. D'autres composés sont donc testés comme substrats accepteurs, notamment les alcools.

### 3.2.1.2 Alcools comme substrat accepteur

Il a déjà été démontré que la GGT pouvait agir comme estérase. En effet, cette enzyme est capable de catalyser le bris du lien ester dans le composé L- $\gamma$ -glutamyléthyl ester<sup>55</sup>. Ainsi, par réversibilité microscopique, il est possible de penser que la GGT pourrait également utiliser des dérivés alcools comme substrat accepteur. Des alcools simples et des alcools ayant une structure similaire à un acide aminé ont été testés et les résultats sont montrés au Tableau VI.

**Tableau VI.** Effet obtenu par l'utilisation d'alcools simples et d'alcools ayant une structure similaire à un acide aminé sur la vitesse d'hydrolyse par la GGT du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (1 mM) à 37 °C et à pH 8,0.

Numéro du composé	Alcool testé	Effet obtenu (par rapport à l'hydrolyse) <sup>a</sup>	pK <sub>a</sub>
(6)	Méthanol (CH <sub>3</sub> -OH)	N/o <sup>b</sup>	15,5 <sup>106</sup>
(7)	Éthanol (CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH)	N/o	15,5 <sup>106</sup>
(8)	2,2,2-Trifluoroéthanol (CF <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH)	N/o	12,4 <sup>107</sup>
(9)	<i>n</i> -Propanol (CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH)	N/o	Entre 15 et 19 <sup>108</sup>
(10)	Isopropanol ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-OH)	N/o	Entre 15 et 19 <sup>108</sup>
(11)	<i>Tert</i> -butanol ((CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-OH)	N/o	19 <sup>108</sup>
(12)		N/o	Entre 15 et 19 <sup>108</sup>
(13)		Inhibition de la réaction d'hydrolyse	Entre 15 et 19 <sup>108</sup>

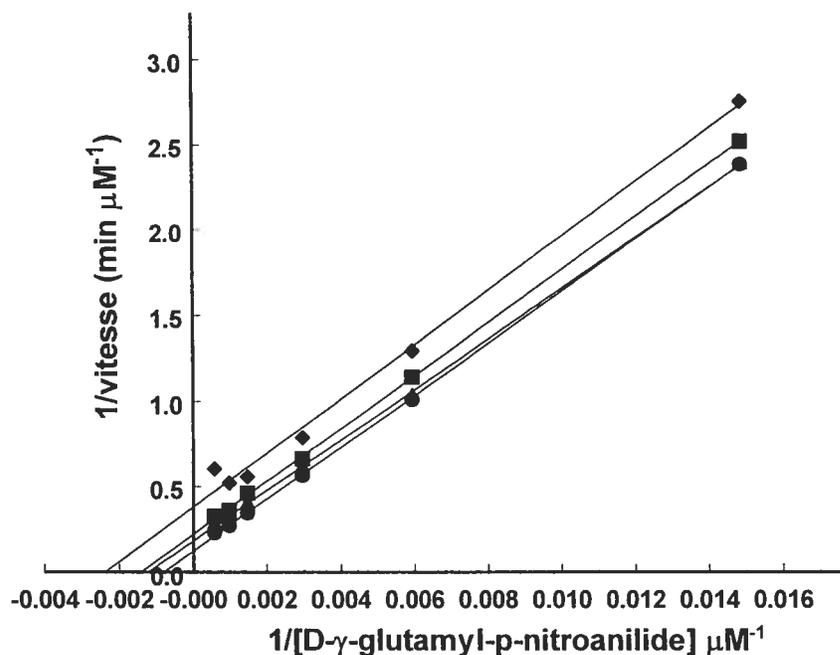
<sup>a</sup> L'effet a été obtenu pour des concentrations allant de 0,2 à 2,5 M.

<sup>b</sup>N/o : aucune différence de vitesse observée en absence et en présence de l'alcool.

Pour commencer, la réaction d'hydrolyse enzymatique a été utilisée comme référence. Il est possible de penser qu'un site de liaison pour une molécule d'eau puisse exister, quoique peu probable dans une enzyme où la réaction principale n'est pas l'hydrolyse<sup>43</sup>. Ainsi, il est possible qu'une molécule de méthanol (6), où le groupement hydroxyle est plus nucléophile que dans le cas d'une molécule d'eau, puisse remplacer une partie des molécules d'eau et accélérer la vitesse par alcoololyse. Cependant, cela n'a pas été le cas, aucune différence notable n'ayant été observée en

présence de méthanol. Les autres molécules testées, telles l'éthanol (7), le *n*-propanol (9), l'isopropanol (10) et le *tert*-butanol (11), ont donné des résultats similaires. Un changement notable de  $pK_a$  a été effectué en testant le 2,2,2-trifluoroéthanol (8) sans plus de succès. Ainsi, il semble que ces alcools ne soient pas de bons substrats accepteurs puisqu'ils n'arrivent pas à accélérer la vitesse d'hydrolyse en effectuant de l'alcoolyse. Cependant, il est possible que ce manque de réactivité soit dû à une mauvaise reconnaissance par l'enzyme ou par une très grande solvation de la molécule, ce qui conduit à une incapacité pour la molécule de se lier, même partiellement, à l'enzyme<sup>109</sup>.

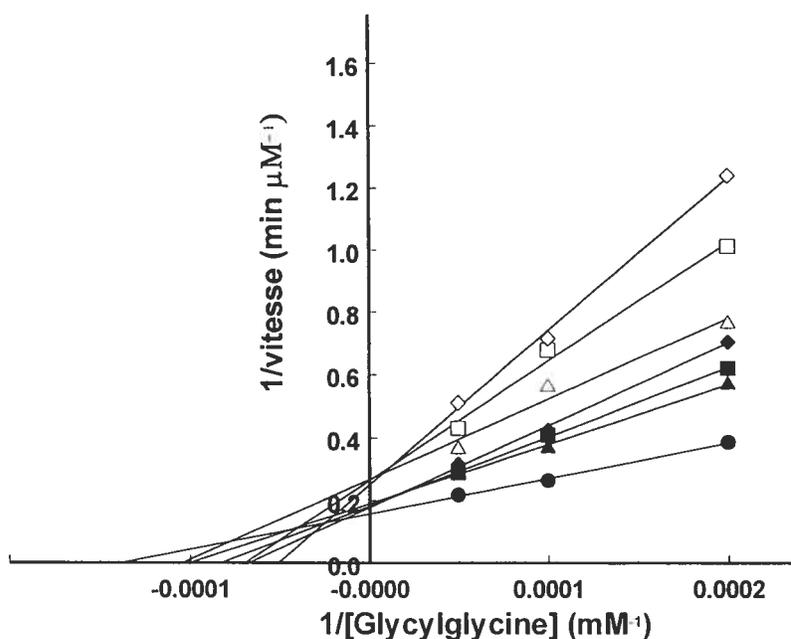
Certains alcools, tel l'acide lactique (12-13), possèdent la même structure qu'un acide aminé. Cependant, le groupement  $\alpha$ -ammonium est remplacé par un groupement  $\alpha$ -hydroxyle. L'acide lactique est l'alcool correspondant à l'acide aminé alanine, avec un groupement  $-CH_3$  comme chaîne latérale. Ce dernier composé a été testé dans la réaction d'hydrolyse et a montré, pour la configuration absolue L, une inhibition de l'hydrolyse, tel qu'indiqué au Tableau VI. Par la suite, ces composés ont été utilisés comme inhibiteurs de la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et le substrat accepteur glycylglycine. Différents patrons d'inhibition sont possibles, selon le substrat dont la concentration est maintenue constante. Ainsi, dans un premier cas, le substrat accepteur est présent à des concentrations saturantes et la concentration du substrat donneur varie. En présence de concentrations fixes d'acide L-lactique (13), un graphique de type Lineweaver-Burk est obtenu et est représenté à la Figure 12.



**Figure 12.** Graphique de type Lineweaver-Burk de la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et le substrat accepteur glycyglycine (20 mM) en présence de différentes concentrations fixes de l'acide L-lactique (**13**) à pH 8,0 et à 37 °C. (●) 0 mM de l'acide L-lactique, (▲) 7,5 mM, (■) 12,5 mM et (◆) 20 mM.

Ce patron de lignes parallèles est reconnu comme représentant une inhibition de type incompétitif<sup>49</sup>. Ce type d'inhibition signifie que l'inhibiteur se lie à une forme d'enzyme déjà liée à un substrat. Ainsi, l'inhibiteur se lie après le substrat dont la concentration est variée, donc le substrat donneur dans cette expérience. De plus, il est possible de déterminer une constante d'inhibition pour le phénomène observé. La manipulation des équations mathématiques représentant ce type de courbe a permis de trouver une valeur de constante d'inhibition  $K_i$  de 6,02 mM.

Le même type d'expérience, où le substrat donneur est en concentrations saturantes et le substrat accepteur, à des concentrations variables, est effectué. En présence de différentes concentrations du composé agissant comme inhibiteur, le graphique de type Lineweaver-Burk représenté à la Figure 13 est obtenu.



**Figure 13.** Graphique de type Lineweaver-Burk de la réaction de transpeptidation entre le substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (1 mM) et le substrat accepteur glycylglycine en présence de différentes concentrations fixes de l'acide L-lactique (13) à pH 8,0 et à 37 °C. (●) 0 mM de l'acide L-lactique, (▲) 12,5 mM, (■) 15 mM, (◆) 17,5 mM, (△) 20 mM, (□) 22,5 mM et (◇) 25 mM.

Ce patron de lignes convergentes près de l'axe des ordonnées est un indice de la présence d'une inhibition de type compétitif. Cela signifie que l'inhibiteur et le substrat dont la concentration est variée compétitionnent pour le même site. Dans ce cas-ci, cela signifie que l'acide L-lactique et la glycylglycine compétitionnent pour le même site de liaison. Encore une fois, des manipulations mathématiques des données cinétiques ont permis d'obtenir une constante d'inhibition  $K_i$  de 4,45 mM.

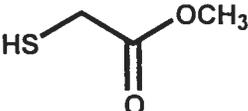
Selon les informations obtenues dans cette série d'expérience en présence de l'acide L-lactique (13), il semble que cet alcool, incapable d'accélérer la réaction d'hydrolyse, est tout de même capable de se lier à l'enzyme, probablement grâce à sa grande ressemblance avec la structure de l'acide aminé L-alanine. Afin de confirmer cette hypothèse, l'acide D-lactique (12) a également été testé. Il est connu que les

acides aminés de la configuration absolue D ne sont pas reconnus par la GGT comme substrat accepteur<sup>43</sup>. Ainsi, en refaisant les mêmes expériences effectuées plus tôt en présence de l'acide D-lactique, aucune inhibition n'a été observée, même en utilisant des concentrations allant jusqu'à 75 mM. Il semble donc que l'acide L-lactique, avec sa structure contenant un centre chiral et un groupement  $\alpha$ -carboxylate, possède tous les éléments nécessaires afin de bien se lier à l'enzyme. Cependant, il semble incapable de réagir en tant que nucléophile. Ces résultats seront discutés plus en détail dans la section 3.3.

### 3.2.1.3 Thiols comme substrat accepteur

Les thiols sont reconnus pour être beaucoup plus nucléophiles que les alcools<sup>110</sup>. Ainsi, afin de voir s'il est possible d'obtenir de la thiolysé de l'intermédiaire acyl-enzyme, l'utilisation d'une série de thiols a été effectuée. Les résultats obtenus sont montrés dans le Tableau VII.

**Tableau VII.** Vitesse de catalyse effectuée par la GGT du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (1 mM) en présence de 25 mM de différents thiols à pH 8,0 et à 37 °C après correction pour la vitesse d'hydrolyse enzymatique.

Numéro du composé	Thiol utilisé	Vitesse obtenue ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$\text{p}K_a$
(14)		2,74	10,5 <sup>108</sup>
(15)		0,75	9,88 <sup>111</sup>
(16)		0,15	7,95 <sup>111a</sup>

<sup>a</sup> Cette valeur correspond à l'éthyl 2-mercaptoacétate qui est probablement très près de celle du composé 16.

L'éthanethiol (14) a montré une vitesse surprenante de thiolysé, mais aucune saturation du site de liaison de l'enzyme n'a été obtenue, même en allant à des concentrations élevées de l'ordre de 150 mM. Dans le cas du méthyl

2-mercaptoacétate (**16**), un composé analogue à la glycine méthyl ester (**5**) montrée au Tableau V, l'efficacité est beaucoup plus faible que le composé aminé parent, mais il y a tout de même attaque nucléophile. Dans le cas du  $\beta$ -mercaptoéthanol (**15**), une attaque nucléophile plus efficace que l'eau a eu lieu, mais celle-ci est loin de l'efficacité pouvant être obtenue avec les dérivés aminés. Cependant, ce composé s'est montré plus efficace que l'éthanol qui n'avait eu aucune réaction dans l'étape d'hydrolyse. Il semble donc que les dérivés thiols soient un peu plus nucléophiles que les dérivés alcools, mais moins efficaces que les amines, ce qui pourrait être expliqué par plusieurs raisons qui seront discutées un peu plus loin.

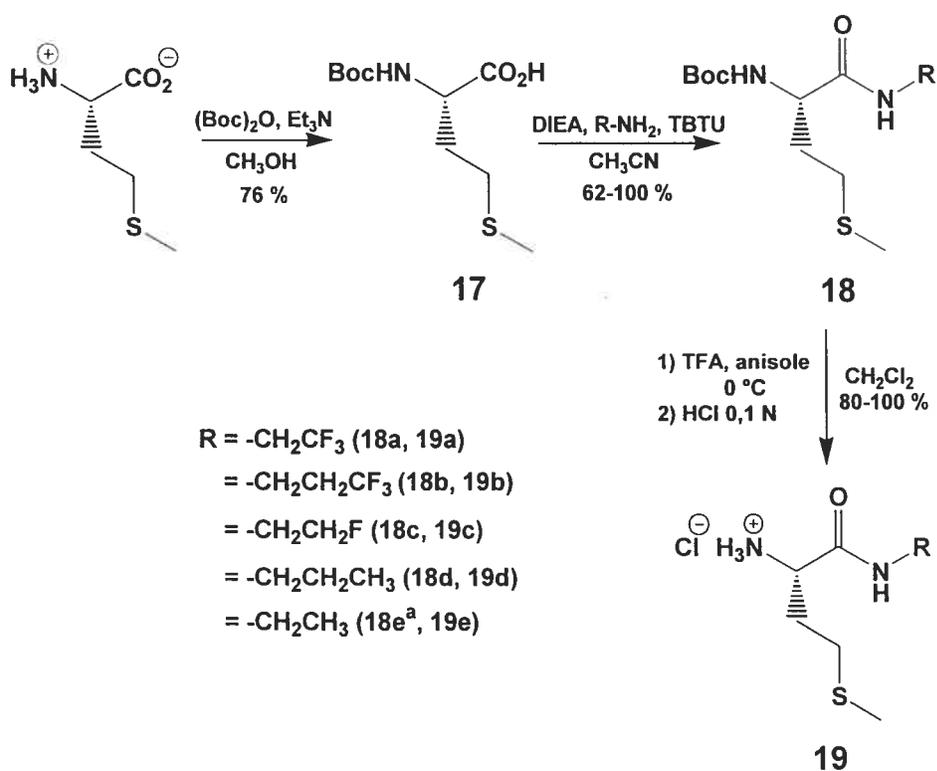
Plusieurs dérivés ont donc été essayés afin d'explorer d'autres substrats accepteurs différents des acides aminés pour la GGT. Cependant, il semble que des acides aminés agissent mieux comme substrat accepteur. La synthèse de dérivés de la L-méthionine et leur étude cinétique dans la réaction de transpeptidation seront décrites dans les sections suivantes.

### 3.2.2 Synthèse des substrats accepteurs

Le choix du type de substrat accepteur utilisé s'appuie sur plusieurs critères. Puisque les amines primaires ne semblent pas être des substrats accepteurs pour la GGT de mammifère<sup>43</sup>, un acide aminé simple a été choisi. Celui-ci peut être couplé à diverses amines, contenant des groupements électroattracteurs, au niveau du groupement  $\alpha$ -carboxylate pour donner une fonction amide secondaire. Ainsi, un effet au niveau du  $pK_a$  du groupement  $\alpha$ -ammonium de l'acide aminé sera possible. Les dipeptides pourraient agir comme de meilleurs substrats accepteurs, mais ceux-ci seraient plus difficiles à modifier. Ensuite, parmi les meilleurs acides aminés agissant comme substrat accepteur, se retrouvent la L-cystine, la L-glutamine, la L-méthionine et la L-alanine<sup>43</sup>. Parmi ceux-ci, la L-méthionine a été choisie parce que son  $K_M$  comme substrat accepteur est de 4,7 mM<sup>87</sup>, ce qui se compare avantageusement aux meilleurs substrats accepteurs dipeptidiques de la GGT<sup>43</sup>. De plus, elle ressemble à la cystéine présente dans le glutathion et se lierait au même

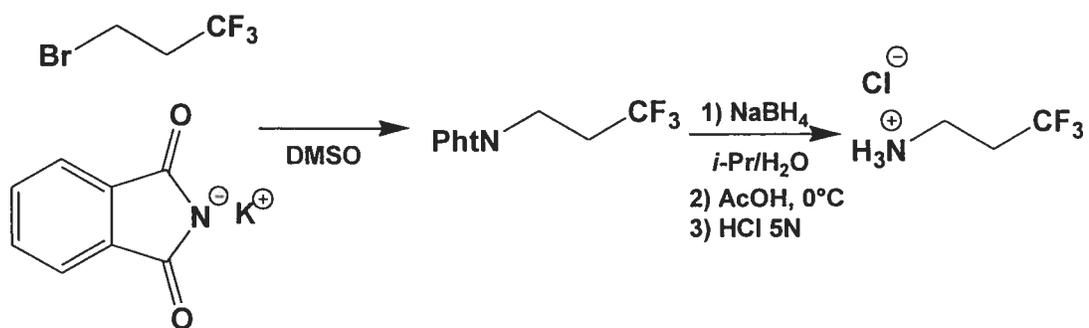
endroit, le deuxième sous-site de liaison du substrat donneur. Aussi, il est connu que la L-méthionine se lie très peu dans le site de liaison du substrat donneur (sa constante d'inhibition  $K_i$  pour sa liaison dans ce site est de  $26,9 \text{ mM}^{43}$ ), ainsi des concentrations aussi élevées que  $25 \text{ mM}$  du substrat accepteur peuvent être utilisées sans avoir d'effet secondaire dû à une liaison non désirée.

La synthèse de dérivés de la L-méthionine a donc été effectuée selon le Schéma 10. Les détails expérimentaux se retrouvent au chapitre 6.



**Schéma 10.** Synthèse des dérivés de la L-méthionine couplée avec diverses amines. a) Le dérivé **18e** a plutôt été synthétisé par 1) *p*-nitrophényl chloroformate, DMAP, triéthylamine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, puis 2) éthylamine, THF, 0 °C (69 %).

L'amine utilisée pour former le composé **18b**, la 3,3,3-trifluoropropylamine, n'était pas disponible commercialement. Elle a été synthétisée selon les réactions représentées au Schéma 11. Les détails expérimentaux étant identiques à ceux de la littérature<sup>112</sup>, ils ne sont pas rapportés dans le chapitre 6.



**Schéma 11.** Synthèse de la 3,3,3-trifluoropropylamine<sup>112</sup>.

Les synthèses des Schémas 10 et 11 ont été effectuées avec succès. L'intermédiaire *N-tert*-butoxycarbonyl-L-méthionine a pu être synthétisé en grande quantité sans problème pour faire les réactions subséquentes. Les couplages effectués entre cet intermédiaire et les diverses amines ont bien fonctionné en présence de l'agent de couplage TBTU et de la DIEA en tant que base. Le couplage s'est avéré moins efficace dans le cas du composé **18b** (62 %). Le dérivé **18e** n'a pas pu être synthétisé de la même manière que les autres composés. En effet, l'éthylamine dissoute dans du THF, vendue commercialement, est utilisée. Malgré une grande concentration de celle-ci, le couplage n'a pas fonctionné avec les conditions TBTU/DIEA. Une activation avec le *p*-nitrophényl chloroformate<sup>113</sup>, suivie de l'attaque de cet ester activé par la solution d'éthylamine a permis d'obtenir le produit avec un rendement moyen. Les déprotections du groupement protecteur *tert*-butoxycarbonyle se sont avérées presque quantitatives pour tous les composés synthétisés. Les caractéristiques des composés *N-tert*-butoxycarbonyl-L-méthionylpropylamide et L-méthionyléthylamide synthétisés correspondent bien à celles décrites dans la littérature. Ainsi, les dérivés de la L-méthionine devant servir comme substrats accepteurs ont été synthétisés avec succès. Les conditions expérimentales n'ont pas été optimisées puisqu'une quantité suffisante de composé a pu être obtenue pour effectuer les caractérisations et les cinétiques enzymatiques. Un autre composé, le L-méthioninamide (R = H, **19f**) a été acheté et est utilisé comme substrat accepteur au même titre que les autres dérivés synthétisés.

### 3.2.3 Titrage des substrats accepteurs

La détermination du  $pK_a$  du groupement  $\alpha$ -ammonium de chacun des substrats accepteurs synthétisés a été réalisée à l'aide d'un autotitrateur. Une solution de 0,2 N de chacun des substrats accepteurs est faite dans 55 mM de KCl. La solution de KCl a été choisie pour représenter environ la même force ionique que celle présente au cours des cinétiques enzymatiques<sup>3</sup> car ceci peut grandement influencer la détermination du  $pK_a$  du groupement  $\alpha$ -ammonium<sup>49</sup>. Le titrage est effectué avec une solution de 0,1 N NaOH sous le contrôle de l'autotitrateur. Les résultats obtenus, en duplicata, sont présentés au Tableau VIII.

**Tableau VIII.** Valeur du  $pK_a$  du groupement  $\alpha$ -ammonium de la série de substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine.

Numéro du composé	Substrat accepteur	Structure de la partie variable (R sur Schéma 10)	$pK_a$ du groupement $\alpha$ -ammonium <sup>a</sup>
(19a)	L-méthionyl(2,2,2-trifluoroéthylamide)	CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	7,09
(19b)	L-méthionyl(3,3,3-trifluoropropylamide)	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	7,30
(19c)	L-méthionyl(2-fluoroéthylamide)	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	7,37
(19d)	L-méthionylpropylamide	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	7,40
(19e)	L-méthionyléthylamide	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	7,41
(19f)	L-méthioninamide	H	7,50

<sup>a</sup> L'erreur expérimentale sur ces valeurs est de 0,01 unité, obtenue selon un duplicata des expériences.

L'utilisation de l'autotitrateur permet d'obtenir des valeurs de  $pK_a$  de manière très précise. Il existe des logiciels permettant de calculer ces valeurs théoriquement, mais celles-ci ont une erreur assez grande et ne tiennent pas compte de la force ionique du milieu. Ainsi, une détermination expérimentale s'est avérée un meilleur

choix. Il est possible de constater que les différents substrats accepteurs utilisés ne couvrent pas un large intervalle de valeurs de  $pK_a$ . L'effet inductif produit par les groupements électroattracteurs de l'amide est faible, dû à la distance séparant le groupement  $\alpha$ -ammonium et la fonction amide. Aussi, d'autres amines auraient pu être utilisées dans les réactions de couplage, mais des contraintes stériques auraient été incorporées, provoquant possiblement une mauvaise interprétation dans les résultats, notamment au niveau de l'affinité des composés avec la GGT. Les valeurs obtenues avec l'autotitrateur sont cependant assez précises (erreur de 0,01 unité sur les valeurs).

### 3.2.4 Études cinétiques de l'étape de désacylation

Plusieurs expériences témoins ont été effectuées afin de s'assurer que les résultats cinétiques soient dus à la désacylation par aminolyse de l'enzyme, et non à une autre réaction secondaire. Pour débiter, il faut s'assurer que l'étape limitante est bien la désacylation (par aminolyse ou par hydrolyse) de l'intermédiaire acyl-enzyme. Pour y parvenir, comme il est inscrit à la section 3.2.2, un acide aminé seul est utilisé comme substrat accepteur. La L-méthionine est un bon substrat accepteur ( $V_{MAX}/K_M = 12 \text{ min}^{-1}$ ), mais beaucoup moins que la glycyglycine, le dipeptide généralement utilisé dans les tests d'activité ( $V_{MAX}/K_M = 140 \text{ min}^{-1}$ )<sup>43</sup>. Les valeurs de  $V_{MAX}/K_M$  correspondent à l'efficacité catalytique de l'enzyme (ici, l'intermédiaire acyl-enzyme) pour un substrat<sup>86</sup>. Ainsi, la L-méthionine est beaucoup moins efficace. De plus, le substrat donneur utilisé est le D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide. Ce substrat, en concentrations saturantes, a été montré comme étant capable d'acyler l'enzyme au bout d'environ 65 ms dans les réactions d'aminolyse et d'hydrolyse, tel que déterminé par des études à l'état pré-stationnaire à la section 2.2.2 du précédent chapitre. Ainsi, si les données cinétiques sont cumulées après 65 ms (ce qui est le cas en état stationnaire), elles proviennent de la dégradation de l'intermédiaire acyl-enzyme, donc de l'aminolyse et de l'hydrolyse de celui-ci. Il a également été démontré par d'autres groupes que l'hydrolyse était l'étape limitante lorsque ce substrat donneur était utilisé<sup>61</sup>. Ce substrat est de configuration absolue D,

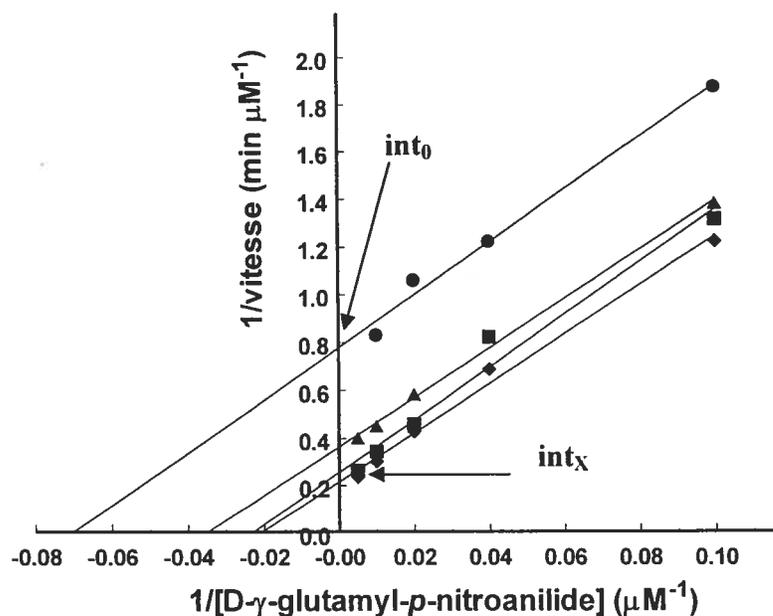
et non L, afin d'éviter tout risque d'autotranspeptidation<sup>13</sup>. Enfin, les concentrations de substrat accepteur utilisées sont plus faibles que leur  $K_M$  (ce qui a été confirmé au cours de l'étude), ainsi les données cinétiques proviennent de la réaction désirée et non de l'étape d'acylation de l'enzyme.

Afin d'étudier l'étape de désacylation par aminolyse, il faut s'assurer de bien analyser les données cinétiques. En effet, la libération de la *p*-nitroaniline peut également se faire par hydrolyse, d'où la nécessité de pousser un peu plus l'analyse des données obtenues, comme il est expliqué au chapitre 6. Une série de cuvettes avec des concentrations croissantes du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide sont préparées. La catalyse de ce substrat par la GGT est suivie par spectrophotométrie UV-Vis à 410 nm. Les résultats obtenus sont utilisés pour réaliser un graphique de type Lineweaver-Burk représentant l'hydrolyse du substrat donneur. Par la suite, les mêmes cuvettes sont préparées, mais en présence d'une concentration fixe du substrat accepteur étudié. Plusieurs concentrations de substrat accepteur sont utilisées, ce qui donne d'autres courbes Lineweaver-Burk. Ce type de graphique correspond à l'équation (1) suivante :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_h(1 + [B]/K_i)}{V_h[A]} + \frac{1 + [B]/K_b}{V_h(1 + [B]/K_{iab})} \quad (1)$$

où  $K_{iab}$  est la constante de partage et correspond à  $(K_b V_h)/V_b$ ,  $v$  est la vitesse initiale mesurée,  $[A]$  est la concentration du substrat donneur,  $[B]$  est la concentration du substrat accepteur,  $V_h$  est la vitesse maximale pour la réaction d'hydrolyse,  $V_b$  est la vitesse maximale de la transpeptidation,  $K_h$  est la constante de Michaelis pour l'hydrolyse,  $K_b$  est la constante de Michaelis pour le substrat accepteur et  $K_i$  est la constante d'inhibition probablement due à la liaison du substrat accepteur dans le site de liaison du substrat donneur<sup>43</sup>.

Un exemple typique des résultats obtenus est montré à la Figure 14.

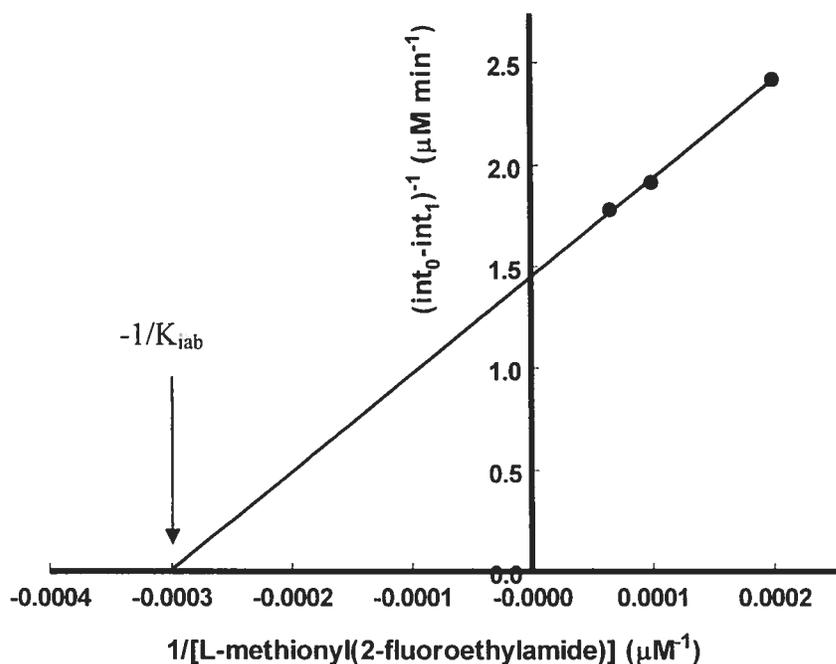


**Figure 14.** Graphique Lineweaver-Burk de la vitesse de transpeptidation du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide en absence et en présence de différentes concentrations du substrat accepteur L-méthionyl(2-fluoroéthylamide) (**19c**) à pH 8,0 et à 37 °C. (●) 0 mM du substrat accepteur, (▲) 5 mM, (■) 10 mM et (◆) 15 mM.  $int_0$  correspond à l'ordonnée à l'origine pour la réaction d'hydrolyse et  $int_x$ , pour la réaction de transpeptidation à une concentration du substrat accepteur.

Selon la Figure 14, il est clair que les droites sont parallèles. En regardant l'équation 1, ceci est possible si la valeur de  $K_i$  est très grande, c'est-à-dire s'il n'y a peu ou pas d'inhibition effectuée par le substrat accepteur. Le parallélisme des courbes nous permet donc de dire que les concentrations de substrat accepteur utilisées ne sont pas suffisamment grandes pour créer des réactions secondaires, ce qui confirme que les valeurs cinétiques pourront être étudiées sans faire plus de corrections.

Ce type de courbe a été obtenu pour chacun des substrats accepteurs utilisés. Ensuite, la valeur de l'ordonnée à l'origine pour la réaction d'hydrolyse (0 mM substrat accepteur) est nommée  $int_0$  tandis que la valeur de l'ordonnée pour chacune des autres courbes obtenues est nommée  $int_x$ , le X correspondant à la concentration

de substrat accepteur utilisé. Il est possible de tracer un graphique de  $(int_0 - int_x)^{-1}$  en fonction de  $[substrat\ accepteur]^{-1}$ . Ce graphique de type double réciproque a été obtenu pour chacun des substrats accepteurs et un exemple est représenté à la Figure 15.



**Figure 15.** Courbe secondaire de l'inverse de la différence de l'ordonnée à l'origine entre la réaction d'hydrolyse et la réaction de transpeptidation en fonction de l'inverse de la concentration du substrat accepteur L-méthionyl(2-fluoroéthylamide) (19c), selon les valeurs obtenues à la Figure 14. L'inverse de la constante de partage est identifié.

Ce type de graphique permet principalement d'obtenir une valeur d'abscisse à l'origine correspondant à  $-1/K_{iab}$ . Comme il a été décrit plus tôt, le  $K_{iab}$ , ou constante de partage, est équivalent à  $(K_b V_h)/V_b$ . L'ordonnée à l'origine d'un graphique de type Lineweaver-Burk correspond à l'inverse de la vitesse maximale de la réaction<sup>86</sup>. Ainsi, l'inverse de la valeur de  $int_0$  est la vitesse maximale d'hydrolyse, ou  $V_h$ . Cette valeur étant connue, il est possible, à partir de la constante de partage, de connaître la valeur de  $V_b/K_b$ . Cette valeur correspond à l'efficacité catalytique de la GGT pour un substrat accepteur bien spécifique dans l'aminolyse. En effet, tous les paramètres

concernant la réaction d'hydrolyse se retrouvent dans le  $V_b$ , alors il est certain que la valeur de  $V_b/K_b$  représente une « vraie » valeur pour l'aminolyse et permet d'obtenir des informations mécanistiques pour cette étape uniquement. Lorsque de bons substrats accepteurs sont utilisés, la réaction d'hydrolyse est peu importante, alors il est plus simple d'obtenir les valeurs pour la désacylation par aminolyse. Cependant, dans le cas des substrats accepteurs utilisés ici, l'hydrolyse affecte beaucoup les données. Afin de bien pouvoir comparer tous les résultats ensemble, il est plus simple de transformer les vitesses en constantes de vitesse grâce à l'équation (2),

$$k_{cat,b}^{norm} / K_b = \frac{V_b / K_b}{[E]} \times \frac{837}{A.S.} \quad (2)$$

où  $k_{cat,b}^{norm}$  est la constante de vitesse de la réaction catalysée par la GGT normalisée par rapport à l'activité spécifique,  $[E]$  est la concentration de l'enzyme en molaire et A.S., l'activité spécifique de l'enzyme utilisée en unité/mg d'enzyme. L'activité spécifique pouvant varier un peu d'une journée d'expérience à l'autre et d'un tube d'enzyme à un autre, il est important de tout normaliser. La valeur de 837 U/mg est la valeur à laquelle toutes les données cinétiques sont normalisées afin de pouvoir comparer les résultats ensemble<sup>93</sup>.

Ainsi, grâce à ces multiples transformations mathématiques, il a été possible d'obtenir des valeurs de  $k_{cat,b}^{norm} / K_b$  pour chacun des substrats accepteurs étudiés. Le Tableau IX résume les valeurs cinétiques obtenues.

**Tableau IX.** Valeurs de  $\log (k_{cat,b}^{norm} / K_b)$  obtenues pour la réaction de transpeptidation de la GGT en présence de D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide comme substrat donneur et de différents dérivés de la L-méthionine comme substrat accepteur à pH 8,0 et à 37 °C.

Numéro du composé	Substrat accepteur	Structure de la partie variable (R sur Schéma 10)	$\log (k_{cat,b}^{norm} / K_b)$
(19a)	L-méthionyl(2,2,2-trifluoroéthylamide)	CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	5,24 ± 0,03
(19b)	L-méthionyl(3,3,3-trifluoropropylamide)	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	5,378 ± 0,004
(19c)	L-méthionyl(2-fluoroéthylamide)	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	5,51 ± 0,02
(19d)	L-méthionylpropylamide	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5,52 ± 0,02
(19e)	L-méthionyléthylamide	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5,48 ± 0,01
(19f)	L-méthioninamide	H	5,85 ± 0,02

Les valeurs retrouvées dans le Tableau IX ont été obtenues à la suite d'un duplicata des expériences. Il est possible de constater que l'encombrement stérique du groupement R ne semble pas affecter beaucoup les données cinétiques, l'effet semblant être plutôt dû au  $pK_a$ . Ainsi, les composés **19d** et **19e** diffèrent par un groupement méthylène, mais les valeurs cinétiques sont presque identiques. Le choix des amines à coupler s'est donc avéré judicieux et il semble que les valeurs ainsi obtenues soient plutôt reliées à la valeur du  $pK_a$ .

Afin de pousser un peu plus loin l'analyse, les valeurs de  $k_{cat,b}^{norm}$  et de  $K_b$  ont été trouvées individuellement. Pour y parvenir, d'autres manipulations mathématiques sont nécessaires. L'ordonnée à l'origine de chacune des droites du graphique de Lineweaver-Burk (Figure 14) est représentée par le terme de droite de l'équation (1) qui est

$$\text{Ordonnée} = \frac{1 + [B]/K_b}{V_h(1 + [B]/K_{iab})}$$

Les valeurs de  $V_h$  (vitesse maximale pour la réaction d'hydrolyse), de  $K_{iab}$  (constante de partage) et de  $[B]$  (concentration du substrat accepteur) sont connues. Ainsi, il est possible de déterminer la valeur de  $K_b$ , puis la valeur de  $k_{cat,b}^{norm}$  séparément. Les valeurs obtenues se retrouvent au Tableau X.

**Tableau X.** Valeurs de  $\log(k_{cat,b}^{norm})$  et de  $K_b$  déterminées pour la réaction de transpeptidation de la GGT entre le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et différents substrats accepteurs à pH 8,0 et à 37 °C.

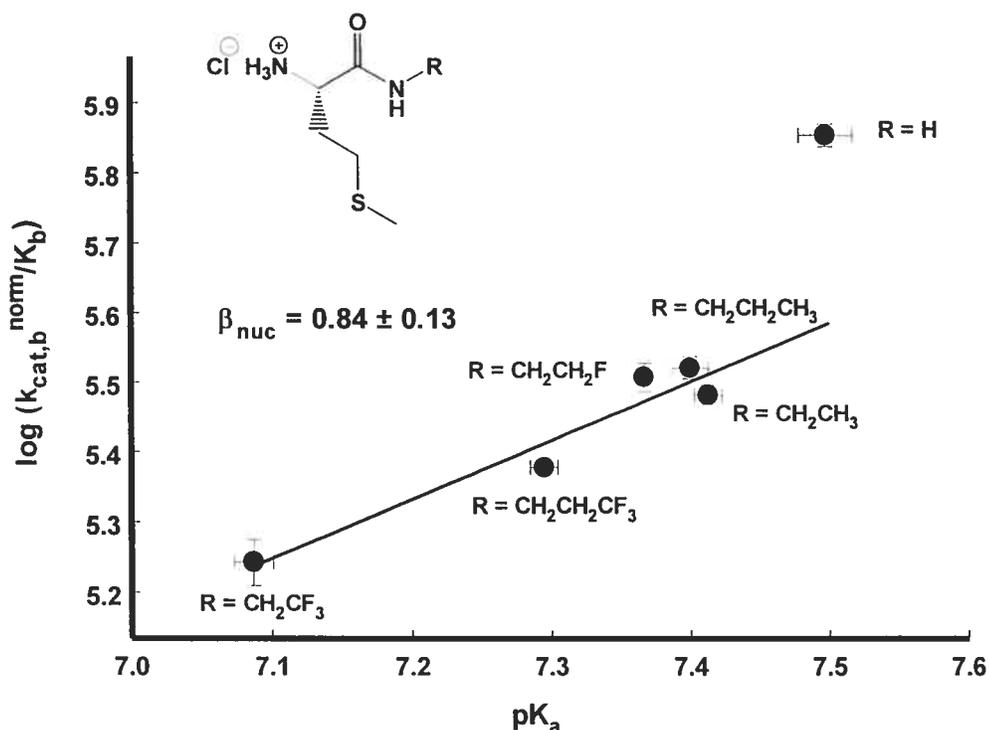
Numéro du composé	Substrat accepteur	Structure de la partie variable (R sur Schéma 10)	$\log(k_{cat,b}^{norm})$	$K_b$ (mM)
(19a)	L-méthionyl(2,2,2-trifluoroéthylamide)	CH <sub>2</sub> CF <sub>3</sub>	3,83 ± 0,03	38 ± 3
(19c)	L-méthionyl(2-fluoroéthylamide)	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> F	4,03 ± 0,02	29 ± 2
(19d)	L-méthionylpropylamide	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4,01 ± 0,02	31 ± 8
(19e)	L-méthionyléthylamide	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4,08 ± 0,01	28 ± 4
(19f)	L-méthioninamide	H	4,06 ± 0,02	16 ± 3

Il est à noter que les valeurs pour le substrat accepteur L-méthionyl(3,3,3-trifluoropropylamide) (19b) ne sont pas indiquées puisque l'erreur sur les valeurs de  $K_b$  étaient très grandes. Il a été impossible de s'y fier avec précision afin de déterminer le  $k_{cat,b}^{norm}$ . Il est connu que la détermination du  $K_b$  peut mener à une grande erreur expérimentale<sup>43</sup>. La première observation intéressante est le fait que les composés 19a et 19c-e possèdent des  $K_b$  de l'ordre de 30 à 39 mM.

Les concentrations utilisées durant les expériences étant inférieures à 20 mM, l'étape d'aminolyse était donc limitante puisque les concentrations de substrat accepteur utilisées sont bien inférieures au  $K_M$  pour l'enzyme. De plus, il est intéressant de remarquer la différence de  $K_M$  du composé L-méthioninamide (**19f**). Cette grande différence de constante d'affinité  $K_b$  par rapport aux autres composés peut expliquer en partie la grande efficacité de ce composé. La présence de la fonction amide primaire aide peut-être à une bonne liaison avec l'enzyme grâce à la possibilité accrue de faire des ponts hydrogènes. Cependant, sans structure cristalline de l'enzyme, il est difficile de démontrer ces hypothèses. Dans le cas des valeurs de  $k_{cat,b}^{norm}$ , elles sont considérées comme plus imprécises que les valeurs de  $k_{cat,b}^{norm} / K_b$ , dû à la manipulation mathématique des données cinétiques pouvant entraîner de plus grandes erreurs<sup>43</sup>.

### 3.2.5 Courbe de Brønsted

Les données cinétiques représentant l'aminolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme sont utilisées pour tracer une courbe de type Brønsted afin d'obtenir des informations sur cette étape bien importante du mécanisme de la GGT. La courbe obtenue est représentée à la Figure 16.

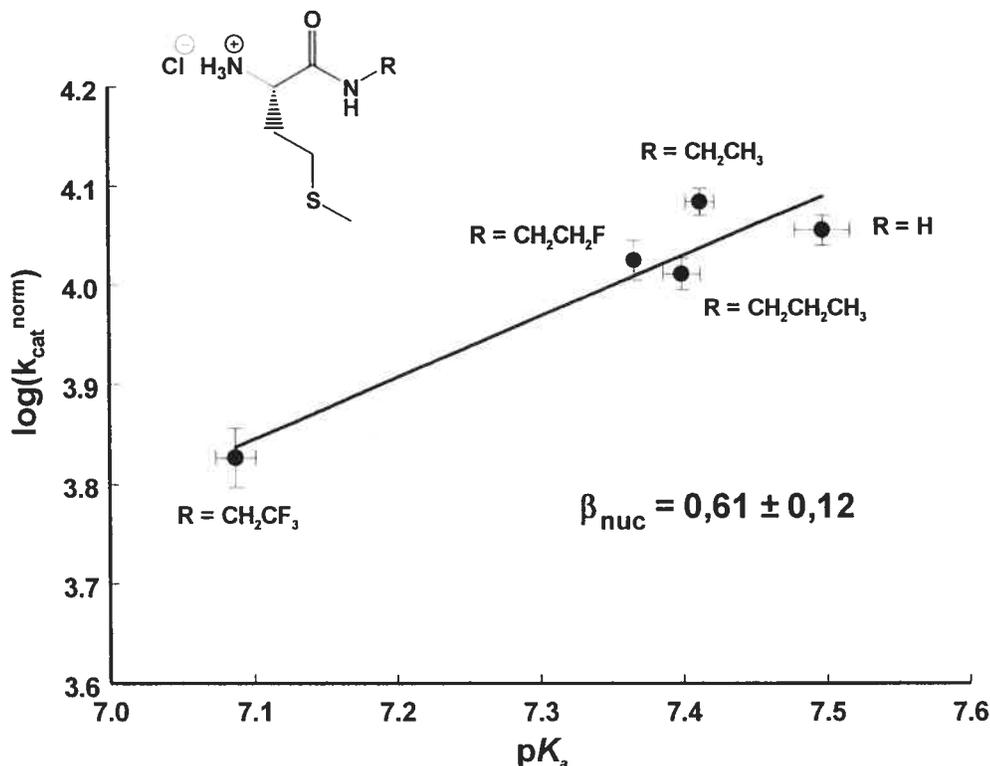


**Figure 16.** Courbe de Brønsted de  $\log(k_{cat,b}^{norm}/K_b)$  en fonction du  $pK_a$  pour la réaction d'aminolyse de la GGT en présence du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et de différents substrats accepteurs. Chacun des substrats accepteurs utilisés est représenté par la valeur de  $pK_a$  retrouvée au Tableau VIII.

Pour débiter, l'erreur expérimentale sur chacun des points est due à la différence dans le duplicata des expériences et à l'erreur au niveau de la constante de partage qui a été propagée dans tous les calculs jusqu'à ce graphique. La pente obtenue  $\beta_{nuc}$  est de  $0,84 \pm 0,13$  avec une corrélation  $r$  de 0,932. Cependant, la valeur de la pente ne tient pas compte du point ayant une valeur de  $pK_a$  de 7,50 correspondant à la L-méthioninamide (**19f**). En effet, comme il a été indiqué plus tôt, ce composé ne possède pas un  $K_b$  (constante de Michaelis du substrat accepteur) dans la même gamme que les autres composés, ce qui peut expliquer la grande efficacité catalytique de l'enzyme par rapport à ce composé. Il est donc exclu, pour l'instant, de l'analyse des données cinétiques, mais il confirme l'orientation de la courbe.

Il faut également noter le faible intervalle de valeurs de  $pK_a$  présent. En effet, il a été impossible d'obtenir des composés couvrant une plus large gamme de  $pK_a$  parce que la spécificité de l'enzyme est très précise pour des substrats accepteurs formés d'acides aminés peu modifiés. D'autres composés auraient pu être testés, mais des contraintes stériques au niveau de la fonction amide auraient été insérées et les résultats auraient été beaucoup plus difficiles à interpréter. Cependant, la précision des valeurs de  $pK_a$  est assez grande pour pouvoir analyser les résultats sans risque d'erreurs. De plus, les études ont été effectuées à pH 8,0, soit à un pH plus élevé que le  $pK_a$  de tous les substrats accepteurs testés. Ainsi, aucune correction par rapport à la proportion de composé présent sous forme d'amine n'est nécessaire, ni la réalisation de la même expérience à un autre pH<sup>114</sup>.

Sur le graphique présenté à la Figure 16, les valeurs de  $\log (k_{cat,b}^{norm} / K_b)$  sont utilisées sur l'axe des ordonnées. Le même graphique a été réalisé avec les valeurs de  $\log (k_{cat,b}^{norm})$  en fonction des  $pK_a$ . Le résultat obtenu est montré à la Figure 17.



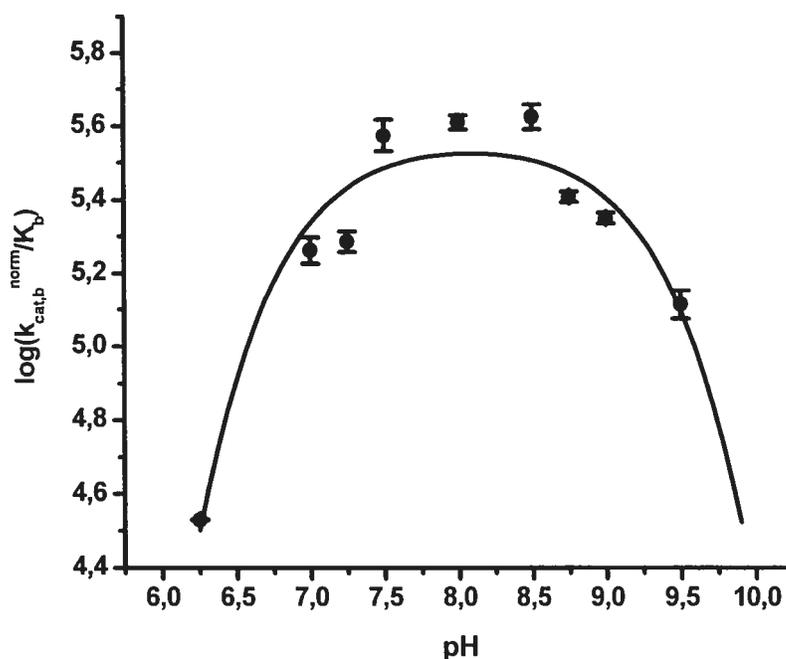
**Figure 17.** Courbe de Brønsted du  $\log(k_{cat}^{norm})$  en fonction du  $pK_a$  pour la réaction d'aminolyse de la GGT en présence du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et de différents substrats accepteurs. Chacun des substrats accepteurs utilisés est représenté par une valeur de  $pK_a$  retrouvée au Tableau VIII.

La valeur de la pente de la courbe de Brønsted pour la corrélation entre  $\log(k_{cat,b}^{norm})$  en fonction du  $pK_a$  du groupement  $\alpha$ -ammonium des différents substrats accepteurs est de  $0,61 \pm 0,12$ , avec un facteur de corrélation  $r$  de 0,900. Dans ce cas-ci, la valeur du substrat accepteur L-méthioninamide (**19f**) a pu être incorporée dans la courbe. Ceci confirme donc que la différence d'efficacité entre ce composé et les autres dérivés (**19a-e**) est principalement due à une meilleure affinité du composé **19f** par l'enzyme. Ensuite, dans les deux courbes de Brønsted présentées, une pente positive a été obtenue, mais la corrélation du  $\log(k_{cat,b}^{norm})$  est moins bonne que celle de  $\log(k_{cat,b}^{norm} / K_b)$ . Une corrélation avec  $\log(k_{cat,b}^{norm} / K_b)$  indique généralement que

l'étape limitante est la réaction entre l'enzyme et le substrat étudié, ce qui serait ici l'attaque nucléophile du substrat accepteur sur l'intermédiaire covalent acyl-enzyme pour former un intermédiaire tétraédrique<sup>91</sup>. Dans le cas d'une meilleure corrélation avec  $\log(k_{cat,b}^{norm})$ , cela signifie que l'étape limitante serait la dégradation de l'intermédiaire tétraédrique formé de l'enzyme acylée et du substrat accepteur afin de former un produit (le L- $\gamma$ -glutamyl-L-méthionine modifiée) et la régénération de l'enzyme libre. Puisque la corrélation est meilleure avec le  $\log(k_{cat,b}^{norm} / K_b)$  et que les données obtenues sont plus précises, cette courbe de Brønsted sera utilisée dans les études futures. Aussi, dans les deux courbes, la pente possède une valeur positive, ce qui indique qu'une charge positive est formée à l'état de transition de l'étape limitante<sup>91</sup>, ce qui sera expliqué un peu plus en détail dans la section Discussion. Il est impossible de proposer un mécanisme seulement avec cette information, alors d'autres expériences ont été effectuées afin d'obtenir différentes évidences expérimentales sur cette réaction.

### 3.2.6 Études de l'effet du pH

Il est important de savoir si le pH a un effet sur la vitesse de la réaction d'aminolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme. Les mêmes courbes que celles montrées aux Figures 14 et 15 sont effectuées à différents pH avec le substrat accepteur L-méthionylpropylamide (**19d**). Ce substrat a été choisi pour la facilité à le synthétiser et pour sa grande ressemblance avec d'autres composés de la courbe de Brønsted. Les droites sont toujours parallèles sur la courbe de type Lineweaver-Burk, ce qui démontre que l'étape limitante est toujours bel et bien la désacylation à chacun des pH. Par la suite, une courbe pH-vitesse a été effectuée entre des pH de 6,25 et 9,50 afin d'obtenir des informations quant à la présence d'acides aminés agissant comme acide/base général. Elle est montrée à la Figure 18.



**Figure 18.** Courbe pH-vitesse pour la réaction de transpeptidation catalysée par la GGT entre le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et le substrat accepteur L-méthionylpropylamide (**19d**) à 37 °C.

Afin d'effectuer cette courbe, les graphiques de libération de la *p*-nitroaniline en fonction du temps ont donné des droites dont la pente a dû être divisée par le coefficient d'extinction molaire de ce composé au pH testé. Les coefficients utilisés ont tous été publiés dans la littérature<sup>83</sup>, sauf dans le cas du pH 6,25. Un graphique d'absorbance en fonction de la concentration de la *p*-nitroaniline à ce pH a été réalisé en duplicata selon le protocole décrit à la section 6.2.2.4 et a donné un coefficient d'extinction molaire de 7800 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. La stabilité de la GGT à ces divers pH a également déjà été testée<sup>83</sup>.

Comme il a été expliqué plus tôt, les valeurs de  $\log(k_{cat}^{norm} / K_b)$  ont été utilisées au cours de cette analyse afin d'obtenir plus d'informations concernant l'attaque nucléophile du substrat accepteur sur l'intermédiaire covalent acyl-enzyme. Il est possible de constater que la courbe possède une forme de cloche, avec

possiblement deux groupements ionisables impliqués dans l'aminolyse. Les points à pH 6,25 et 9,50 ont été difficiles à obtenir, dû à la faible différence de réactivité en présence du substrat accepteur. En effet, au cours de l'analyse mathématique, la différence de vitesse entre l'étape d'hydrolyse (en absence de substrat accepteur) et de transpeptidation (en présence de substrat accepteur) doit être suffisamment importante afin de pouvoir obtenir des valeurs cinétiques fiables. Ces deux points ont été faits en duplicata, donc leur valeur est significative sur la courbe. Les points expérimentaux sur la courbe à la Figure 18 proviennent de la moyenne de deux expériences, sauf dans le cas des points aux pH 7,0, 8,75 et 9,0 qui se retrouvent clairement dans le plateau formé dans la courbe.

Le modèle utilisé pour la courbe implique la présence d'au moins deux groupements ionisables dans l'aminolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme. Cependant, dû à la difficulté d'obtenir des valeurs cinétiques à des pH faibles et élevés, une incertitude est présente au niveau de la courbe, ce qui empêche de déterminer avec précision la valeur du  $pK_a$  des acides aminés possiblement impliqués. Pour débiter, un premier  $pK_a$  d'environ 7 est représenté par le côté ascendant de la courbe. Celui-ci pourrait correspondre à une base générale nécessaire pour déprotoner le substrat accepteur afin de faire l'aminolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme. Cependant, ce  $pK_a$  pourrait également correspondre à la valeur du  $pK_a$  du substrat accepteur utilisé (7,40 pour la L-méthionylpropylamide (**19d**)). De plus, des études d'effet du pH ont déjà été effectuées avec un substrat donneur fluorophore et différents substrats accepteurs pour la GGT<sup>103</sup>. Il a été montré que le changement de la nature du substrat accepteur utilisé pouvait modifier le  $pK_a$  du côté ascendant de la courbe pH-vitesse. Afin de déterminer clairement à quoi est dû ce  $pK_a$ , la courbe pH-vitesse représentée à la Figure 18 devrait être refaite avec un autre substrat accepteur. Cependant, dû à la faible différence de  $pK_a$  entre les différents substrats accepteurs utilisés dans cette étude et à l'imprécision de la courbe pH-vitesse obtenue, il est difficile d'attribuer la valeur de  $pK_a$ .

Il se peut donc que le côté ascendant de la courbe pH-vitesse représente un recouvrement de ces deux  $pK_a$ . Dans ce cas, il est normalement possible de mesurer la pente du côté ascendant. Si deux protons (deux espèces ionisables superposées) sont en mouvement, la pente est généralement d'une valeur de 2, alors qu'un seul acide aminé impliqué donne une pente d'une valeur de 1<sup>49</sup>. Ici, puisque les données sont difficiles à obtenir à de faibles valeurs de pH, il est impossible de dire avec certitude si la pente est d'une valeur de 1 ou de 2. Ainsi, le côté ascendant de la courbe pH-vitesse de la Figure 18 peut représenter la superposition du  $pK_a$  d'une base générale et du  $pK_a$  du substrat accepteur<sup>10</sup>. Dans le cas du côté descendant, un acide général est présent avec un  $pK_a$  d'environ 9 et pourrait être dû à un acide aminé devant protoner le nucléophile pour régénérer l'enzyme libre.

### 3.2.7 Effets isotopiques de solvant

Selon la courbe pH-vitesse obtenue à la Figure 18, il pourrait y avoir un proton en mouvement dans l'étape d'aminolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme, notamment au niveau d'une base générale. Afin de vérifier cette possibilité, des effets isotopiques de solvant ont été effectués. Les réactions cinétiques ont été réalisées de la même manière que les expériences précédentes, mais toutes les solutions ont été préparées dans de l'oxyde de deutérium ( $D_2O$ ) au lieu de l'eau déionisée normalement utilisée. Les substrats accepteurs L-méthionyl(2-fluoroéthylamide) (**19c**), L-méthionylpropylamide (**19d**) et L-méthioninamide (**19f**) ont été étudiés plus en détail. Ces composés possèdent différents  $pK_a$  et sont un peu plus faciles à manipuler (au niveau de leur état physique) que les autres composés. Les valeurs de pH ont été ajustées dans le  $D_2O$  en tenant compte de la différence de lecture effectuée par l'électrode du pH-mètre (il faut lire un pH de 7,6 pour obtenir un pD de 8,0<sup>115</sup>). De plus, la stabilité de la GGT a été vérifiée dans un milieu formé de  $D_2O$  et celle-ci n'est pas modifiée<sup>83</sup>. Les valeurs de  $k_{cat,b}^{norm} / K_b$  dans l'eau sont divisées par celles obtenues dans le  $D_2O$ . Les résultats obtenus sont représentés au Tableau XI.

**Tableau XI.** Effets isotopiques de solvant ( $(k_{cat,b}^{norm} / K_b)^{H_2O/D_2O}$ ) pour la réaction d'aminolyse effectuée par la GGT en présence de D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide comme substrat donneur et différents substrats accepteurs à pH (ou pD) 8,0 et à 37 °C.

Numéro du composé	Substrat accepteur	$(k_{cat,b}^{norm} / K_b)^{H_2O/D_2O}$
(19c)	L-méthionyl(2-fluoroéthylamide)	1,77
(19d)	L-méthionylpropylamide	1,39
(19f)	L-méthioninamide	2,16

Pour commencer, les trois valeurs sont supérieures à 1, ce qui indique qu'un proton est bien en mouvement durant l'état de transition de l'étape la plus lente dans le processus de la désacylation. Ceci pourrait donc confirmer qu'une base générale est impliquée dans la réaction. Cependant, il est impossible de corréliser ces résultats avec le  $pK_a$  des substrats accepteurs utilisés. En effet, la L-méthioninamide est un peu différente des autres par son affinité à la GGT. Afin de voir l'effet de la liaison du substrat dans différents milieux réactionnels sur l'effet isotopique, les valeurs de  $k_{cat,b}^{norm} / K_b$  obtenues dans le D<sub>2</sub>O ont été analysées plus en détail afin d'obtenir l'effet isotopique  $(k_{cat,b}^{norm})^{H_2O/D_2O}$  et voir la différence de  $K_b$ . Les valeurs obtenues se retrouvent dans le Tableau XII.

**Tableau XII.** Effets isotopiques de solvant ( $(k_{cat,b}^{norm})^{H_2O/D_2O}$ ) et valeurs des constantes d'affinité  $K_b$  dans l'oxyde de deutérium et dans l'eau pour la réaction d'aminolyse de la GGT en présence du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et de différents substrats accepteurs à pH (ou pD) 8,0 et à 37 °C.

Numéro du composé	Substrat accepteur	$(k_{cat,b}^{norm})^{H_2O/D_2O}$	$K_b$ (D <sub>2</sub> O) (mM)	$K_b$ (H <sub>2</sub> O) (mM)
(19c)	L-méthionyl(2-fluoroéthylamide)	2,53	14 ± 1	29 ± 2
(19d)	L-méthionylpropylamide	4,55	10 ± 1	31 ± 8
(19f)	L-méthioninamide	3,52	9 ± 3	16 ± 3

Cette fois-ci également, il est clair qu'il y a un effet isotopique de solvant puisque les valeurs sont supérieures à 1. Il est possible de comparer les valeurs de  $K_b$  dans les deux solvants. Une énorme amélioration de l'affinité des composés pour l'enzyme est présente dans le D<sub>2</sub>O. En effet, pour les deux premiers composés, le  $K_b$  passe de 30 à 10-14 mM, ce qui constitue une grande différence. Ceci peut être expliqué par la différence de solvation de chacun des composés dans le milieu réactionnel<sup>116,117</sup>. Ainsi, dans le D<sub>2</sub>O, les charges sont solvatées de manière moins efficace que dans l'eau, ce qui permet au composé d'être plus facilement lié par l'enzyme par complémentarité de charges. Dans le cas de l'eau, les charges ioniques du composé sont bien solvatées, ce qui rend plus difficile la séparation entre les molécules d'eau et le substrat avant qu'une liaison soit effectuée dans le site de liaison de l'enzyme. Il est fort probable que cet effet n'affecte pas les composés de manière identique (par exemple, le  $K_b$  de la L-méthioninamide (19f) ne change pas beaucoup en fonction du milieu), alors il est difficile d'interpréter les résultats d'un point de vue quantitatif au niveau du  $k_{cat,b}^{norm} / K_b$ <sup>118,119,120</sup>. Cette valeur est analysée depuis le début de cette étude (pas  $k_{cat,b}^{norm}$ ), alors il est seulement possible de conclure qu'un effet isotopique est présent et qu'un proton est possiblement en mouvement dans l'étape limitante de la réaction d'aminolyse. Cependant, ce type de phénomène compliquant l'analyse des données a déjà été vu pour l'acétylcholinestérase,

notamment au niveau du  $k_{cat}$  considéré alors comme plus précis que le  $k_{cat} / K_M$ <sup>117</sup>. L'importance de ces données sera discutée plus en détail dans la prochaine section.

### 3.3 Discussion

Ce chapitre se veut une étude exhaustive du mécanisme de la désacylation de la GGT. En effet, cette étape a été peu étudiée pour la GGT, mais également pour d'autres transpeptidases qui possèdent cette fonction supplémentaire par comparaison avec les enzymes agissant seulement comme hydrolases. Il est donc important d'obtenir des informations supplémentaires à ce niveau. Une approche de type physico-chimie organique permet d'étudier cette étape de désacylation en détail, notamment au niveau de la nature des charges présentes à l'état de transition de l'étape limitante dans cette réaction.

La synthèse de composés dérivés de la L-méthionine servant comme substrat accepteur pour la GGT a été effectuée avec succès. Comme il a été discuté plus tôt, il a été possible d'obtenir une gamme de composés de manière assez efficace et de déterminer très précisément la valeur de  $pK_a$  de leur groupement  $\alpha$ -ammonium. Cependant, l'intervalle de valeurs de  $pK_a$  obtenu est très faible. Il n'aurait pas été possible de coupler plusieurs autres amines sans introduire des facteurs d'encombrement stérique qui auraient rendu l'étude des constantes cinétiques obtenues plus difficile. La précision des valeurs de  $pK_a$  et des constantes cinétiques a donc été préférée à la synthèse d'autres molécules qui auraient pu élargir la gamme de  $pK_a$  utilisés, mais qui auraient introduit des facteurs difficiles à analyser.

Ces substrats accepteurs ont ensuite été utilisés dans des réactions de transpeptidation. Comme il a été démontré avec les résultats obtenus, les précautions prises quant aux conditions expérimentales ont permis de s'assurer que l'étape limitante soit toujours celle de désacylation (par hydrolyse ou par aminolyse) de l'intermédiaire acyl-enzyme. En effet, les substrats accepteurs utilisés ont tous montré une plus faible réactivité que la glycylglycine, le meilleur substrat accepteur

de la GGT, permettant ainsi d'avoir l'étape de désacylation comme étant la plus lente dans la transpeptidation. De plus, les  $K_b$  obtenus pour tous ces substrats accepteurs sont autour de 30 mM (sauf pour la L-méthioninamide, avec 16 mM), ce qui est plus élevé que celui de la L-méthionine (4,7 mM<sup>87</sup>). Cependant, la L-méthionine n'a pas été testée ici afin de ne pas ajouter un facteur supplémentaire dans l'analyse des données, un acide carboxylique étant présent à la place d'un amide secondaire. Ces valeurs de  $K_b$  sont bien au-delà des concentrations de substrat accepteur utilisées (maximum de 20 mM, sauf pour la L-méthioninamide, avec 8 mM) pour faire les études cinétiques, ce qui confirme la nature de l'étape la plus lente dans l'expérience. Il a également été démontré que le substrat accepteur n'est pas allé se lier dans le site de liaison du substrat donneur. En effet, la Figure 14 montre des droites parfaitement parallèles, constituant une excellente preuve de l'absence d'inhibition de ce type. Ces résultats confirment des études faites préalablement en laboratoire avec des dérivés de l'entité  $\gamma$ -glutamyle. Ces molécules, contenant un hétéroatome sur la chaîne latérale et une fonction ester à la place du groupement  $\alpha$ -carboxylate, se sont plus facilement liées dans le site de liaison du substrat accepteur que dans celui du substrat donneur<sup>58</sup>. De plus, les composés glycinamide et L-méthionine éthyl ester ont déjà été montrés comme pouvant agir comme de bons substrats accepteurs<sup>104,121</sup>. Il semble donc que l'absence de charge négative dans la molécule puisse aider à la liaison dans le site de liaison du substrat accepteur. Toutes ces raisons permettent donc d'avancer que les résultats obtenus proviennent de la désacylation de l'intermédiaire acyl-enzyme de la GGT.

Par la suite, plusieurs courbes cinétiques et des manipulations mathématiques, plus complexes que celles généralement effectuées pour analyser des données cinétiques en état stationnaire, ont été réalisées. Ceci a permis d'obtenir des informations uniquement sur l'aminolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme. Les données présentes dans la littérature sont justement très souvent dues à un mélange d'hydrolyse et d'aminolyse, ce qui modifie considérablement l'analyse lorsque l'hydrolyse constitue une réaction importante<sup>43</sup>. Ces données ont été utilisées pour tracer une courbe de type Brønsted avec le  $\log(k_{cat,b}^{norm} / K_b)$  en fonction du  $pK_a$  du

groupement  $\alpha$ -ammonium du substrat accepteur. Une courbe similaire a été obtenue avec le  $\log(k_{cat,b}^{norm})$  en fonction du  $pK_a$ . Cependant, la corrélation s'est avérée meilleure dans le premier cas. De plus, l'obtention des données de  $k_{cat,b}^{norm}$  est rendue plus difficile due à la manipulation mathématique des données, ce qui amène un facteur d'imprécision sur celles-ci<sup>43</sup>.

La courbe de Brønsted de  $\log(k_{cat,b}^{norm} / K_b)$  en fonction du  $pK_a$  a montré une pente de  $0,84 \pm 0,13$  sans tenir compte du point correspondant au composé L-méthioninamide (**19f**). En effet, comme l'a montré le Tableau X, une grande variation existe entre les  $K_b$  des substrats accepteurs et le composé **19f**, ce qui explique cette différence. La courbe de Brønsted de  $k_{cat,b}^{norm}$  en fonction du  $pK_a$  a justement montré que l'élimination de l'effet de la liaison ( $K_b$ ) du composé par l'enzyme permettait d'obtenir une corrélation en présence du point correspondant à la L-méthioninamide. Ainsi, la présence d'une fonction amide primaire dans ce dernier par rapport aux amides secondaires dans les autres composés peut très bien expliquer cette différence de comportement.

La valeur obtenue pour la courbe de Brønsted est positive. Ceci signifie que l'attaque nucléophile du substrat accepteur sur l'intermédiaire acyl-enzyme mène à la formation d'une charge partiellement positive (ou à la disparition d'une charge partiellement négative) durant l'état de transition de l'aminolyse et que la nucléophilie de l'atome d'azote est importante. Dans le cas d'une pente avec une valeur négative, une charge partiellement négative est formée sur l'atome d'azote (dont le  $pK_a$  est varié) durant l'état de transition. La déprotonation de cet azote par une base générale peut alors expliquer ce type de phénomène. Normalement, si une charge complète est formée durant l'état de transition, il serait possible d'obtenir une valeur de 1 pour la pente de la courbe de Brønsted<sup>90</sup>. Cependant, si deux phénomènes sont concurrents au cours de la réaction, la valeur de la pente sera alors diminuée. Ainsi, il serait possible que la nucléophilie du groupement  $\alpha$ -ammonium compétitionne avec sa déprotonation pour donner une valeur un peu plus faible pour

la pente. Dans le cas présent pour la GGT, la valeur positive de 0,84 est assez grande, ce qui peut être expliqué par une attaque nucléophile de l'amine du substrat accepteur qui est assez avancée lors de l'état de transition par rapport à la déprotonation concertée de l'amine.

D'autres études ont déjà été effectuées avec des enzymes faisant de la transpeptidation avec divers types de substrats accepteurs et ont donné des résultats différents selon le type de substrat utilisé et le nucléophile de l'enzyme. Le Tableau XIII montre le résultat de ces recherches.

**Tableau XIII.** Comparaison de la valeur de  $\beta_{\text{nuc}}$  de diverses enzymes selon le type de nucléophile et de substrats utilisés durant l'étude.

Enzyme étudiée	Nucléophile	Substrat utilisé	Valeur de $\beta_{\text{nuc}}$
Transglutaminase <sup>114,122</sup>	Cystéine	Amines primaires (substrats accepteurs)	0,51 ± 0,07
Chymotrypsine <sup>123</sup>	Sérine	Amines aliphatiques	0
Chymotrypsine <sup>123</sup>	Sérine	Anilines	0,52
Furoyl- chymotrypsine <sup>124.a</sup>	Sérine	Amines primaires ou secondaires	0,1-0,2
GGT	Groupement hydroxyle <sup>b</sup>	Dérivés de la L- méthionine	0,84

<sup>a</sup>L'enzyme a été modifiée en utilisant le furoylimidazole afin d'obtenir l'enzyme sous forme acylée.

<sup>b</sup>Malgré le manque d'information par rapport à la GGT de rein de rat, il est fort probable que le nucléophile soit une thréonine.

La transglutaminase a été étudiée en détail dans notre groupe de recherche<sup>114</sup>. Cette enzyme fait partie des transpeptidases présentes dans la famille des EC 2.3.2.-. Dans ce cas, des amines primaires couvrant une très large gamme de  $pK_a$  (5,64 à 10,50) ont été utilisées comme substrat accepteur. Une valeur de 0,51 a été obtenue et a été expliquée par une attaque nucléophile de l'amine, plus avancée à l'état de transition de la désacylation, que sa déprotonation concertée sur l'intermédiaire acyl-

enzyme. Cependant, dans ce cas, les deux phénomènes compétitionnent bien l'un contre l'autre, rendant la valeur de la pente plus faible. La différence de valeur entre la transglutaminase et la GGT peut être expliquée par plusieurs raisons. Pour commencer, le nucléophile de ces deux enzymes est différent. La transglutaminase, avec sa cystéine au site actif, forme un intermédiaire acyl-enzyme différent, en terme de réactivité, de celui de la GGT formé avec un lien ester<sup>9</sup>. De plus, une histidine a été proposée comme résidu jouant le rôle de base générale dans ce mécanisme, mais l'acide aminé agissant comme tel pour la GGT n'est pas connu et pourrait être (ou non) une histidine<sup>83,114</sup>. Ainsi, ces raisons peuvent expliquer la différence de réactivité de ces deux enzymes et les résultats obtenus au niveau de la courbe de Brønsted.

Ensuite, ce type d'étude a été effectué avec la chymotrypsine. Dans ce cas-ci, une valeur de  $\beta_{\text{nuc}}$  de 0 est obtenue pour des substrats accepteurs de type amine aliphatique avec une très large gamme de  $\text{p}K_{\text{a}}$ <sup>123</sup> et couvrant même le  $\text{p}K_{\text{a}}$  d'une histidine effectuant la déprotonation du substrat utilisé. Cette valeur nulle a été expliquée par les auteurs comme étant une déprotonation très efficace de l'amine du substrat parfaitement concertée avec l'attaque nucléophile sur l'intermédiaire acyl-enzyme. Dans le cas des substrats accepteurs de type aniline, la déprotonation n'aurait pas été effectuée de la même façon. Pour la furoyl-chymotrypsine, l'explication de la faible valeur de  $\beta_{\text{nuc}}$  est la même que pour la chymotrypsine en présence d'amines aliphatiques<sup>124</sup>. Ainsi, malgré le fait que le nucléophile soit du même type que la GGT, l'aminolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme est effectuée de manière différente. De plus, la courbe de Brønsted peut être expliquée par des différences subtiles de géométrie à l'état de transition, ce qui permet de donner des informations très pertinentes sur le mécanisme de l'enzyme<sup>91</sup>.

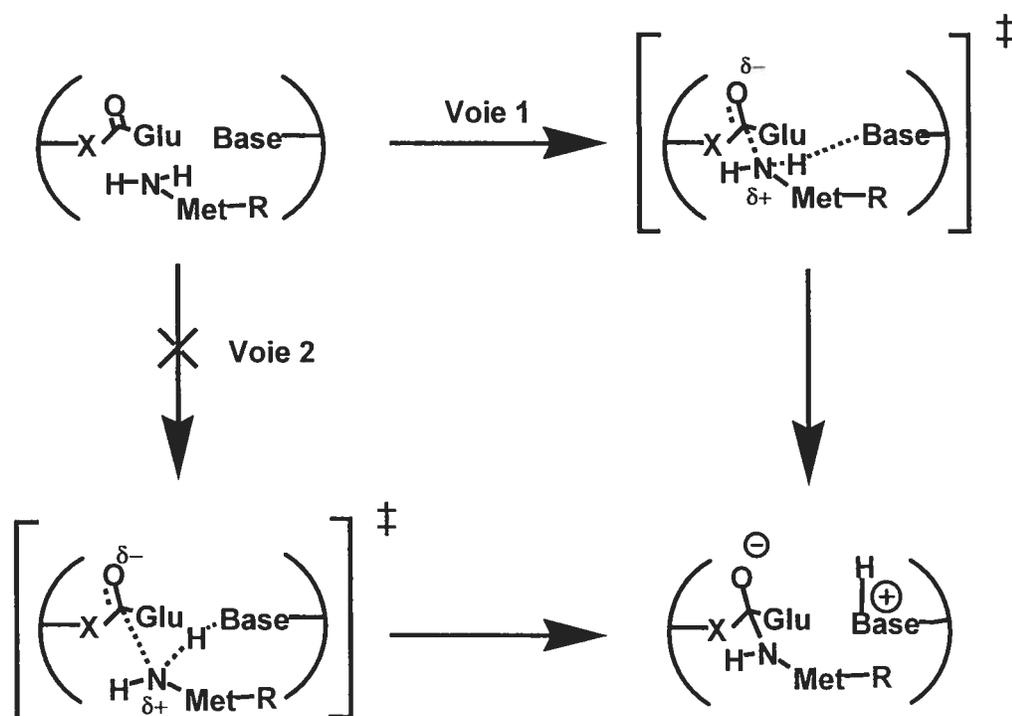
Afin de proposer un mécanisme précis pour la désacylation par aminolyse de la GGT, des études d'effet du pH ont été effectuées. Comme il est décrit à la section 3.2.6, une courbe pH-vitesse a été obtenue pour le substrat accepteur L-méthionylpropylamide (**19d**). Cette courbe est en forme de cloche, ce qui indique

que l'ionisation de deux acides aminés est importante dans le mécanisme de la désacylation. Cependant, l'imprécision des données de la courbe et la difficulté d'obtenir des données cinétiques à des valeurs de pH faibles et élevées empêchent la détermination précise de  $pK_a$  pour ces acides aminés. De plus, la présence possible du  $pK_a$  du substrat accepteur utilisé peut rendre beaucoup plus difficile l'interprétation de cette courbe<sup>104</sup>. Ainsi, cette courbe nous indique de manière qualitative l'importance d'un résidu jouant le rôle d'acide général, probablement pour reprotoner le nucléophile après la réaction d'aminolyse, et d'un résidu agissant comme base générale pour déprotoner le substrat accepteur, mais d'autres expériences seraient à faire à ce niveau. Par exemple, afin d'éliminer la possibilité que le côté ascendant de la courbe soit dû au  $pK_a$  du substrat accepteur utilisé, la courbe devrait être effectuée avec un autre substrat accepteur. Dans cette étude, les substrats accepteurs utilisés ne couvrent pas une gamme de  $pK_a$  suffisamment grande pour permettre d'obtenir une courbe très différente de celle montrée à la Figure 18. Alors, il faudrait refaire cette courbe avec un autre type de substrat accepteur, tel un acide aminé avec le groupement  $\alpha$ -carboxylate libre afin d'élever le  $pK_a$  du groupement  $\alpha$ -ammonium. Dans le but d'avoir des informations importantes quant à la nature possible de l'acide aminé jouant un rôle de base générale, des courbes de pH-vitesse pourraient être effectuées à différentes températures pour tracer une courbe de van't Hoff, comme il a été réalisé dans l'étude de l'étape d'acylation de la transpeptidation<sup>83</sup>. Cependant, le fait que le  $pK_a$  du substrat accepteur soit présent dans cette région peut bien facilement compliquer l'interprétation des données. Cette courbe possède également un plateau entre les pH 7,0 et 9,0, ce qui indique qu'un faible changement de pH n'influencerait pas les valeurs cinétiques obtenues lors des expériences précédentes.

La présence d'une base générale dans le mécanisme peut être indirectement montrée par la présence d'un effet isotopique de solvant. En effet, les cinétiques ont été effectuées dans de l'oxyde de deutérium à la place de l'eau déionisée normalement utilisée. Ceci a permis de voir une diminution de la vitesse de la réaction dans le premier milieu comparativement au second, ce qui démontre un effet

isotopique de solvant supérieur à 1. Cette valeur indique qu'un proton est en mouvement durant l'étape limitante du mécanisme, étape proposée comme étant l'attaque nucléophile du substrat accepteur sur l'intermédiaire acyl-enzyme. Il pourrait donc y avoir, comme la valeur  $\beta_{\text{nucl}}$  de la courbe de Brønsted le laisse présager, une déprotonation de ce substrat accepteur par une base générale. Dans ce cas, un effet isotopique de solvant serait observé, ce qui a été le cas ici avec plusieurs substrats accepteurs différents. Ainsi, une base générale est probablement impliquée dans le mécanisme de l'étape limitante dans l'aminolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme.

Les résultats obtenus à la suite de cette série d'expérience ont permis de proposer un mécanisme détaillé pour la première fois pour l'étape de désacylation. Il se retrouve au Schéma 12.

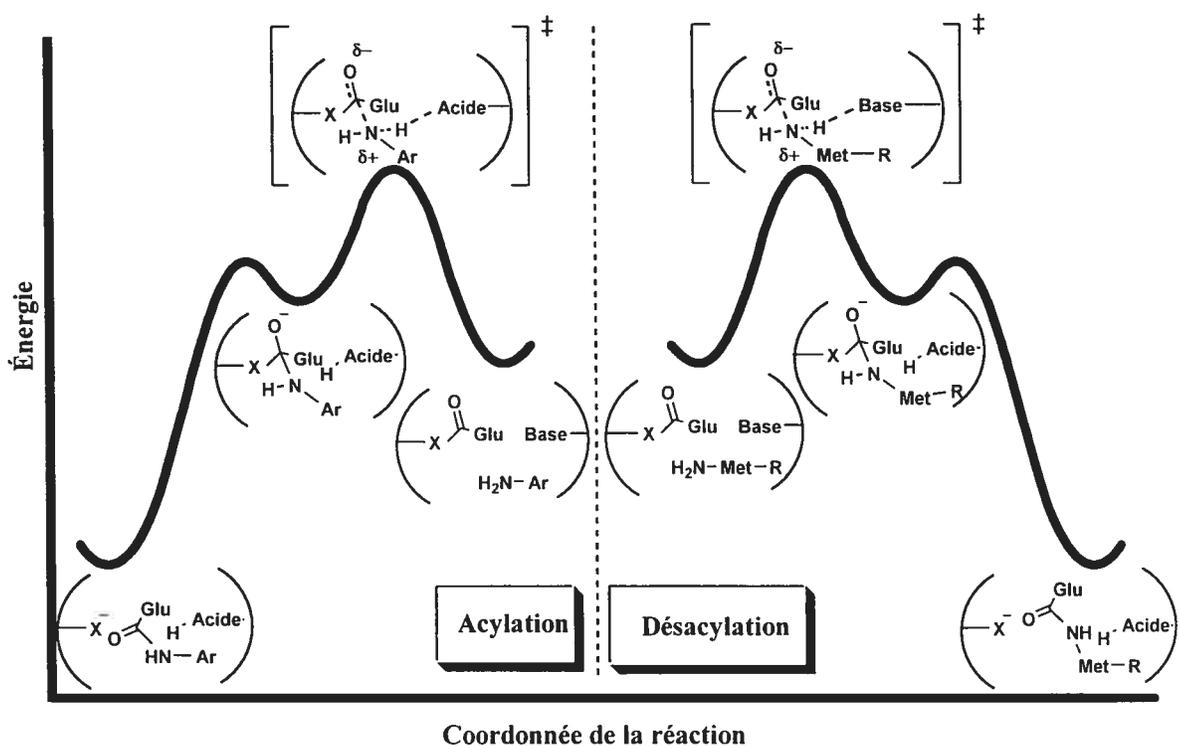


**Schéma 12.** Mécanisme proposé pour l'étape limitante dans la réaction de désacylation par aminolyse de la GGT. X représente le nucléophile de la GGT (probablement une thréonine<sup>74</sup>) et R, la modification effectuée à la L-méthionine dans cette étude.

Le Schéma 12 montre la dégradation de l'intermédiaire acyl-enzyme par deux voies différentes. Dans les deux cas, il y aurait attaque nucléophile par le substrat accepteur dérivé de la L-méthionine sur l'intermédiaire acyl-enzyme qui serait concertée avec la déprotonation de ce substrat. Dans la voie 1, l'attaque nucléophile est assez avancée à l'état de transition, ce qui forme un lien C-N assez court. La déprotonation n'est pas très efficace, donnant un lien N-H assez court. Cette voie permet d'obtenir une charge partiellement positive importante sur l'azote. Dans la voie 2, la déprotonation efficace du substrat accepteur mène à un long lien N-H (court lien Base-H) et à une attaque nucléophile moins efficace, donnant un lien C-N assez long. Alors, la charge positive possiblement formée sur l'azote est plus petite que dans le cas précédent et pourrait même être négative. Selon le résultat de la courbe de Brønsted obtenue, une valeur assez grande de 0,84 a été obtenue, ce qui concorderait avec la voie 1 du Schéma 12. Ce mécanisme est également en accord avec les résultats obtenus à partir de la courbe de pH. À de faibles pH, la base générale serait protonée, ce qui empêcherait la déprotonation du substrat accepteur et donnerait une réaction beaucoup plus lente. Un proton est en mouvement à l'état de transition, ce qui concorde bien avec les résultats obtenus pour les effets isotopiques de solvant avec différents substrats accepteurs.

Le mécanisme proposé pour l'étape de désacylation par aminolyse peut être comparé à celui de l'étape d'acylation. En effet, comme il a été indiqué à la section 3.1, l'étape d'acylation a été étudiée grâce à l'utilisation de substrats donneurs de type L- $\gamma$ -glutamylanilides substitués en position *para* par des groupements électrodonneurs et électroattracteurs afin d'effectuer une courbe de Hammett<sup>83</sup>. Il a été montré au Schéma 8 que l'étape limitante de ce mécanisme était la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique afin de donner l'intermédiaire acyl-enzyme. Cette décomposition passe par le bris du lien C-N liant le groupement carbonyle de l'entité  $\gamma$ -glutamyle et le groupe partant de type aniline substituée en position *para*. Il y aurait également protonation concertée de l'azote de cette aniline. Aussi, selon la nature du substituant en position *para* du substrat donneur, il est possible que le bris du lien C-N soit plus ou moins avancé par rapport à la protonation de l'azote. Les

résultats obtenus au cours de cette étude avaient permis d'obtenir, dans le cas des substituants électrodonneurs dont le  $pK_a$  ressemble un peu aux  $pK_a$  des substrats accepteurs utilisés dans notre étude, une valeur de  $\beta_{gp}$  pour la courbe de Brønsted de 0,43 (après avoir utilisé les données de la courbe de Hammett et les avoir converties en ce type de courbe). Pour ces substrats donneurs, l'état de transition de l'étape limitante a été proposé comme étant formé d'un lien C-N court (le bris de ce lien n'étant pas très avancé) et d'un lien N-H assez long (la protonation étant favorisée par ce type de substituant). Le Schéma 13 montre un diagramme d'énergie représentant cette étape.



**Schéma 13.** Diagramme d'énergie représentant les étapes d'acylation<sup>83</sup> et de désacylation de la réaction de transpeptidation de la GGT. X représente le nucléophile de la GGT, Ar, un groupement aryle substitué en position *para* par un groupement électrodonneur et R, la modification effectuée sur la L-méthionine dans cette étude.

Si la loi de réversibilité microscopique pour l'étape d'acylation est respectée<sup>91</sup>, il serait possible de dire que l'intermédiaire acyl-enzyme serait dégradé

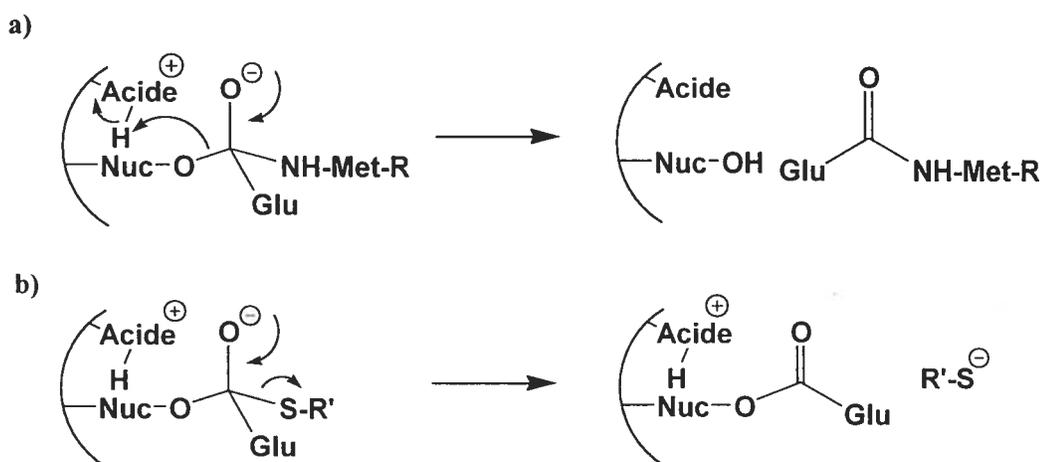
par les réactions inverses, donc par une attaque nucléophile efficace et une protonation difficile à réaliser pour ce type de composé. Il s'agit exactement du mécanisme que nous avons proposé au Schéma 12 pour la désacylation par aminolyse catalysée par la GGT. En effet, les résultats obtenus à la section 3.2 confirment ce mécanisme. Il est certain que le type de composés utilisés dans les étapes d'acylation et de désacylation sont différents (anilines substituées en position *para* par rapport à des dérivés de la L-méthionine), alors le Schéma 13 est qualitatif et se veut une représentation de la loi de réversibilité microscopique pouvant expliquer les résultats obtenus.

Le mécanisme proposé pour l'étape de désacylation au Schéma 12 peut jeter quelques lumières quant à la mauvaise réactivité d'autres substrats accepteurs testés. En effet, les amines primaires autres que les acides aminés se sont avérées de faibles substrats accepteurs. Pourtant, le groupement  $\alpha$ -ammonium aurait été un nucléophile suffisant pour effectuer l'attaque sur l'intermédiaire acyl-enzyme. Dans ce cas, il est fort possible que l'absence de liaison du composé par l'enzyme explique cette mauvaise réactivité. En effet, l'absence du groupement  $\alpha$ -carbonyle dans ces composés mènerait à une mauvaise liaison (sinon aucune) dans le site de liaison du substrat accepteur, donc à de faibles valeurs de vitesse de catalyse. Il pourrait donc y avoir dégradation de l'intermédiaire acyl-enzyme par ces composés, mais la réaction ne serait pas efficace dû à la faible liaison à l'enzyme. Ces résultats confirment donc la nécessité d'acides aminés comme substrats accepteurs efficaces de la GGT<sup>9</sup>.

Dans le cas des dérivés alcools, il a été montré que la présence d'un groupement  $\alpha$ -carboxylate et d'un centre chiral de configuration absolue L sont nécessaires à la liaison d'un alcool par l'enzyme grâce à l'étude de l'acide L-lactique. En effet, les autres alcools utilisés n'ont eu absolument aucun effet sur la réaction d'hydrolyse de l'intermédiaire acyl-enzyme. Cela pourrait être dû à la plus faible nucléophilie du groupement hydroxyle par comparaison avec celle du groupement  $\alpha$ -ammonium des dérivés de la L-méthionine utilisés dans notre étude. Il pourrait y avoir une très faible réactivité, mais elle n'a pas été observée par spectrophotométrie

UV-Vis utilisant le substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide. Une détection par HPLC, beaucoup plus précise, serait peut-être envisageable afin de voir si cette réaction est réellement effectuée<sup>51</sup>. Il faut dire que la GGT est capable de cliver, quoique peu efficacement, des liens ester<sup>55</sup>. Cette activité estérase de la GGT mérite d'être étudiée plus en détail.

Enfin, l'utilisation de dérivés thiolés n'a pas montré une grande réactivité dans la réaction de thiolysse de l'intermédiaire acyl-enzyme. Ceci pourrait être expliqué par la structure de l'intermédiaire tétraédrique formé, tel que montré à la Figure 19.



**Figure 19.** Dégradation de l'intermédiaire tétraédrique formé au cours de la réaction de désacylation. a) Intermédiaire tétraédrique formé d'un lien C-O et d'un lien C-N, b) Intermédiaire tétraédrique formé d'un lien C-O et d'un lien C-S. R représente la modification effectuée sur la L-méthionine dans cette étude et R' représente une chaîne alkyle.

Dans la Figure 19, l'intermédiaire tétraédrique **a** est formé à la suite de l'attaque nucléophile d'un dérivé de la L-méthionine. Lors du bris de cet intermédiaire tétraédrique, le lien C-O avec le nucléophile de l'enzyme sera plus facile à briser que le lien C-N nouvellement formé grâce à la présence d'un acide général (montré par la courbe pH-vitesse à la Figure 18), ce qui va permettre de

regénérer l'enzyme libre et de libérer le composé L- $\gamma$ -Glu-méthionine modifiée. L'intermédiaire tétraédrique **b** est, quant à lui, formé par l'attaque d'un dérivé thiolé sur l'intermédiaire acyl-enzyme. Lors du bris de cet intermédiaire tétraédrique, le meilleur groupe partant est le thiol, et non l'alcool (le nucléophile), alors il y aura régénération de l'intermédiaire acyl-enzyme de départ et libération d'un thiolate libre. Le dérivé soufré peut exister sous sa forme anionique. Ainsi, l'attaque d'un thiol sur l'intermédiaire acyl-enzyme ne sera pas efficace et ne permettra pas à la réaction d'effectuer une thiolysse menant à la formation d'un nouveau produit thioester. Plusieurs cinétiques chimiques ont été effectuées sur des composés contenant des liens ester, amide et thioester<sup>109,125</sup>. Le lien C-S est généralement celui qui est brisé en premier, dû à la présence d'un bon groupe partant en le thiolate, mais cela dépend beaucoup du  $pK_a$  de l'alcool présent et de la présence d'un acide général permettant de protoner le nucléophile ainsi libéré.

Après toutes ces études effectuées avec différents types de composés pouvant agir comme substrat accepteur, il semble peu probable que la GGT puisse réagir avec d'autres substrats accepteurs que les acides aminés au niveau physiologique. Les résultats obtenus au cours de l'étude à l'aide des dérivés de la L-méthionine peuvent cependant nous aider à déterminer le rôle exact de la GGT au niveau physiologique. En effet, certains auteurs pensent que la réaction principale de la GGT au pH physiologique de 7,4 est l'hydrolyse<sup>45</sup>. Cependant, cette étude a été effectuée seulement en présence de la L-méthionine comme substrat accepteur, alors que plusieurs autres acides aminés sont présents au niveau du rein et à de plus hautes concentrations que celles utilisées dans l'étude. Certains ont proposé qu'à pH 7,4, l'intermédiaire acyl-enzyme pouvait être dégradé aussi efficacement par hydrolyse ou par aminolyse et qu'à pH 8,0, l'aminolyse était la réaction prédominante<sup>46</sup>. Au cours de notre étude présentée ici, la constante de partage ( $K_{iab}$ ) a été utilisée afin de déterminer les valeurs de  $k_{cat,b}^{norm} / K_b$ . La constante de partage est définie comme la concentration de nucléophile nécessaire afin d'obtenir une vitesse d'hydrolyse égale à la vitesse d'aminolyse<sup>126</sup>. Ainsi, plus la valeur de la constante de partage est faible, plus le nucléophile est efficace pour réaliser l'aminolyse. Les valeurs de constante de

partage obtenues au cours de notre étude vont de 1,21 mM (pour le composé L-méthioninamide (**19f**)) à 4,99 mM (pour le composé L-méthionyl(2,2,2-trifluoroéthylamide (**19a**))). Le composé **19f** possède un  $pK_a$  de 7,50, ce qui constitue la valeur la plus près de celles des acides aminés ( $pK_a$  environ de 9,2<sup>3</sup>) pouvant agir comme substrat accepteur au niveau physiologique. Sachant que la concentration des divers acides aminés au niveau du rein est de 3,11 mM<sup>46</sup>, il est possible de penser que cette concentration est au-delà de la constante de partage, donc la réaction d'aminolyse (de transpeptidation) serait la réaction la plus efficace au niveau physiologique.

Ces études ont donc permis de préciser pour la première fois le mécanisme de la désacylation par aminolyse de la GGT. Cependant, plusieurs points demeurent à éclaircir, notamment la nature de la base générale pouvant agir au niveau de la déprotonation du substrat accepteur et celle du nucléophile présent dans les GGT de mammifères. En effet, il a déjà été démontré que les résidus Glu-108 et His-383 pourraient jouer un rôle dans la déprotonation du substrat accepteur, mais peu d'informations sont disponibles à ce niveau (voir la section 1.1.6.2). Au niveau du nucléophile, la thréonine 381, conservée chez toutes les espèces de GGT, est le nucléophile dans la GGT de *E. coli*<sup>74</sup>. Il est possible de croire que ce résidu joue également ce rôle dans la GGT de mammifère. Afin de préciser le rôle de ces résidus et trouver d'autres résidus pouvant être impliqués dans ce mécanisme, il est nécessaire de posséder une source de GGT recombinante permettant la mutation de certains résidus et la cristallisation de l'enzyme. Ce sujet sera discuté au cours du prochain chapitre.

Les résultats de ces travaux ont été publiés dans un article du journal *Biochemistry*<sup>127</sup>.

## **CHAPITRE 4**

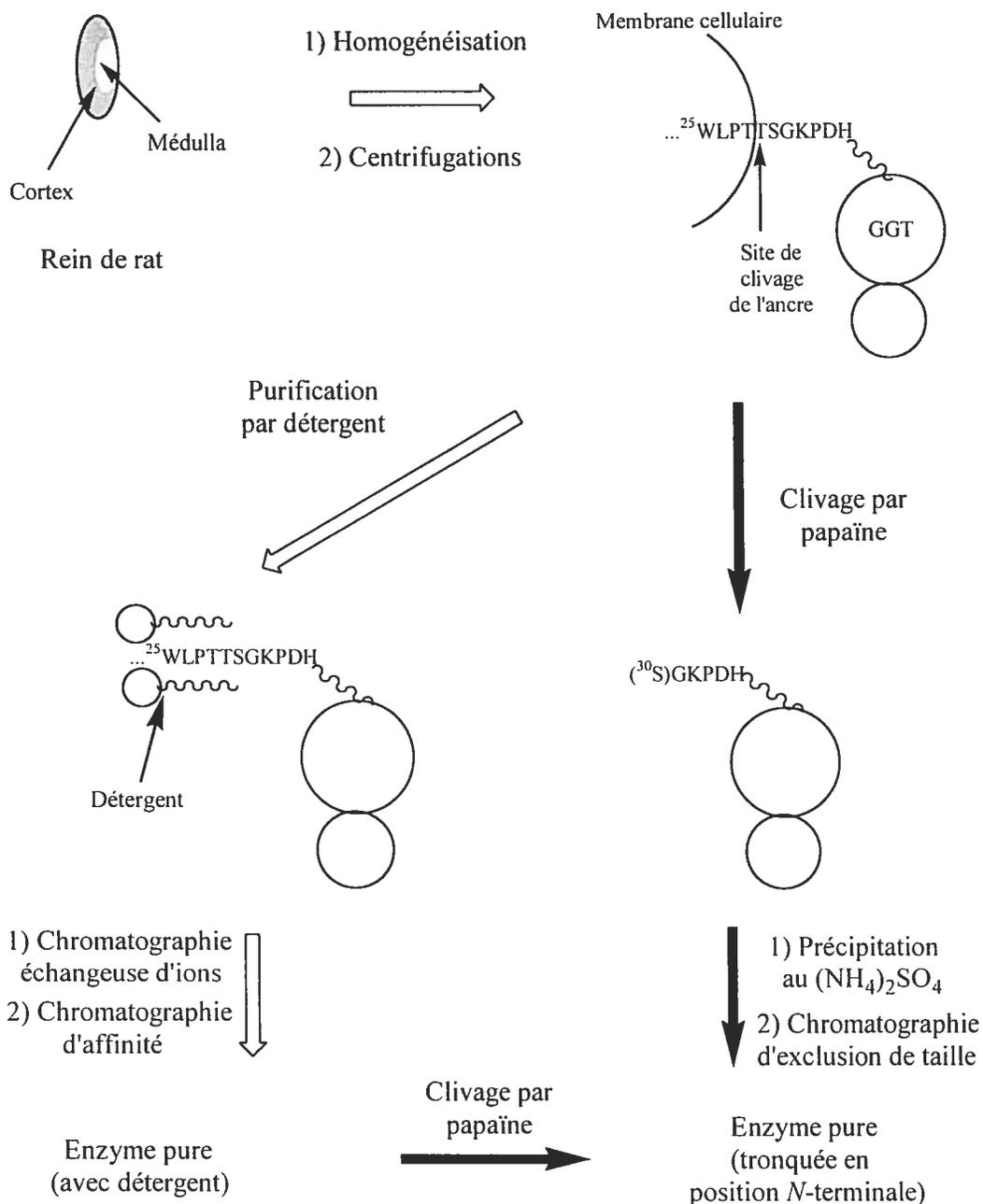
**Expression et purification de la GGT  
humaine dans la levure *Pichia pastoris***

## 4.1 Introduction

Dans les chapitres précédents, la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase a été étudiée en détail au niveau mécanistique. En effet, plusieurs informations sont maintenant connues au niveau de l'étape limitante des réactions d'acylation et de désacylation, ce qui a permis de proposer un rôle pour la GGT au niveau physiologique. Cependant, beaucoup de données manquent quant à la structure de l'enzyme. Par exemple, aucune structure cristalline à basse résolution de la GGT n'est disponible, malgré l'obtention de cristaux par certains chercheurs<sup>59,60</sup>. De plus, dans le mécanisme catalytique proposé, des acides aminés jouent le rôle d'acide/base général, mais la nature de ceux-ci n'est pas encore connue, notamment pour les GGT de mammifère. Afin d'obtenir plus d'informations à ces niveaux, une grande quantité de GGT pouvant être modifiée par mutagenèse dirigée doit être disponible pour permettre des études de cristallographie. Plusieurs types de GGT ont été purifiés dans différents systèmes.

### 4.1.1 Purification de GGT endogène

Pour débiter, la GGT de mammifère a été depuis longtemps purifiée à partir de certains organes. C'est le cas notamment de la GGT de rein de rat, enzyme la plus étudiée dans la littérature<sup>9</sup>. Il s'agit également de la source de GGT utilisée dans les études effectuées dans les chapitres précédents. Le Schéma 14 représente les différents protocoles possibles pour purifier cette enzyme<sup>21,83,128</sup>. Des variantes de ce protocole sont généralement faites lorsque la GGT d'autres mammifères est purifiée.



**Schéma 14.** Protocole de purification de la GGT de rein de rat par clivage à la papaïne ou par détergent<sup>21,83</sup>. Les acides aminés de l'ancre transmembranaire sont représentés par un code à une lettre<sup>3</sup>.

Les reins, frais ou congelés<sup>128</sup>, sont coupés en deux, puis la médulla, le centre du rein, est enlevé. En effet, il a déjà été démontré que la GGT se retrouve dans le cortex du rein<sup>129</sup>. Par la suite, des homogénéisations et une série de centrifugations permettent d'obtenir une suspension de membranes contenant de la GGT<sup>128</sup>. Il est

important de se rappeler que la GGT de mammifère est une enzyme transmembranaire dont la grande sous-unité est rattachée par une ancre hydrophobe à la membrane. Par la suite, deux protocoles de purification existent. Le premier (voie en noir, Schéma 14) consiste à utiliser la papaïne, une protéase à cystéine bien connue, qui clive la GGT au niveau de cette ancre, de manière à la libérer des membranes<sup>21</sup>. Il a été démontré que ce clivage n'affecte en rien l'activité de l'enzyme<sup>130,131</sup>. Cependant, la papaïne est une enzyme peu spécifique, ce qui peut mener à un clivage de l'ancre transmembranaire après la thréonine en position 29 ou après la sérine en position 30, mais ceci ne modifie pas la catalyse effectuée par l'enzyme<sup>10</sup>. L'autre protocole (voie en blanc, Schéma 14) consiste à utiliser un détergent, généralement du Triton X-100, afin d'extraire l'enzyme de la membrane. Le Triton X-100 est un détergent non ionique formé d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe qui réussit bien à stabiliser les résidus hydrophobes formant l'ancre transmembranaire<sup>131</sup>. Ceci est cependant effectué avec toutes les protéines membranaires présentes.

Par la suite, une purification exhaustive de l'enzyme est nécessaire. Dans le cas de l'enzyme obtenue à la suite du clivage à la papaïne, une précipitation des protéines présentes avec du sulfate d'ammonium  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ , puis une chromatographie d'exclusion de taille, permettent d'obtenir de la GGT pure avec une activité spécifique d'environ 840 U/mg et un rendement de 52 %<sup>83</sup>, ce qui correspond bien aux valeurs obtenues dans la littérature<sup>21</sup>. Dans le cas de la voie utilisant le détergent, la purification est effectuée par chromatographie échangeuse d'ions, puis par chromatographie d'affinité grâce aux sucres présents sur la GGT. Ceci permet d'obtenir de la GGT avec une activité spécifique de 652 U/mg et un rendement de 16 %<sup>21</sup>. Cependant, lorsque ce protocole est utilisé, le détergent est toujours présent avec l'enzyme, ce qui peut interférer dans les études cinétiques effectuées<sup>131</sup>. Il doit toujours y avoir un peu de détergent dans les tampons utilisés afin de solubiliser l'enzyme. De plus, l'utilisation de détergent rend la purification de la GGT moins efficace, tant au niveau du rendement que de l'activité spécifique de l'enzyme, par comparaison avec le protocole utilisant la papaïne<sup>21</sup>. Il est également possible de

cliver l'ancre transmembranaire de la protéine purifiée afin de donner une forme d'enzyme exempte de traces de détergents.

Le protocole utilisant la papaïne a été utilisé dans toutes les purifications de GGT effectuées dans notre laboratoire. Une masse d'environ 30 g de reins de rat (correspondant à environ 25-30 reins de rat) a été nécessaire pour obtenir, après 3 jours de purification, environ 1,5 mg d'enzyme<sup>83</sup>. Cette quantité est suffisante pour effectuer des études cinétiques, mais ne permet pas de réaliser aisément des études en état pré-stationnaire (mélangeur à inhibition rapide, mélangeur à flux arrêté, voir le Chapitre 2), ni des études de cristallisation. De plus, puisque l'enzyme est purifiée à partir de l'organe, l'accès aux techniques de mutagenèse dirigée est impossible. Enfin, il existe une grande hétérogénéité au niveau des sucres présents sur l'enzyme, ce qui donne plusieurs isoenzymes d'activité assez similaire<sup>13</sup>. Il est donc nécessaire de se tourner vers d'autres techniques permettant de combler ces lacunes.

Des chercheurs ont voulu étudier la GGT de la bactérie *E. coli*. En effet, les bactéries croissent assez rapidement, ce qui permet un accès rapide à une grande quantité d'enzyme de manière peu onéreuse. De plus, les bactéries ne possèdent pas la machinerie nécessaire pour incorporer des sucres sur l'enzyme, ce qui diminue l'hétérogénéité de l'enzyme obtenue<sup>3</sup>. Enfin, la GGT de la souche *E. coli* K-12 est soluble (aucune ancre transmembranaire n'est présente), ce qui facilite grandement la purification de l'enzyme<sup>15</sup>. Des chercheurs ont donc tenté de purifier la GGT de la bactérie *E. coli* K-12 qui possède environ 31 % d'identité avec la GGT de mammifère (voir Tableau II).

Le protocole utilisé au cours de la purification est un peu différent de celui de la GGT de mammifère, dû à l'absence de l'ancre transmembranaire. Le bris de la membrane des bactéries a été effectué avec le lysozyme<sup>15</sup>. Ensuite, la GGT ainsi libérée avec d'autres enzymes a été précipitée avec du sulfate d'ammonium, puis cinq étapes de purification par chromatographie (échangeuse d'ions, exclusion de taille, pH, etc) ont dû être effectuées<sup>4</sup>. Malheureusement, ces nombreuses étapes se sont

soldées par l'obtention d'une enzyme pure, mais avec une activité spécifique de 1,40 U/mg. La différence est donc assez grande comparativement à l'activité spécifique obtenue pour la GGT de mammifère. Au niveau du rendement, une quantité d'environ 60 mg de cette enzyme a pu être isolée, mais ceci provient de 250 L de culture et en utilisant un fermenteur<sup>4</sup>. Cependant, cet instrument n'est pas présent dans tous les laboratoires effectuant de la biologie moléculaire. Enfin, des études cinétiques ont été réalisées avec cette enzyme. Il semble que celle-ci ne puisse pas effectuer l'étape de transpeptidation en présence de substrats accepteurs, mais seulement l'étape d'hydrolyse, ce qui est montré par les constantes cinétiques obtenues pour divers substrats donneurs<sup>4</sup>. Cette source d'enzyme ne constitue donc pas un bon modèle pour l'étape de désacylation, mais elle a tout de même permis d'obtenir des cristaux avec une faible résolution donnant des informations générales quant à la position d'hélices  $\alpha$  et de feuillets  $\beta$ <sup>59,60</sup>.

Il est ensuite possible de passer à un autre système afin de pouvoir isoler en grande quantité de la GGT. Plusieurs souches de la levure *S. cerevisiae* possèdent de la GGT<sup>132</sup>. La GGT de cet organisme possède une ancre transmembranaire et est située dans les vacuoles<sup>6</sup>. Des chercheurs ont réussi à purifier les vacuoles d'une souche de levure de *S. cerevisiae* pour obtenir une activité spécifique de 0,013 U/mg, ce qui est très faible<sup>17</sup>. Cependant, cette GGT était toujours liée à la membrane, ce qui peut expliquer cette valeur. Cette enzyme semble être impliquée dans le transport vacuolaire du glutathion, mais aucune mention n'est faite quant à la possibilité de liaison de substrats accepteurs, donc de la présence d'activité transpeptidase<sup>6</sup>. Ce système ne permet donc pas d'obtenir de la GGT en grande quantité et plusieurs incertitudes demeurent quant aux réactions catalysées.

Les protocoles de purification décrits plus haut permettent donc d'obtenir de la GGT en grande quantité dans certains cas, mais des problèmes d'activité spécifique sont présents. De plus, il est très difficile de modifier la protéine produite par mutagenèse dirigée. Il faut alors se tourner vers un système permettant de produire de l'enzyme facilement et efficacement de manière recombinante.

### 4.1.2 Purification de GGT recombinante

L'une des méthodes les plus fréquemment utilisées maintenant dans le domaine de l'enzymologie est d'exprimer une enzyme d'un organisme dans un autre organisme propice à la production de protéines recombinantes. Par exemple, plusieurs enzymes de mammifères sont exprimées dans des cellules de bactéries, puis purifiées<sup>133</sup>. L'enzyme recombinante est généralement obtenue en grande quantité et sans grand problème de purification. De plus, l'absence de glycosylation dans les bactéries peut s'avérer un avantage<sup>3</sup>. La GGT provenant de différents organismes a été exprimée dans plusieurs systèmes. Le Tableau XIV fait un résumé des résultats obtenus qui seront expliqués un peu plus loin.

**Tableau XIV.** Résumé de l'expression de GGT recombinante effectuée dans différents systèmes dans la littérature.

GGT provenant de ...	Système d'expression utilisé	Activité spécifique (U/mg)	Activité obtenue (U)
<i>E. coli</i> K-12 <sup>134</sup>	<i>E. coli</i> K-12 mutée	Active	--- <sup>a</sup>
<i>H. pylori</i> <sup>135</sup>	<i>E. coli</i>	0,22	---
Rein de rat <sup>136</sup>	<i>E. coli</i>	0,054	11
Rein de rat <sup>137</sup>	<i>S. cerevisiae</i>	0,25	2,0
Humain <sup>138,139</sup>	Cellules V79	157 <sup>138</sup> , 1100 <sup>139</sup>	---
Humain <sup>63</sup>	Cellules COS	3,6	---
Humain <sup>14,140</sup>	Cellules Sf21	13 <sup>140</sup> , 440 <sup>14</sup>	158

<sup>a</sup>Aucune donnée n'est indiquée à ce niveau dans la référence citée.

Quelques définitions sont nécessaires afin de bien comprendre ce tableau. L'activité spécifique correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitroaniline du substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide par min et par mg d'enzyme à 37 °C dans les conditions indiquées dans la littérature<sup>13</sup>. Il s'agit donc d'une mesure d'efficacité et de pureté de l'enzyme. L'activité, quant à elle, est la valeur de l'activité spécifique multipliée par la quantité, en milligramme,

d'enzyme présente. Cela représente donc la quantité d'enzyme pouvant être obtenue par un système. Un système permettant d'obtenir un grand nombre d'unités d'enzyme avec une activité spécifique élevée sera préférable.

Des chercheurs ont donc tenté d'obtenir de la GGT de la bactérie *E. coli* K-12 en plus grande quantité et avec une activité spécifique élevée. Ils ont utilisé une souche de bactérie *E. coli* K-12 dans laquelle ils ont enlevé le gène de la GGT déjà présent afin d'obtenir une souche de bactéries mutées<sup>134</sup>. Par la suite, un plasmide (un bout circulaire d'ADN double brin) contenant le gène de la GGT d'*E. coli* K-12 a été inséré dans les bactéries K-12 mutées. Cette transformation des bactéries a permis de restaurer l'activité de la GGT<sup>141</sup>. Ainsi, le plasmide inséré dans la bactérie peut contenir le gène de la GGT ou une modification de celui-ci, donnant accès à des mutants de cette enzyme et à une foule d'informations utiles concernant son mécanisme. De plus, il est possible, avec cette technique, de surexprimer l'enzyme grâce à l'induction, au moment désiré, de la GGT. Ainsi, un contrôle quant à l'expression de l'enzyme est possible, ce qui offre beaucoup plus de flexibilité que la purification directe de l'enzyme à partir de la bactérie *E. coli* de type sauvage.

Ce système a donc permis d'obtenir de la GGT active. Cependant, plusieurs études effectuées dans ce domaine ne donnent aucune valeur précise quant au rendement de la purification. De plus, les tests d'activité sont souvent réalisés de manières différentes, ce qui empêche la bonne comparaison entre les systèmes. Par exemple, il est reporté que la transformation de la bactérie *E. coli* K-12 par un plasmide contenant la séquence de la GGT de *E. coli* a permis d'obtenir une enzyme active<sup>142</sup>. Cependant, aucune valeur numérique n'est donnée. De plus, le test d'activité est effectué à un pH de 8,73, ce qui est bien différent des conditions normalement utilisées dans les autres articles<sup>13</sup>. Cependant, la force de ce travail, quoique moins complet au niveau de la purification de l'enzyme, a été d'étudier l'auto-activation de la GGT. En effet, la GGT est une enzyme formée de deux sous-unités de masses différentes qui proviennent d'un seul précurseur<sup>9</sup>. La mutation de résidus importants dans cette réaction est alors possible. Malgré l'absence de valeurs

absolues pour l'activité, il a été possible de voir des valeurs relatives pour l'activité spécifique des différents mutants et de connaître la nature des acides aminés pouvant jouer un rôle dans cette réaction<sup>142</sup>. Ce travail a été poursuivi afin de proposer un mécanisme plausible pour cette réaction<sup>81</sup>.

La GGT recombinante de la bactérie *H. pylori* a également été obtenue<sup>135</sup>. En effet, encore une fois, la GGT peut être purifiée directement de la bactérie *H. pylori*, mais il est alors impossible d'effectuer des mutations de la séquence d'ADN. Alors, le gène codant pour l'enzyme a été placé dans un plasmide pour être transformé dans une souche de bactéries *E. coli*. Cependant, là encore, une faible activité spécifique de 0,22 U/mg de protéine a été obtenue et aucune mention n'est faite par rapport au rendement de l'enzyme après la purification. De plus, aucune indication n'est donnée quant aux réactions catalysées par cette enzyme recombinante.

Des chercheurs ont tenté d'exprimer de la GGT de rein de rat dans les bactéries *E. coli*<sup>136</sup>. Ceci offre beaucoup de possibilités quant à la grande quantité éventuelle de protéine déglycosylée de mammifère pouvant être obtenue de ce système. Cependant, seul le précurseur de la GGT, très peu actif, a pu être détecté. Celui-ci possède une activité spécifique de 0,054 U/mg et une quantité de 12 U d'enzyme a été obtenue à partir d'un litre de culture. Il semble donc que l'auto-activation de la GGT, menant à une forme d'enzyme active, ne soit pas possible dans ce système. Ainsi, la quantité d'enzyme obtenue est assez grande, mais il s'agit du précurseur, et non de l'enzyme active normalement obtenue à partir d'une purification des reins de rat, ce qui est moins intéressant au niveau des études mécanistiques possibles.

Puisque le système bactérien semble causer des problèmes au niveau de l'auto-activation de la GGT, un système plus complexe permettant de faire des modifications post-traductionnelles, notamment la glycosylation, a été utilisé<sup>137</sup>. Les levures, des eucaryotes simples, sont capables de les réaliser. La levure *S. cerevisiae*, communément appelée la levure du boulanger<sup>143</sup>, a servi d'hôte pour le gène de GGT

de rein de rat. La GGT recombinante obtenue dans ce système a été auto-activée pour former les deux sous-unités normalement présentes. De plus, cette enzyme est capable d'effectuer de la transpeptidation. Cependant, une activité spécifique faible de 0,25 U/mg a été obtenue et une quantité de 2 U peut être purifiée à partir d'un litre de culture. De plus, les conditions utilisées pour déterminer l'activité spécifique de la GGT diffèrent. En effet, le substrat donneur utilisé est le L- $\gamma$ -glutamyl-3-carboxy-*p*-nitroanilide, reconnu pour être plus soluble que le L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide, qui possède des propriétés cinétiques similaires, mais ce premier n'a pas été très étudié<sup>144</sup>. Il s'agit tout de même d'une amélioration importante par rapport au système bactérien, mais des modifications doivent être apportées.

Un système d'expression dans les cellules V79 a également été fait<sup>138,139</sup>. Les cellules V79 sont des fibroblastes de poumon de hamsters et permettent l'insertion d'un gène dans leur génome, ce qui assure une production stable et constante de la protéine d'intérêt. Les cellules V79 ont donc été transfectées (et non transformées, lorsqu'il s'agit de cellules de mammifère) avec un plasmide contenant le gène de la GGT humaine. Une purification utilisant la papaïne et une colonne de chromatographie échangeuse d'ions a permis d'obtenir de la GGT recombinante ayant une activité spécifique de 157 U/mg<sup>138</sup>. L'utilisation d'autres étapes de purification de chromatographie a permis d'obtenir une activité spécifique de 1100 U/mg<sup>139</sup>. Cette enzyme, sous forme hétérodimérique, est également capable de faire de la transpeptidation. Ce système s'avère donc l'un des plus avantageux, mais il nécessite l'établissement de lignées de cellules stables contenant le gène de la GGT, ce qui est assez laborieux, surtout si une banque de mutants de la protéine est générée. Un dérivé de ce système a été fait dans les cellules CHO (cellules ovariennes de hamster chinois) par le même groupe<sup>145</sup>. Cette lignée stable serait plus facile à manipuler que les cellules V79. Les résultats préliminaires semblent indiquer que de la GGT recombinante humaine est obtenue, mais aucune donnée n'est indiquée. Toutefois, le temps requis à l'établissement de ce type de cellule demeure tout de même assez grand.

Des cellules COS ont également été transfectées avec un plasmide contenant le gène de la GGT humaine. Les cellules COS sont dérivées de cellules de singe modifiées par un virus<sup>146</sup>. Dans ce cas, au cours de la transfection, aucune insertion ne s'est faite dans leur génome, ce qui donne une expression appelée transitoire. Il est beaucoup plus aisé d'établir ce type de lignée cellulaire par rapport à une expression stable. Cependant, les cellules vont perdre, dû à l'absence de pression sélective au cours des divisions cellulaires, le plasmide inséré, alors le travail devra être recommencé<sup>3</sup>. Une enzyme active avec 3,6 U/mg a été obtenue, mais elle est toujours attachée aux membranes<sup>63</sup>. Aucun rendement n'a été donné dans l'article. Alors, il ne s'agit pas d'une très bonne technique pour obtenir de la GGT en grande quantité à long terme puisqu'il ne sera pas possible de conserver longtemps la souche transfectée.

Enfin, la GGT recombinante a été obtenue dans des cellules d'insectes<sup>140</sup>. Les cellules d'insectes *Sf9* (ou *Sf21*) effectuent les modifications post-traductionnelles généralement présentes chez les mammifères. Elles sont infectées par des baculovirus contenant le gène de la GGT humaine. Ce type de manipulations a permis d'obtenir de la GGT, toujours liée aux membranes, possédant une activité spécifique de 13 U/mg. Cette valeur a été améliorée par un autre groupe de recherche grâce à la purification de l'enzyme par chromatographie (hydroxylapatite, isoélectrique et exclusion de taille), ce qui a donné une activité spécifique de 440 U/mg et un rendement de 0,36 mg pour  $2 \times 10^8$  cellules d'insecte. Ce système permet donc d'obtenir de la GGT active en assez bonne quantité pour le nombre de cellules d'insectes utilisées. Cependant, il s'agit d'une technique longue, nécessitant l'établissement des baculovirus contenant le gène de la GGT, un nombre assez élevé de cellules qui, malheureusement, croissent lentement (une nouvelle génération à chaque 18-24 heures<sup>147</sup>), des précautions quant à la possible contamination des milieux de culture, etc. Cette technique est également très onéreuse au niveau du milieu de culture à utiliser.

Les techniques énumérées ici ont donc permis d'obtenir de la GGT recombinante. Cependant, l'activité spécifique n'est pas toujours très grande, une purification exhaustive n'a pas été effectuée, le rendement est parfois faible, etc. Il est donc nécessaire de trouver un système permettant de combler ces lacunes. Depuis quelques années, un système d'expression utilisant la levure *Pichia pastoris* a été de plus en plus utilisé pour diverses protéines<sup>148,149</sup>. Les avantages de cette dernière sont nombreux. La levure *P. pastoris* est un eucaryote unicellulaire capable de faire des modifications post-traductionnelles similaires aux eucaryotes plus complexes, telles l'activation de protéines, un repliement efficace de celles-ci et leur glycosylation<sup>150</sup>. De plus, puisqu'il s'agit d'un organisme unicellulaire, il est aussi facile de le manipuler que les bactéries et peut être utilisé à forte densité dans un fermenteur. Leur manipulation est beaucoup plus facile et moins chère que les cellules de mammifère et leur temps de génération est assez court (environ 2 heures). Enfin, il est reconnu que la quantité de protéine recombinante obtenue est 10 à 100 fois plus grande que dans la levure *S. cerevisiae*, selon les protéines exprimées<sup>148</sup>.

L'une des caractéristiques de cette levure est sa capacité à métaboliser du méthanol comme seule source de carbone, ce qui en fait une levure méthylothrophique<sup>150</sup>. Afin d'y arriver, une enzyme appelée oxydase d'alcool (AOX1) est formée en grande quantité par la levure. L'expression de cette enzyme est sous le contrôle d'une petite séquence d'ADN appelée un promoteur. Selon les constituants du milieu de culture (présence de méthanol ou d'un sucre), il y aura expression ou non de cette protéine. Ainsi, il est possible de placer un gène d'intérêt après ce promoteur qui sera sous le même type de contrôle que l'enzyme AOX1. Cette caractéristique permettra d'induire l'expression de GGT par cette levure au moment désiré.

Pour toutes ces raisons, il est possible de croire qu'une bonne quantité de GGT humaine recombinante pourrait être obtenue au moment désiré dans un système utilisant la levure *P. pastoris*. De plus, le gène de la GGT pourrait être préalablement modifié afin de produire une enzyme exempte d'ancre transmembranaire, sécrétée

dans le milieu de culture par la levure et liée à six histidines et à un épitope *c-myc* (série de 10 acides aminés spécifiques) à la position C-terminale afin de faciliter sa purification par rapport aux autres systèmes d'expression déjà existants. Cependant, plusieurs étapes sont à franchir avant d'atteindre cet objectif et il est nécessaire de vérifier les caractéristiques de cette enzyme modifiée. Le Tableau XV contient les différentes expériences à réaliser pour obtenir de la GGT recombinante.

**Tableau XV.** Liste des différentes étapes à franchir afin de mettre au point un nouveau système d'expression de GGT humaine recombinante dans la levure *P. pastoris*

Section	Étapes à réaliser
4.2.1	Clonage du gène de la GGT humaine dans un plasmide et transformation des bactéries <i>E. coli</i>
4.2.2	Linéarisation du plasmide purifié et transformation des levures <i>P. pastoris</i>
4.2.3	Purification de l'ADN génomique et vérification de l'intégration du gène
4.2.4	Vérification de l'expression de la GGT dans <i>P. pastoris</i>
4.2.5	Optimisation des conditions d'expression de la GGT
4.2.6	Purification de la GGT humaine recombinante
4.2.7	Caractérisation de la GGT humaine recombinante

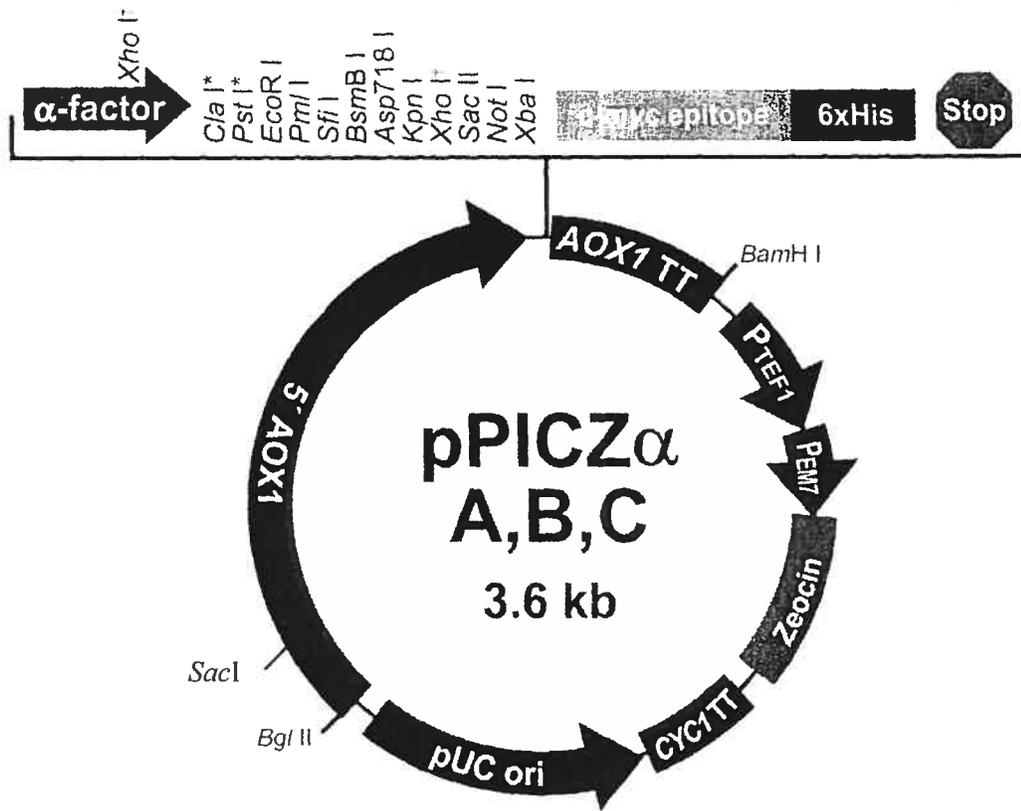
Chacune de ces étapes sera décrite dans les sections suivantes et les résultats obtenus seront discutés en détail.

## 4.2 Résultats

### 4.2.1 Clonage du gène de la GGT humaine dans un plasmide et transformation des bactéries *E. coli*

Pour débiter, il est nécessaire de fabriquer un plasmide contenant le gène de la GGT humaine. En effet, ce plasmide pourra ensuite être introduit dans la levure *P. pastoris* qui se mettra, alors, à exprimer la GGT. Cependant, il faut judicieusement choisir le plasmide à utiliser et faire les modifications nécessaires au gène de la GGT afin d'obtenir l'enzyme désirée à la fin. Dans notre cas, la GGT voulue n'aurait pas d'ancre transmembranaire, serait sécrétée et posséderait une série de six histidines à la fin de la petite sous-unité. L'absence de l'ancre permettrait de mieux purifier l'enzyme en évitant de la cliver par protéolyse. Ensuite, l'enzyme pourrait être sécrétée dans le milieu de culture par la levure, au lieu d'être intracellulaire, grâce à un facteur de sécrétion, ce qui rendrait les manipulations subséquentes plus faciles pour isoler l'enzyme. Enfin, la présence de six histidines (communément appelé « His-tag ») à la position C-terminale de l'enzyme en permet une purification efficace. En effet, il est possible d'utiliser ces acides aminés afin d'effectuer une purification par chromatographie d'affinité. Ces six histidines peuvent se lier facilement à des atomes de nickel fixés à une matrice, éliminant ainsi beaucoup d'impuretés provenant des levures. Le mode de fonctionnement de ce type de chromatographie sera expliqué à la section 4.2.6.

Le plasmide choisi pouvant répondre à tous les besoins est le pPICZ $\alpha$ A de la compagnie Invitrogen. Les éléments principaux le constituant se retrouvent à la Figure 20<sup>151</sup>.



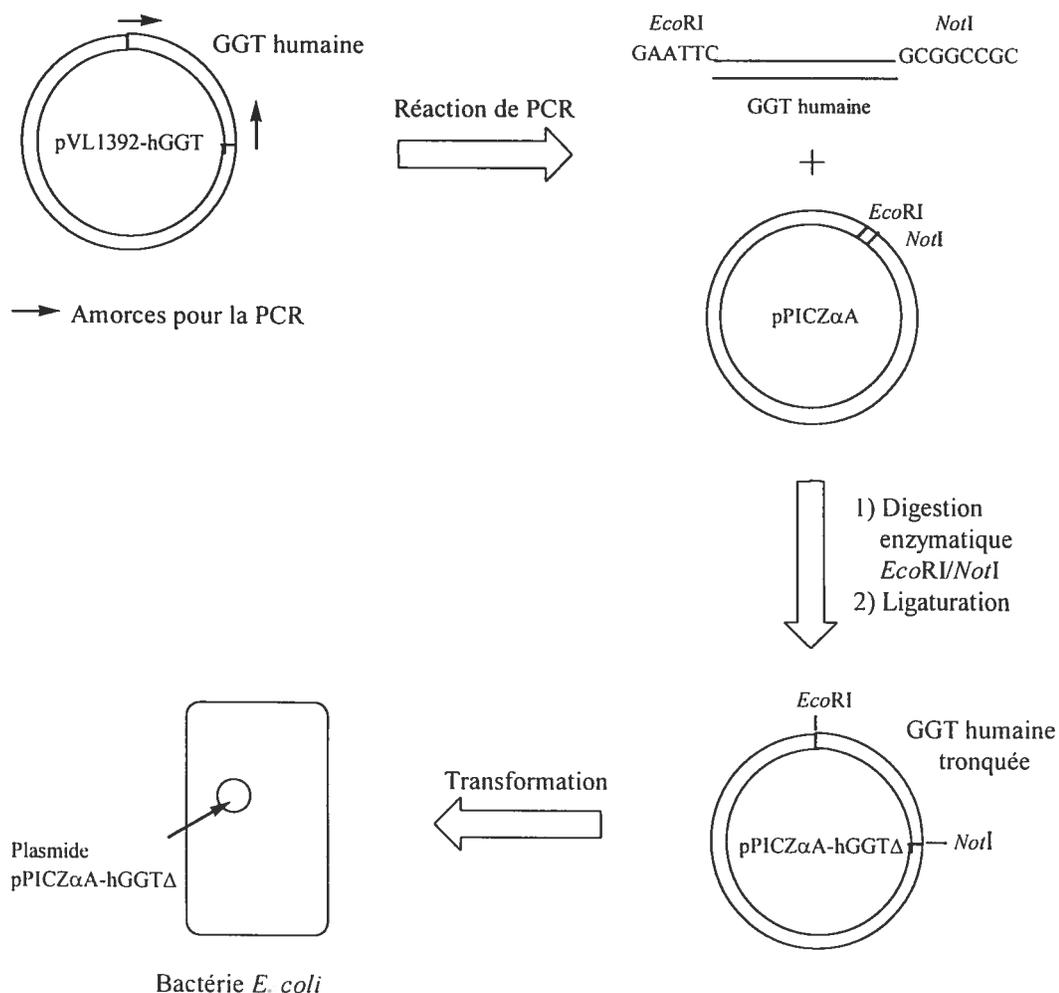
**Figure 20.** Caractéristiques du plasmide pPICZ $\alpha$ A commercial<sup>151</sup>.

Comme il a déjà été dit plus tôt, un plasmide est un double brin circulaire d'ADN. Celui présenté à la Figure 20 peut être introduit dans certaines bactéries et levures selon diverses techniques. Il possède plusieurs éléments importants permettant sa répllication dans la bactérie. Ceux-ci ne seront pas tous expliqués et certains le seront plus en détail dans d'autres sections. Pour commencer, le plasmide pPICZ $\alpha$ A contient un bout d'ADN appelé 5' *AOX1* représenté sous forme de flèche. Comme il a été expliqué plus tôt, l'enzyme *AOX1* permet de métaboliser le méthanol présent dans le milieu de culture des levures *P. pastoris*. La forme de flèche indique qu'il s'agit du bout d'ADN correspondant au promoteur, régulant l'expression, pour cette enzyme encodée dans l'ADN génomique de la levure. Lorsque ce plasmide va être introduit dans *P. pastoris*, il y aura intégration de cet ADN dans le génome de la levure. Cependant, il faut s'assurer que cette insertion se fasse au bon endroit et cette séquence permettra de nous en assurer. Le processus d'insertion du plasmide sera expliqué plus en détail à la section 4.2.2.

Dans l'agrandissement du plasmide, il existe une séquence appelée « facteur  $\alpha$  ». Il s'agit d'une séquence d'ADN de 266 paires de bases codant pour un peptide qui sera ajouté à la GGT exprimée. Celui-ci sert à diriger l'endroit où se retrouvera la protéine recombinante lorsqu'elle sera exprimée par la levure. Le facteur  $\alpha$  est reconnu pour permettre la sécrétion de la protéine dans le milieu extracellulaire, ce qui facilitera la purification de la GGT<sup>149</sup>. La levure *P. pastoris* possède l'enzyme nécessaire pour cliver ce peptide afin qu'il ne se retrouve pas à la fin sur la protéine recombinante<sup>150</sup>. À la suite de ce facteur  $\alpha$  se retrouve une série d'abréviations formées de quelques lettres et de chiffres romains et correspondent à des enzymes de restriction, capables de reconnaître une séquence bien précise d'ADN et de la cliver. Ces enzymes servent à cliver l'ADN du plasmide à un endroit bien spécifique afin d'y insérer le gène de la GGT humaine. Ensuite, une séquence d'ADN appelée épitope *c-myc* est présente. Cette séquence code pour une série de 10 acides aminés qui se retrouveront à l'extrémité C-terminale de la protéine. Il est possible de détecter cette séquence spécifique grâce à des anticorps, ce qui permet d'identifier la protéine recombinante parmi d'autres protéines provenant de la levure qui ne possèdent pas cette particularité. Enfin, dans cet agrandissement, se retrouve une séquence d'ADN correspondant à la série de six histidines (« His-tag »), ce qui facilitera la purification. Une série de nucléotides correspondant à un codon « stop » délimite la fin de la séquence d'ADN de la GGT humaine.

Ensuite, une séquence d'ADN de 347 paires de bases code pour une enzyme conférant une résistance à l'antibiotique Zeocin. Les bactéries *E. coli* et les levures *P. pastoris* ne sont pas naturellement résistantes à cet antibiotique. Ainsi, si le plasmide est bel et bien introduit dans ces organismes, ceux-ci deviendront résistants sur des milieux contenant cet antibiotique, ce qui constitue une technique de sélection des transformants. De plus, le fait de pouvoir être utilisé avec des bactéries et des levures évite l'achat de plusieurs antibiotiques différents. Cependant, cet antibiotique est très sensible à la lumière et ne doit pas être utilisé dans des milieux trop riches en sels et à tous les pH<sup>151</sup>.

Ce plasmide correspond donc bien à tous les critères pour l'expression de la GGT humaine. Le Schéma 15 représente les différentes étapes nécessaires afin de pouvoir construire ce plasmide.

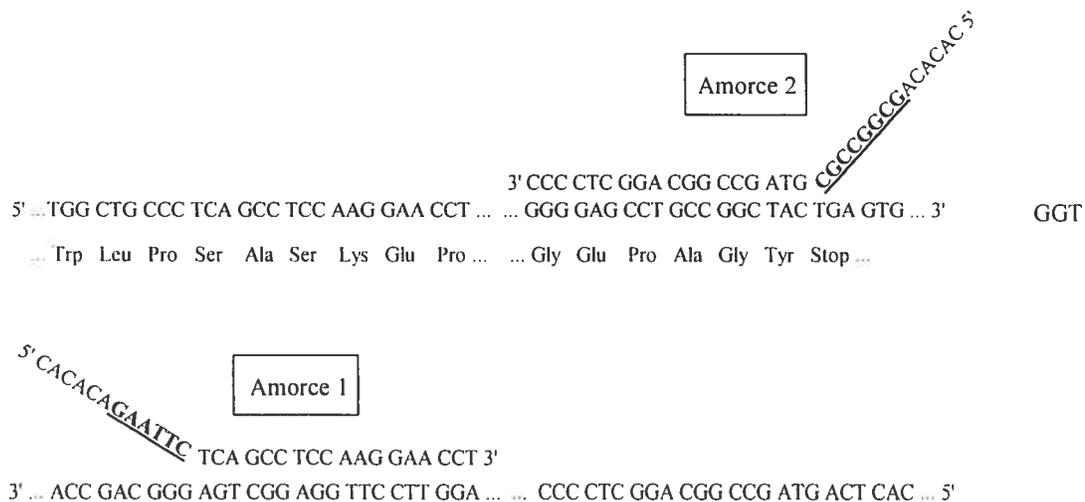


**Schéma 15.** Étapes à suivre pour effectuer le sous-clonage de la GGT tronquée dans le plasmide *pPICZαA* et la transformation dans les bactéries *E. coli*.

Le groupe de N. Taniguchi du Japon nous a gracieusement envoyé le plasmide *pVL1392-hGGT* contenant le gène de la GGT humaine provenant du foie d'un fœtus<sup>14,152</sup>. Ce plasmide a été utilisé pour exprimer la GGT dans des cellules d'insectes. Il est nécessaire d'amplifier le gène de la GGT humaine afin de pouvoir

l'insérer dans le plasmide pPICZ $\alpha$ A. Ceci peut être réalisé par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), où une matrice d'ADN est amplifiée environ  $2^{30}$  fois (selon le nombre de cycles théoriquement, mais moins en pratique) grâce à l'utilisation de deux amorces d'ADN ayant une séquence spécifique partiellement complémentaire à chaque extrémité de la séquence désirée, des nucléotides (dNTP) en grande quantité et une ADN polymérase thermorésistante<sup>153</sup>. Ainsi, la séquence d'ADN amplifiée obtenue possédera à chaque extrémité les amorces utilisées et pourra être insérée dans le plasmide voulu. Cependant, il est nécessaire de bien choisir les amorces. En effet, nous ne voulons plus de la séquence d'ADN correspondant à l'ancre transmembranaire. De plus, des enzymes de restriction devront être utilisées afin de cliver à un seul endroit le plasmide pPICZ $\alpha$ A pour y insérer le gène tronqué de la GGT préalablement digéré, mais une incompatibilité des enzymes est présente entre ce plasmide et le pVL1392-hGGT.

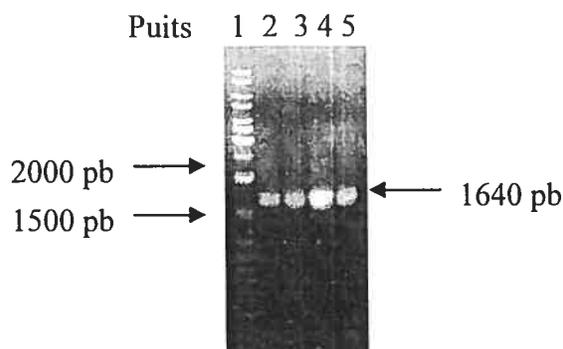
Ainsi, il est nécessaire d'insérer, dans les amorces à utiliser pour effectuer la réaction de PCR, des séquences d'ADN correspondant au site de clivage des deux enzymes de restriction (*Eco*RI et *Not*I), tel qu'indiqué au Schéma 15. Les amorces choisies sont représentées à la Figure 21.



**Figure 21.** Séquence d'ADN de la GGT humaine et séquence des amorces utilisées au cours de la réaction de PCR. Les bases azotées soulignées correspondent aux sites de restriction *Eco*RI (Amorce 1) et *Not*I (Amorce 2).

Il a donc été décidé que la première amorce contiendrait un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction *EcoRI* et qu'elle se lierait à la séquence d'ADN correspondant au résidu sérine 27 du gène de la GGT humaine, éliminant ainsi la séquence d'ADN correspondant à l'ancre transmembranaire. Une GGT tronquée débutant avec ce résidu a déjà été obtenue avec succès dans des cellules d'insectes<sup>14130</sup>. La deuxième amorce est, quant à elle, formée par le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction *NotI* qui se lierait à l'ADN correspondant au dernier acide aminé de la GGT, le résidu tyrosine 569. De cette façon, le codon « stop » servant à arrêter la traduction de l'ARN ne serait pas celui provenant du gène de la GGT, mais bien celui du plasmide situé après le « His-tag » (voir Figure 20). Ces deux sites pour les enzymes de restriction se retrouvent dans le plasmide pPICZ $\alpha$ A, ce qui permettra d'introduire l'ADN du gène de la GGT, donc faire un sous-clonage, dans ce plasmide. Il aurait été possible de choisir les séquences des amorces afin d'utiliser seulement une enzyme de restriction lors du sous-clonage, mais la ligaturation dans le plasmide pPICZ $\alpha$ A pourrait alors se faire dans les deux orientations. L'utilisation de deux enzymes de restriction permet de s'assurer de la direction de l'insertion.

La réaction de PCR a donc bien été effectuée avec les deux amorces décrites plus haut selon le protocole décrit au chapitre 6. Cette réaction a été effectuée avec la Vent DNA Polymerase, une ADN polymérase thermorésistante reconnue pour son taux d'efficacité et de précision dans la duplication de l'ADN<sup>154</sup>. Ceci a permis d'obtenir un fragment d'ADN d'environ 1700 paires de bases correspondant au gène de la GGT tronquée (hGGT $\Delta$ ). Le gel d'agarose obtenu est montré à la Figure 22. À toutes les températures testées au cours de l'amplification des brins d'ADN, le fragment d'ADN désiré a été obtenu, avec de meilleurs résultats à 56 °C.

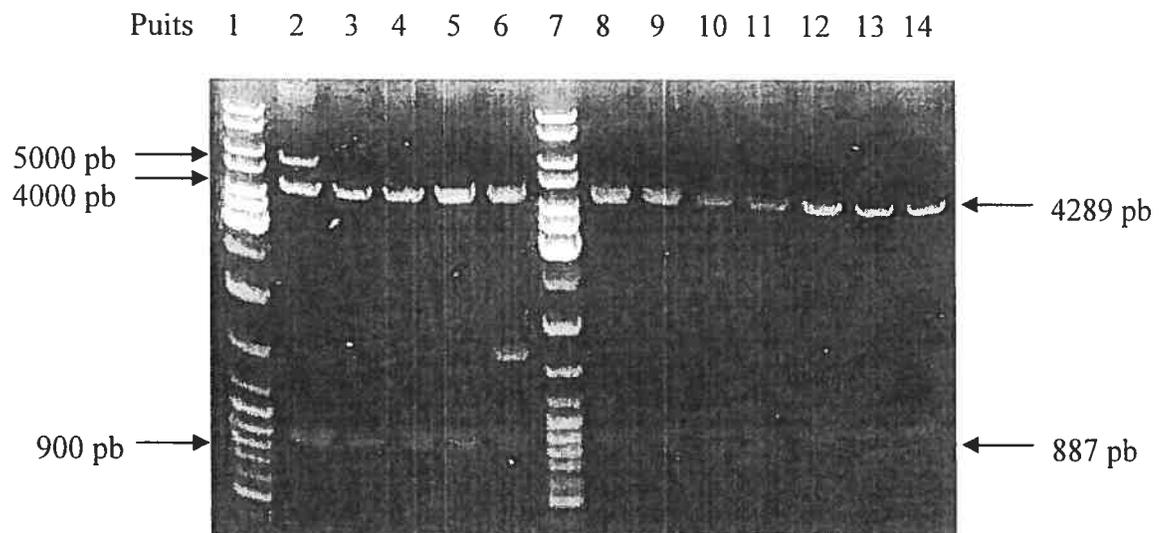


**Figure 22.** Gel d'agarose (1 %) de l'ADN obtenu à la suite de l'amplification par réaction de PCR à différentes températures du gène de la GGT sans ancre transmembranaire. Le puits 1 contient des fragments d'ADN ayant différents nombres de nucléotides (en paires de bases (pb)) et les autres puits, l'ADN obtenu par réaction à 50 °C (puits 2), à 53,8 °C (puits 3), à 56 °C (puits 4) et à 60 °C (puits 5). Les détails expérimentaux sont donnés au chapitre 6.

Par la suite, il est nécessaire de prendre l'ADN ainsi obtenu et de le digérer avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *NotI*. La même digestion est effectuée avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A commercial. Ces fragments d'ADN ont ensuite été purifiés sur gel d'agarose selon le protocole décrit au chapitre 6, puis utilisés dans une ligaturation (selon différents ratios) afin d'obtenir le plasmide désiré pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . La quantité d'ADN à cette étape est bien insuffisante pour séquencer le gène et faire des expériences dans la levure. De plus, une réserve de ce plasmide est nécessaire. Ce plasmide contenant le gène de la GGT tronquée a donc été introduit dans des bactéries *E. coli*. Cette transformation peut être effectuée de différentes façons. Ici, une électroporation a permis de faire pénétrer l'ADN grâce à un fort courant électrique appliqué à des bactéries *E. coli* dont les parois sont déjà très affaiblies. Ces bactéries nouvellement transformées ont ensuite été étalées sur une boîte de Petri contenant un milieu de culture et de l'antibiotique Zeocin. Ainsi, seules les bactéries ayant le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  pourront croître sur ce milieu sélectif, ce qui a été obtenu avec succès pour les différents ratios de ligaturation testés sans différence appréciable entre eux.

Ceci a permis d'obtenir plusieurs colonies de bactéries possédant possiblement le plasmide désiré. Il est maintenant nécessaire d'isoler l'ADN de

quelques-unes de ces colonies et de vérifier si le gène de la GGT tronquée est bien présent dans l'ADN du plasmide. En effet, il est toujours possible que ces colonies soient des faux-positifs. Des colonies ont donc été prises au hasard et ont servi à inoculer des tubes contenant un volume de 4 mL de milieu de culture LB et l'antibiotique Zeocin permettant aux bactéries transformées de croître. Ceci a été fait pour une série de 12 colonies. Par la suite, l'ADN de ces bactéries a été purifié selon un protocole du chapitre 6 pour chacun des tubes et a été utilisé pour une analyse de restriction. Ceci consiste à prendre une petite quantité d'ADN purifié, puis de le digérer avec une enzyme de restriction donnée, donnant ainsi un ou plusieurs fragments d'ADN ayant différents nombres de paires de bases. Ces nombres ne seront pas les mêmes si le gène de la GGT tronquée est présent ou non dans le plasmide. Ces bandes sont ensuite séparées sur un gel d'agarose. Cette expérience a été effectuée avec l'ADN des douze colonies isolées en utilisant l'enzyme de restriction *Bam*HI et en s'attendant à voir des bandes de 4289 et de 887 pb. Le résultat obtenu est montré à la Figure 23.

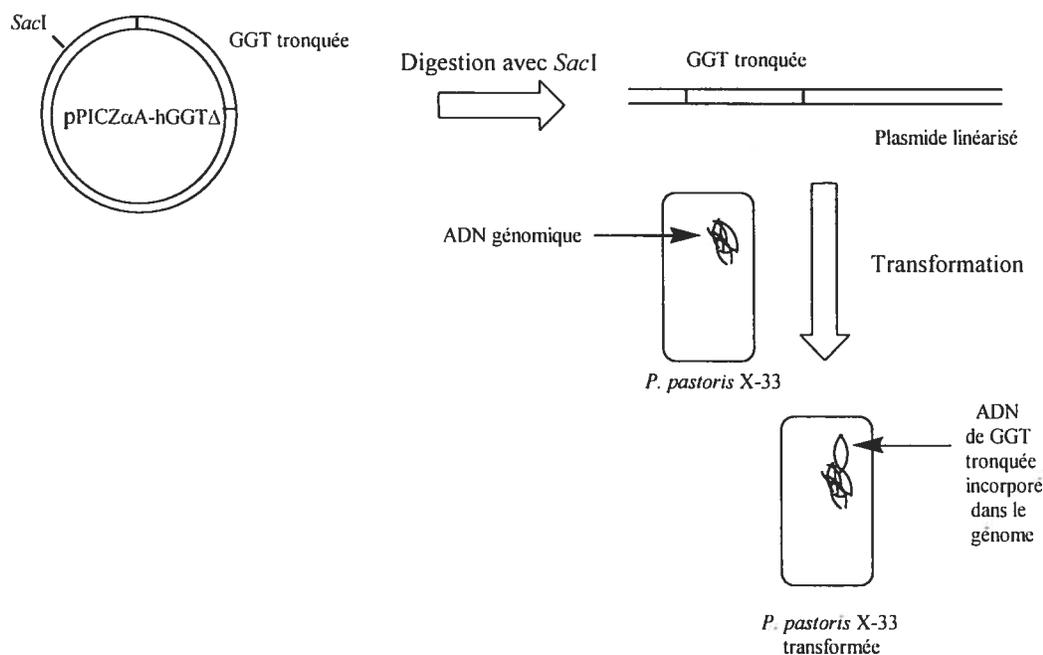


**Figure 23.** Gel d'agarose (1 %) de l'ADN de 12 colonies digérées avec l'enzyme de restriction *Bam*HI. Les premier et septième puits contiennent un marqueur de fragments d'ADN contenant différents nombres de nucléotides (en paires de base (pb)) et certaines bandes sont identifiées par des flèches à gauche. Les bandes attendues de 4289 et 887 pb sont indiquées par des flèches à droite.

De celles-ci, les bandes attendues sur le gel d'agarose ont été observées de manière claire pour 10 des colonies, les deux autres (colonies 1 et 6) ayant des bandes non spécifiques. Ainsi, il semble, de manière qualitative, que toutes les colonies contiendraient l'insert désiré, malgré le fait que deux colonies montrent des clivages non spécifiques. Les bactéries provenant de l'une de ces colonies « positives » ont servi à obtenir de plus grandes quantités d'ADN afin de pouvoir faire le séquençage du gène de la GGT. En effet, la réaction de PCR a pu incorporer des mutations non désirées dans le gène. Ce séquençage a été effectué et a montré que la séquence était intacte selon la séquence préalablement publiée pour la GGT humaine<sup>152</sup>. Les expériences peuvent donc être poursuivies au niveau de la levure.

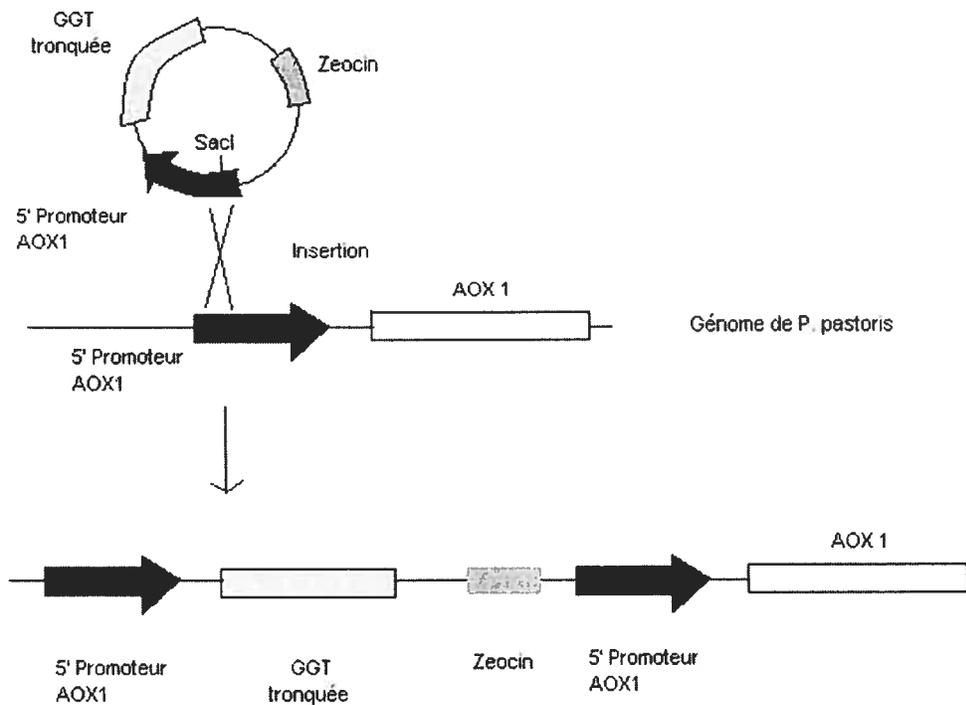
#### 4.2.2 Linéarisation du plasmide purifié et transformation des levures *P. pastoris*

Le plasmide contenant le gène de la GGT tronquée est maintenant disponible en grande quantité. Il peut donc être utilisé afin de transformer les levures. Les principales étapes à effectuer sont représentées au Schéma 16.



**Schéma 16.** Étapes à suivre pour effectuer la transformation des levures *P. pastoris* et l'intégration de l'ADN plasmidique dans leur génome<sup>150</sup>.

Contrairement aux bactéries où la transformation est effectuée avec le plasmide sous forme circulaire, il est nécessaire de linéariser le plasmide avant la transformation des levures afin de permettre une insertion dans leur génome. Il n'existe aucune séquence de répllication autonome sur le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ , alors l'ADN du plasmide ne pourra pas être répliqué par les enzymes de la levure<sup>151,155</sup>. L'insertion est donc nécessaire à l'expression de la GGT. Ce phénomène est réalisé selon ce qui est indiqué au Schéma 17.

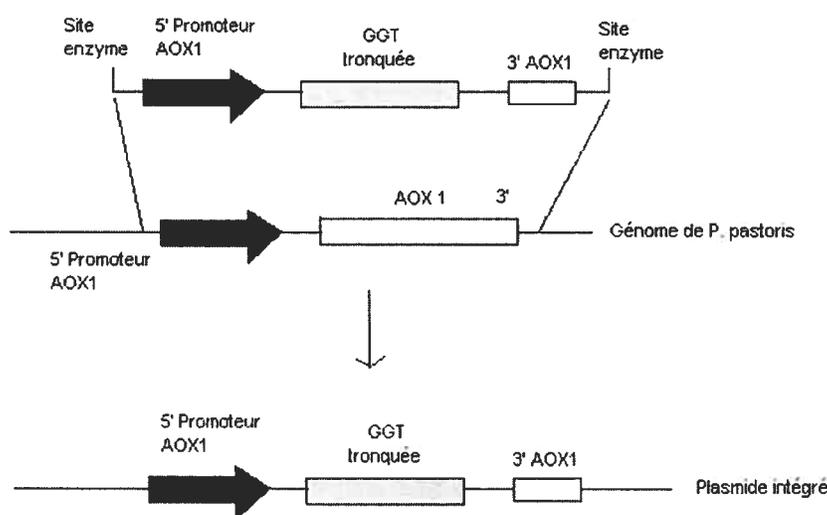


**Schéma 17.** Processus de recombinaison au niveau du promoteur *AOX1* entre le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et le génome de *P. pastoris*<sup>148,151</sup>.

Le processus de recombinaison est possible entre deux séquences identiques. Dans ce cas-ci, la séquence du promoteur *AOX1* présente dans le plasmide (tel qu'indiqué à la Figure 20) est identique à celle dans le génome de *P. pastoris*. Ainsi, le clivage de l'ADN plasmidique dans cette région va aider à diriger l'insertion de ce dernier à l'endroit désiré dans le génome. La Figure 20 montrait une région appelée

*AOX1* TT. Il s'agit d'une séquence similaire à la partie 3' à la fin du gène codant pour cette enzyme. Il serait également possible, en utilisant une enzyme de restriction clivant dans cette région, d'y faire l'insertion du plasmide. L'insertion de plusieurs plasmides l'un à la suite de l'autre peut être réalisée durant ce processus, ce qui va donner une souche de levure ayant plusieurs copies du plasmide menant à l'expression d'une grande quantité d'enzyme, mais ce phénomène est plus rare<sup>150</sup>.

Il est également possible de voir une partie complète du génome de *P. pastoris* se faire remplacer par l'ADN du plasmide, comme il est indiqué au Schéma 18.



**Schéma 18.** Processus de recombinaison au niveau des régions 5' promoteur *AOX1* et 3'*AOX1* menant au remplacement du gène *AOX1* dans le génome de la levure *P. pastoris*<sup>151</sup> par l'ADN plasmidique.

Dans ce cas-ci, une double recombinaison a lieu grâce à la similarité des séquences de la région 5' du promoteur *AOX1* et de la région en position 3' du gène codant pour l'enzyme *AOX1*. Ceci mène au remplacement complet du gène *AOX1* dans le génome de la levure *P. pastoris* par le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . Cette double recombinaison peut être effectuée avec de l'ADN plasmidique linéaire ayant été clivé par une enzyme de restriction précise présente à chaque extrémité de la séquence d'ADN à intégrer au génome. Ce processus ne se réalise cependant pas

avec la même efficacité que l'insertion simple montrée au Schéma 17, alors certaines techniques de transformation doivent être utilisées pour y parvenir<sup>148</sup>. De plus, il est plus difficile de déterminer quelle levure a bel et bien incorporé le gène de la GGT tronquée puisque l'ADN correspondant à l'enzyme de résistance à l'antibiotique Zeocin n'est pas présent dans la séquence de recombinaison. Ainsi, il faut vérifier plusieurs transformants avant d'en trouver un contenant le gène d'intérêt par différentes techniques<sup>148</sup>. Cependant, il a été montré que la double recombinaison permet d'insérer plusieurs copies dans le génome, ce qui peut être avantageux pour obtenir une meilleure expression de la protéine d'intérêt<sup>156</sup>.

Cependant, cette technique a le désavantage d'éliminer le gène *AOX1* codant pour l'enzyme responsable de la dégradation du méthanol présent dans le milieu de culture de la levure, empêchant donc, normalement, la levure de croître. Il existe toutefois un autre gène codant pour l'enzyme appelée *AOX2*. Ce gène, homologue à 90 % avec le gène *AOX1*, permet de coder pour une enzyme qui dégrade le méthanol, mais à une vitesse beaucoup plus faible<sup>150</sup>. Les levures possédant seulement ce gène pour croître en présence de méthanol sont appelées Mut<sup>S</sup> (pour « methanol utilisation slow »). Par comparaison, les levures possédant le gène *AOX1* sont appelées Mut<sup>+</sup> (pour « methanol utilisation plus ») et croissent beaucoup plus rapidement<sup>150</sup>.

Dans notre cas, nous avons privilégié l'insertion simple de l'ADN plasmidique montré au Schéma 17. En effet, ce type de recombinaison a une plus grande chance de se réaliser et est moins sensible à la technique de transformation utilisée. De plus, une croissance rapide des levures est désirée afin de mettre au point un protocole d'expression et de purification de la GGT prenant le moins de temps possible. Enfin, il est plus aisé de déterminer si l'insertion a eu lieu grâce à la sélection en présence de l'antibiotique Zeocin.

Une linéarisation du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  a donc été réalisée avec l'enzyme de restriction *SacI* clivant dans la séquence d'ADN correspondant au promoteur de *AOX1* (Schéma 16). Ceci doit être fait sur une grande quantité d'ADN

afin de permettre une bonne intégration dans le génome. Il est également nécessaire de vérifier, sur un gel d'agarose, si la digestion est complète. En effet, l'ADN linéarisé permet une meilleure recombinaison, au niveau de l'efficacité, dans l'ADN génomique de la levure que l'ADN circulaire normal du plasmide<sup>150</sup>. Sur un gel d'agarose, l'ADN linéarisé ne migrera pas au même endroit que l'ADN toujours circulaire, ce qui permet de connaître l'étendue de la digestion enzymatique par l'enzyme *SacI*<sup>3</sup>.

Par la suite, une transformation des cellules de levure est faite. Il existe différentes manières d'affaiblir les membranes des levures *P. pastoris* et de permettre au plasmide d'entrer dans les cellules. Une électroporation, telle que celle décrite pour les bactéries, peut être effectuée. Il existe également une transformation grâce à du PEG1000 ou du LiCl<sup>150</sup>. Enfin, la formation de sphéroplastes (levures dont la paroi cellulaire est partiellement digérée) est possible. Dans le cas du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ , il faut éviter la formation des sphéroplastes<sup>151</sup>. Cette technique, la plus efficace entre toutes, nécessite une régénération, par les levures, de la membrane après la transformation. La protéine de résistance à l'antibiotique Zeocin n'est alors pas formée assez rapidement, alors aucun transformant ne pousse sur les milieux de culture sélectifs<sup>151</sup>. Entre la technique utilisant le PEG et celle avec le LiCl, la deuxième permet d'obtenir un meilleur rendement, alors notre choix s'est porté sur celle-ci<sup>151</sup>. L'électroporation aurait été possible, mais nécessite l'achat de pièces spéciales pour faire l'expérience, ce qui n'est pas le cas pour la technique utilisant le LiCl.

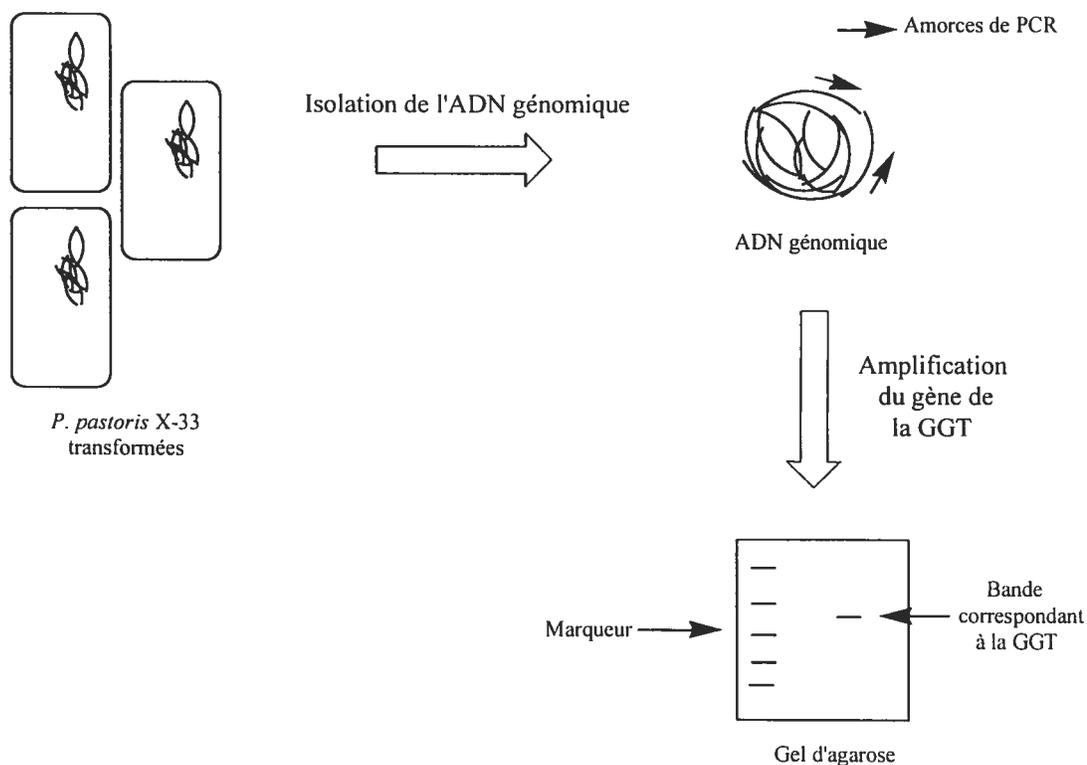
Cette technique est dérivée de celle utilisée pour la levure *S. cerevisiae*<sup>157</sup>. Cependant, dans ce dernier cas, le sel utilisé est l'acétate de lithium, ce qui ne fonctionne pas avec la levure *P. pastoris*<sup>151</sup>. Le protocole suivi est celui publié dans la littérature<sup>151</sup>. Les levures choisies sont de la souche X-33. Cette souche de *P. pastoris* est de type sauvage, elle ne contient pas de mutation au niveau génétique<sup>158</sup>. Il est nécessaire de faire croître les levures jusqu'à une certaine densité optique (phase logarithmique). Ensuite, les membranes sont affaiblies par des

lavages successifs avec une solution de 100 mM de LiCl toujours effectués en milieu stérile afin de ne pas contaminer les levures. Enfin, une solution de 50 % PEG-3350 est placée sur les cellules afin de les protéger des trop grandes concentrations de LiCl, puis une quantité de 1 M LiCl, d'ADN simple brin de transport, puis l'ADN plasmidique à transformer. L'ADN simple brin<sup>157</sup> provient du sperme de saumon. Il s'agit d'un type d'ADN fréquemment utilisé lors d'hybridations ou de la précipitation d'ADN<sup>153</sup>. Dans ce cas-ci, cet ADN va permettre de transporter plus efficacement l'ADN plasmidique dans la levure<sup>157</sup>. Par la suite, une série d'incubations à différentes températures (décrite dans le chapitre 6) est effectuée avant que les levures ne soient étalées sur des boîtes de Petri contenant un milieu de culture riche pour les levures (YPD, voir chapitre 6) et une concentration de 100 µg/mL de l'antibiotique Zeocin. Contrairement aux bactéries, il faut au moins 2 à 3 jours avant de voir des colonies de levure croître sur les milieux sélectifs. La même expérience a été effectuée en présence de plasmide pPICZαA commercial ne contenant pas le gène de la GGT tronquée.

Dans le cas des plasmides pPICZαA-hGGTΔ et pPICZαA, des colonies ont été visibles après 2 jours. Il reste maintenant à voir si les levures ont bel et bien intégré le plasmide dans leur ADN génomique. Ceci est expliqué à la section suivante.

### **4.2.3 Purification de l'ADN génomique et vérification de l'intégration du gène**

Afin de vérifier la bonne intégration du gène de la GGT tronquée dans l'ADN génomique de la levure, il est nécessaire d'isoler ce dernier. Cependant, la levure *P. pastoris* n'a pas été étudiée autant en détail que la levure *S. cerevisiae*, alors le nombre de chromosomes et le nombre de paires de bases dans son ADN génomique ne sont pas connus, ce qui peut compliquer la vérification de l'intégration. La technique utilisée pour y parvenir est représentée au Schéma 19.



**Schéma 19.** Étapes à suivre pour vérifier l'intégration du gène de la GGT tronquée dans l'ADN génomique de la levure *P. pastoris*.

Il est donc nécessaire de faire croître les levures *P. pastoris* X-33 transformées dans un milieu de culture afin d'en obtenir une quantité suffisante permettant d'en isoler l'ADN génomique. Ceci est effectué en prenant une colonie de levures dans la boîte de Petri préalablement faite à la section précédente et en la plaçant dans un milieu de culture liquide, toujours de manière stérile, à 30 °C pour la nuit. Il est à noter que la présence de l'antibiotique Zeocin n'est plus nécessaire à ce point. En effet, l'intégration donne généralement des transformants ne risquant pas de perdre leurs caractéristiques, alors il n'est plus nécessaire d'exercer une pression sélective en incluant de l'antibiotique dans les milieux de culture<sup>151</sup>. Cette manipulation a été effectuée pour trois colonies ayant poussé sur un milieu sélectif avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et pour deux colonies ayant poussé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A.

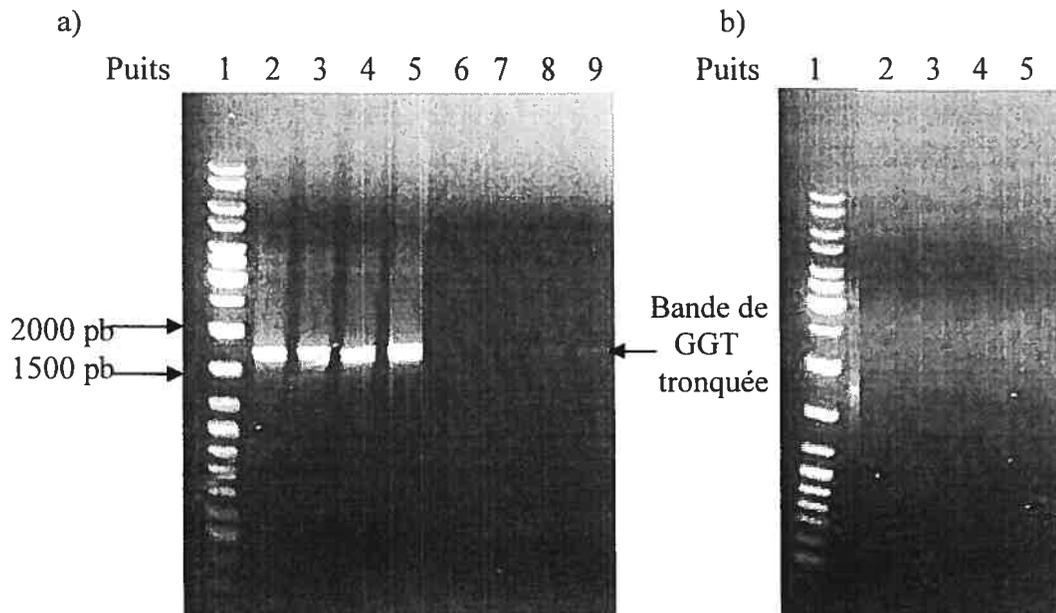
Par la suite, il est important de vérifier l'intégration du gène. Ceci est effectué en purifiant l'ADN génomique de la levure selon un protocole décrit au chapitre 6<sup>150</sup>. Ceci a été effectué pour toutes les cultures préparées précédemment. Il est à noter que la purification de l'ADN génomique est plus difficile que pour l'ADN plasmidique dans les bactéries. En effet, l'ADN génomique est plus fragile, ainsi il faut minimiser les étapes de resuspension de l'ADN risquant de tout briser. Les étapes principales consistent à prendre les levures de chacune des cultures précédentes et de les resuspendre dans un milieu contenant notamment du sorbitol, de l'EDTA et du DTT. Par la suite, une enzyme appelée zymolyase (ou lyticase) est utilisée pour dégrader partiellement la paroi de la levure. L'ajout de SDS permet de faire éclater les cellules afin de libérer l'ADN. Ensuite, une série de lavages, de resuspensions et d'extractions permet d'isoler l'ADN génomique. Selon le protocole suivi, il semble facile de faire sécher l'ADN obtenu à la fin de cette manipulation, mais il s'est avéré difficile d'y parvenir, malgré quelques modifications au protocole, et sa resuspension dans l'eau déionisée a été assez ardue. Tout de même, de l'ADN génomique a été isolé de chacune des colonies avec succès.

Il est ensuite nécessaire de quantifier l'ADN génomique obtenu. Cependant, il est impossible de le faire comme dans le cas de l'ADN plasmidique des bactéries en utilisant un gel d'agarose 1%. Une quantification par absorbance à 260 et à 280 nm a été réalisée selon le protocole décrit au chapitre 6<sup>153</sup>. La première longueur d'onde permet d'avoir une idée de la concentration d'ADN et d'ARN. La deuxième longueur d'onde mesure la concentration de protéines présentes. Le ratio  $\frac{A_{260}}{A_{280}}$  doit normalement se rapprocher de 2,0 pour représenter de l'ADN assez pur<sup>153</sup>. La quantification a permis d'obtenir des valeurs autour de 1,94-1,99, ce qui montre un bon niveau de pureté. Il est ensuite possible de prendre l'absorbance à 260 nm et de calculer la concentration d'ADN génomique obtenue selon l'équation (1) suivante<sup>153</sup> :

$$\text{Concentration} = A_{260} \times 50 \text{ ng} / \mu\text{L} \times F.D. \quad (1)$$

où F.D. correspond au facteur de dilution et la concentration obtenue est en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Les valeurs obtenues à la suite de cette quantification peuvent toutefois être faussées par la présence d'éthanol provenant de la purification de l'ADN génomique. De plus, l'éthanol peut empêcher les réactions enzymatiques subséquentes de se faire. L'ADN génomique sera tout de même utilisé pour tenter de faire la réaction de PCR puisqu'il suffit de voir seulement la présence du gène de la GGT tronquée.

Il reste maintenant à vérifier si l'insertion a bel et bien été effectuée. Pour y parvenir, une réaction de PCR est faite sur de l'ADN génomique en utilisant des amorces qui pourront amplifier le gène de la GGT. Ainsi, s'il est présent, une bande correspondant à environ 1640 paires de bases (correspondant à la taille du gène de la GGT) pourra être visible sur un gel d'agarose 1%. Dans ce cas-ci, les mêmes amorces que celles utilisées pour obtenir le gène de la GGT tronquée (voir section 4.2.1) ont été prises. De plus, cette réaction a été faite sur du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  comme témoin positif afin de vérifier les conditions de la réaction de PCR et sur l'ADN génomique isolé des levures transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A afin d'agir comme témoin négatif. Le protocole suivi est décrit dans le chapitre 6. Les résultats obtenus sont montrés à la Figure 24.



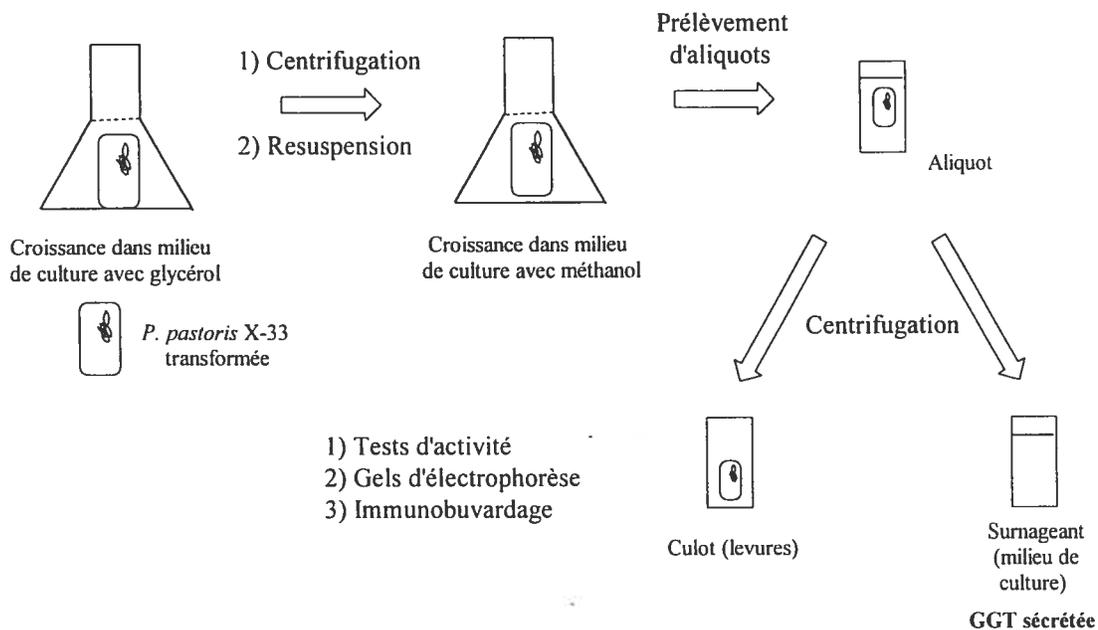
**Figure 24.** Gel d'agarose 1 % de l'ADN obtenu à la suite de l'amplification par réaction de PCR d'un fragment correspondant au gène de la GGT tronquée. a) Le puits 1 contient un marqueur de nombre de paires de bases, les puits 2 à 5 correspondent à la réaction effectuée sur le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  à différentes températures (puits 2, 50 °C; 3, 52,8 °C; 4, 56 °C et 5, 60 °C) et les puits 6 à 9 correspondent à l'amplification effectuée sur l'ADN génomique isolé d'une colonie de levure *P. pastoris* X-33 transformée avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  aux mêmes températures que dans les puits 2 à 5. b) Même type de gel, mais la réaction a été effectuée sur l'ADN génomique isolé de levures *P. pastoris* X-33 transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A. La description des puits correspond à celle des puits 1 à 5 de la figure a).

Il est donc possible de constater, à partir de la Figure 24, que la réaction de PCR s'est bien effectuée sur le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et ce, à toutes les températures afin d'amplifier une bande d'environ 1640 pb correspondant au gène de la GGT mutée. Ceci montre bien que les amorces et le protocole utilisés pour effectuer la réaction de PCR fonctionnent. Ensuite, les puits 5 à 9 de la Figure 24a montrent une très faible bande au même nombre de paires de bases. Il est nécessaire de dire que le protocole utilisé ici n'a pas été optimisé, l'important étant de voir la présence de la bande. Celle-ci a été observée pour les autres transformants testés. Il

faut dire qu'une faible présence d'impuretés avec l'ADN génomique, telle des traces d'éthanol, peut inhiber les enzymes utilisées au cours de la réaction de PCR, ce qui peut expliquer la faible intensité des bandes. Enfin, aucune bande n'est visible lors de l'amplification par PCR en utilisant de l'ADN génomique isolé de levures transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A (Figure 24b), ce qui confirme bien la nature de la bande observée ici. Il a donc été démontré que le gène de la GGT tronquée est bien inséré dans l'ADN génomique de la levure *P. pastoris*. Cependant, il est impossible de dire exactement à quel endroit cette insertion a eu lieu (malgré le fait qu'une enzyme de restriction clivant dans le promoteur 5' *AOX1* ait été utilisée), ni combien de copies du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  ces levures contiennent<sup>150</sup>. Il existe différentes techniques permettant de le déterminer, mais celles-ci impliquent l'utilisation de fragments d'ADN marqués avec le radio-isotope <sup>32</sup>P, ce qui n'était pas à notre disposition<sup>150</sup>. Les expériences ont donc été poursuivies afin de voir si les levures contenant le gène de la GGT pouvaient exprimer cette enzyme.

#### 4.2.4 Vérification de l'expression de la GGT dans *P. pastoris*

Des levures *P. pastoris* X-33 contenant le gène de la GGT tronquée sont maintenant disponibles. Il faut donc vérifier si l'expression de l'enzyme est possible et si elle est bien sécrétée. Il faut se rappeler qu'un facteur  $\alpha$  est présent avant le gène de la GGT, ce qui doit normalement permettre à l'enzyme d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire de la levure. Le protocole permettant de vérifier s'il y a ou non expression de la protéine est représenté au Schéma 20.



**Schéma 20.** Étapes à suivre pour l'expression de la GGT humaine tronquée à partir de levures *P. pastoris* X-33 transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ .

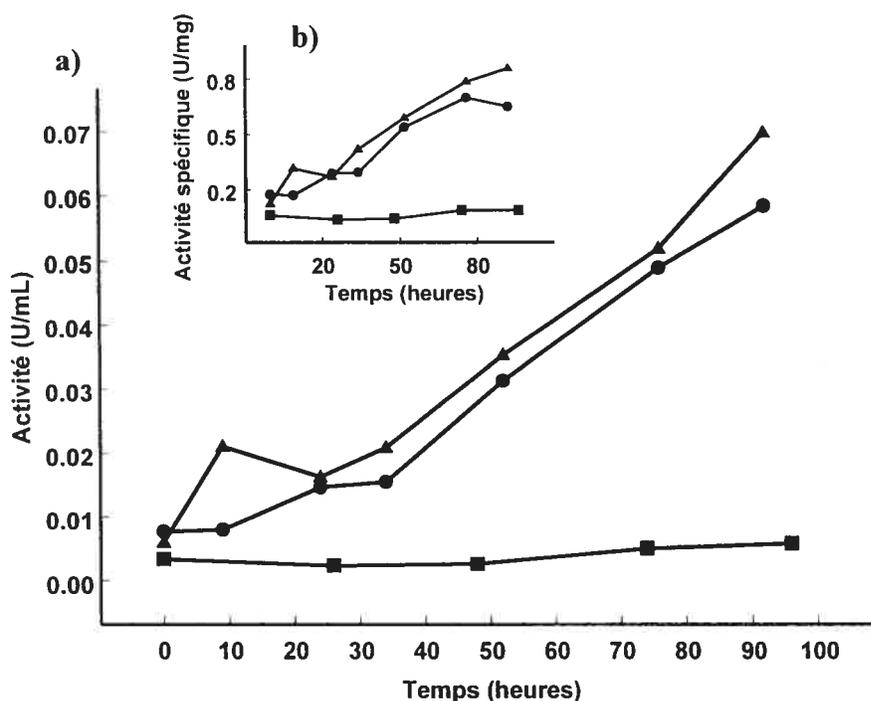
Comme il est indiqué au Schéma 20, une fiole conique (erlenmeyer) contenant des levures ayant le gène de la GGT humaine tronquée est préparée. Toutes les manipulations, jusqu'à maintenant, avaient été faites en utilisant un milieu de culture YPD riche permettant à ce type de levure de pousser très rapidement. Par exemple, le sucre utilisé dans ce milieu est le dextrose (glucose). Cependant, dans ce cas-ci, un milieu complexe, ressemblant à celui du YPD, mais avec du glycérol et du tampon phosphate, est utilisé. Il est appelé BMGY pour « Buffered Glycerol-complex Medium ». Celui-ci va permettre aux levures de croître à un certain pH bien précis sans toutefois induire l'expression de la GGT tronquée. En effet, la séquence promotrice 5' *AOXI* discutée dans la section 4.2.1 effectue un contrôle bien précis de l'expression. En présence de glucose, toute induction de protéine est arrêtée par un processus de répression<sup>148</sup>. Ainsi, seule la croissance des levures passant par une réplication de l'ADN, et non une expression, de la GGT tronquée est observée. Par la suite, les cellules sont placées dans un milieu exempt de glucose (le milieu BMGY). Ainsi, il existe un processus de « dérpression » qui pourrait permettre l'induction du gène de la GGT<sup>148</sup>. Cependant, il semble que ce signal ne soit pas

suffisant. La présence du méthanol est absolument nécessaire afin d'induire réellement la formation des protéines. Ainsi, après l'atteinte d'une certaine densité optique dans le milieu BMGY à base de glycérol, les levures sont centrifugées, puis resuspendues à une certaine densité optique dans un milieu similaire au BMGY, mais avec du méthanol à la place du glycérol (BMMY pour « Buffered Methanol-complex Medium »). Lorsque les cellules sont resuspendues dans un milieu contenant du méthanol, l'induction est alors commencée. Elle est poursuivie sur une période d'environ 80 heures. Du méthanol doit alors être ajouté à chaque jour afin de toujours garder la même concentration sur une aussi longue période.

Des aliquots de 1 mL sont prélevés à différents temps durant cette période. Il est connu que des levures ayant toujours le gène codant pour l'enzyme *AOX1* peuvent pousser assez rapidement sur un milieu contenant du méthanol ( $Mut^+$ ) contrairement à celles ayant perdu ce gène par remplacement avec l'ADN du plasmide ( $Mut^S$ ). Dans le cas des levures  $Mut^S$ , il est possible que l'induction doive être suivie sur une période de 144 heures<sup>150</sup>. Les aliquots sont centrifugés afin d'obtenir les levures dans le culot et tout ce qui a été sécrété dans le surnageant formé du milieu de culture. Les deux sont congelés séparément, puis analysés un peu plus tard. Des tests d'activité enzymatique pour la GGT et des gels d'électrophorèse devront être effectués pour le culot et le surnageant de chacun des aliquots afin de vérifier la présence et l'activité de la GGT dans l'échantillon. Il est connu que les levures sécrètent peu de protéines<sup>150</sup>, alors il devrait normalement être possible de bien voir la protéine d'intérêt sur un gel d'électrophorèse des surnageants et de la purifier efficacement.

Afin de vérifier la présence d'expression, les conditions de base préalablement publiées par la compagnie Invitrogen ont été suivies<sup>150</sup>. Les cellules ont donc été placées dans le milieu BMGY avec un tampon 0,1 M phosphate de potassium à pH 6,0 et ont été laissées à 30 °C pour la nuit. Ayant atteint une densité optique d'environ 4, celles-ci ont été centrifugées, puis placées dans un milieu BMMY avec le même tampon phosphate et 1 % de méthanol pour obtenir une densité optique de 1,0. Du méthanol a été ajouté à chaque 24 heures afin de s'assurer

que l'induction puisse toujours avoir lieu. Des aliquots ont été prélevés sur une période de 92 heures. Des tests d'activité et de concentration ont été effectués et les résultats obtenus pour les surnageants de ces échantillons sont représentés à la Figure 25. Ces expériences ont été réalisées avec deux différents transformants de levure. En effet, l'endroit où l'insertion de l'ADN s'est faite n'est pas connu et peut avoir été effectué avec un nombre différent de copies. Les résultats sont comparés à ceux obtenus à partir d'un transformant fait avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A.



**Figure 25.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 6,0 et une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour deux clones (clone 1, ●, clone 2, ▲) ayant été transformés avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et pour un clone avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A (■). b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction.

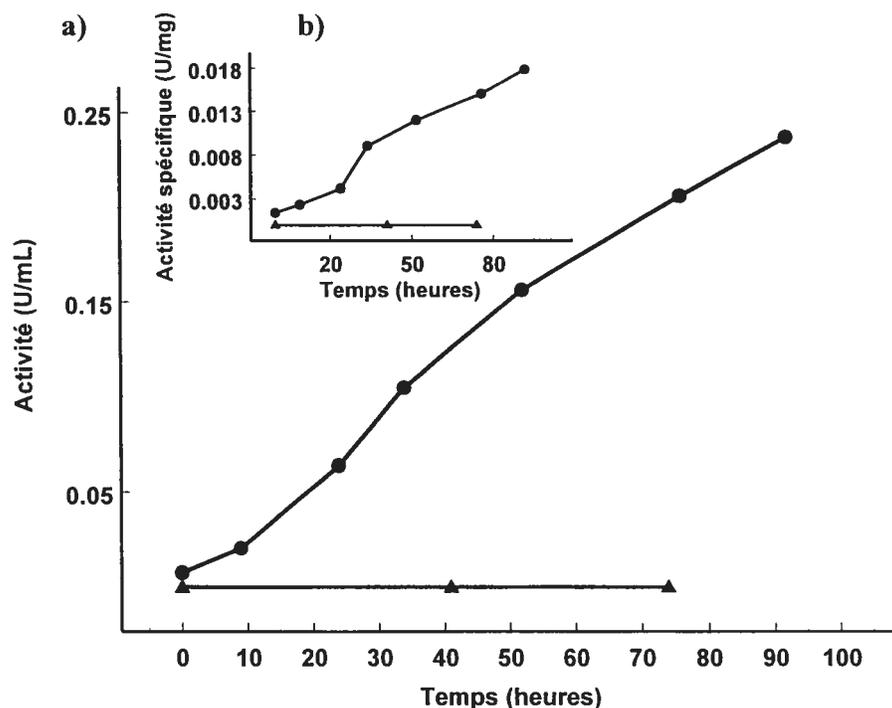
Il est important ici de faire une précision quant aux informations représentées à la Figure 25. Le graphique principal montre l'activité de la GGT, mesurée en unité (U), en fonction du temps. Selon la définition donnée plus tôt (voir section 4.1), ceci

représente la quantité d'enzyme présente dans l'échantillon. L'activité spécifique est l'activité de la GGT divisée par la concentration en protéine. Ainsi, il est possible d'avoir une grande quantité de GGT, mais si celle-ci est en présence de plusieurs autres protéines, l'activité spécifique sera beaucoup plus basse. L'activité représente donc une mesure de quantité ou de rendement de l'expression et de la purification de la GGT, alors que l'activité spécifique est plutôt un type de mesure de la pureté de l'enzyme. Les deux informations, activité et activité spécifique, sont donc bien importantes.

La Figure 25 montre que l'activité de la GGT augmente en fonction du temps d'induction en présence du méthanol dans les surnageants des aliquots centrifugés, donc dans les milieux de culture. Il s'agit d'un signe important montrant que l'expression de la GGT est possible et que celle-ci est sécrétée dans le milieu réactionnel. La différence avec le transformant ayant seulement la séquence du plasmide pPICZ $\alpha$ A est frappante. En effet, l'activité obtenue pour les deux clones provenant de la transformation avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  semble bel et bien provenir de la GGT et non pas d'une autre enzyme ayant été sécrétée par les levures qui serait capable de cliver le L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide présent dans le test d'activité. L'activité obtenue pour les clones 1 et 2 est faible, mais tout de même encourageante. De plus, il ne semble pas y avoir de grande différence entre les deux clones, alors ils doivent contenir le même nombre de copies du gène de la GGT, donc probablement une seule<sup>150</sup>. Le graphique de l'activité spécifique montre les mêmes informations que celui avec l'activité, donc la concentration de protéine est environ la même dans les deux clones. Des gels d'électrophorèse permettant de séparer les protéines d'un échantillon ont été effectués, mais aucune bande ne semble correspondre à celle de la GGT et de ses deux sous-unités. De plus, aucune bande ne semble réellement plus intense que les autres, ce qui indique qu'il n'y aurait pas surexpression de l'enzyme. Il peut s'agir d'une expression plus faible de la protéine par la levure ou la protéine peut être surtout présente dans le culot. Le test d'activité enzymatique étant plus sensible que le gel d'électrophorèse de protéine, il sera plus

utilisé pour caractériser l'expression de la GGT. Des études plus poussées à ce niveau seront montrées à la prochaine section.

Les culots obtenus à partir des aliquots prélevés ont donc été broyés en présence de billes de verre. En effet, les membranes des levures sont très solides et des techniques énergiques d'homogénéisation doivent être utilisées. Généralement, pour les levures, des billes de verre permettent de créer des bris mécaniques à la membrane, ce qui se termine par un bris complet de la cellule<sup>159</sup>. Une presse française peut également arriver, grâce à la pression exercée sur les levures, à les faire éclater. Les autres techniques, telles la sonication généralement utilisée pour les bactéries ou l'homogénéisateur avec un piston pour les cellules de mammifère, ne réussissent pas à bien briser les parois<sup>159</sup>. Les culots contenant les levures ont donc été resuspendus dans un tampon de lyse contenant des inhibiteurs contre les protéases, puis des billes de verre ont été ajoutées. Le tout a été agité avec un vortex durant 30 secondes, suivi d'un temps d'attente de 30 secondes sur la glace pendant plusieurs cycles. Le mélange formé de cellules lysées a été directement analysé par le test de l'activité enzymatique et par gel d'électrophorèse. Le résultat obtenu est montré à la Figure 26.



**Figure 26.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le culot, obtenu après centrifugation, d'aliqots prélevés en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour un clone ayant été transformé avec le plasmide pPICZαA-hGGTΔ (●) ou avec le plasmide pPICZαA (▲). b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction.

Dans ce cas-ci, seul le clone 1 a été utilisé pour faire les tests d'activité enzymatique puisqu'il est similaire à l'autre. L'activité est plus grande dans le clone ayant été transformé avec le plasmide pPICZαA-hGGTΔ que dans le clone avec le plasmide pPICZαA. La valeur maximale obtenue pour l'activité est près de 0,25 U/mL d'enzyme, ce qui est plus élevé que dans la Figure 25. Les culots ont été lysés dans un volume de 100 μL, donc la quantité d'unités d'enzyme demeure tout de même beaucoup plus grande dans le cas des milieux de culture (dont les échantillons sont de 1 mL, Figure 25) que dans les levures (culots, Figure 26). L'activité spécifique, quant à elle, est presque 100 fois plus faible dans les culots (levures) que dans les surnageants (milieu de culture) des aliqots centrifugés.

Cependant, il est possible que de la GGT inactive se retrouve dans le culot. Un gel d'électrophorèse de protéine de ces échantillons n'a pas montré de bandes changeant d'intensité en fonction du temps d'induction avec le méthanol. L'expression n'est peut-être pas suffisamment importante pour pouvoir détecter ce changement. Il est possible de détecter la présence de la GGT grâce à un immunobuvardage (« Western blot »), technique beaucoup plus précise détectant la protéine d'intérêt ou une partie de celle-ci (par exemple, l'épitope *c-myc* présent sur la GGT) par un anticorps lié à une enzyme et à un substrat chemoluminescent. Le principe de cette technique sera expliqué un peu plus en détail dans la section suivante. Cette expérience a été faite pour des culots d'aliqots prélevés à différents temps d'induction, puis centrifugés. Malgré la forte concentration de protéines présentes, aucune protéine n'a été révélée par immunobuvardage. Plusieurs possibilités peuvent expliquer ce résultat et celui des tests d'activité, ce qui sera discuté plus en détail dans la section Discussion.

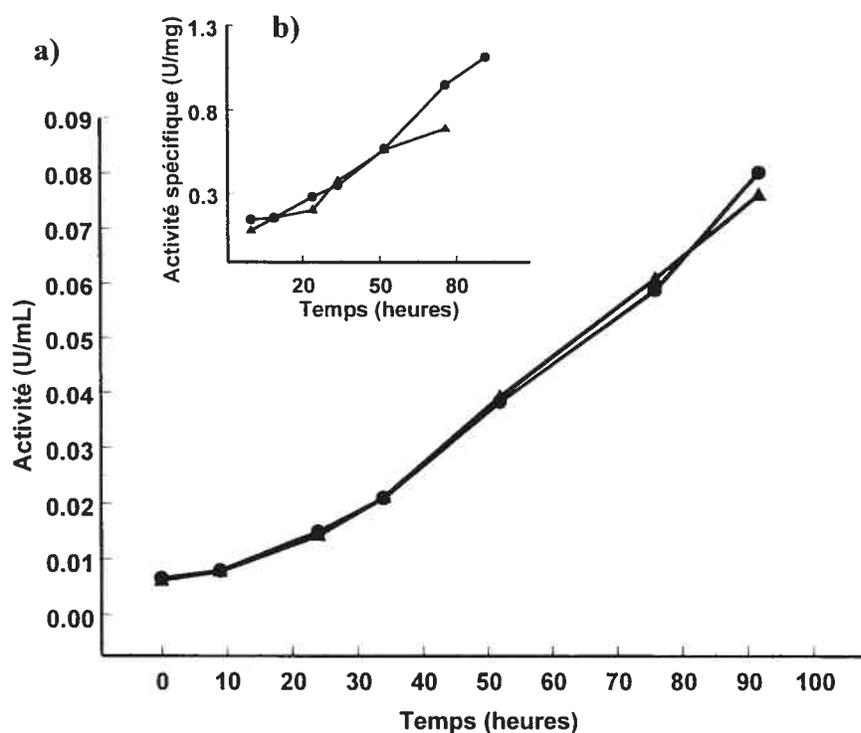
L'expression de la GGT tronquée a donc bel et bien été vérifiée pour un système de levure *P. pastoris* et celle-ci est sécrétée dans le milieu réactionnel. Cependant, les quantités de protéines sont très faibles et il est absolument nécessaire d'optimiser l'expression de la GGT afin de pouvoir utiliser cette méthode pour en obtenir de plus grandes quantités et pour pouvoir faire de meilleures analyses par gels d'électrophorèse de protéines. La prochaine section va décrire les différentes techniques possibles pour atteindre ce but.

#### **4.2.5 Optimisation des conditions d'expression de la GGT**

Les levures *P. pastoris* transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  peuvent sécréter de la GGT active dans leur milieu de culture. Cependant, cette sécrétion peut être optimisée afin d'obtenir de la GGT tronquée active en plus grande quantité. Différents paramètres seront variés dans cette section.

## 4.2.5.1 Effet du pH

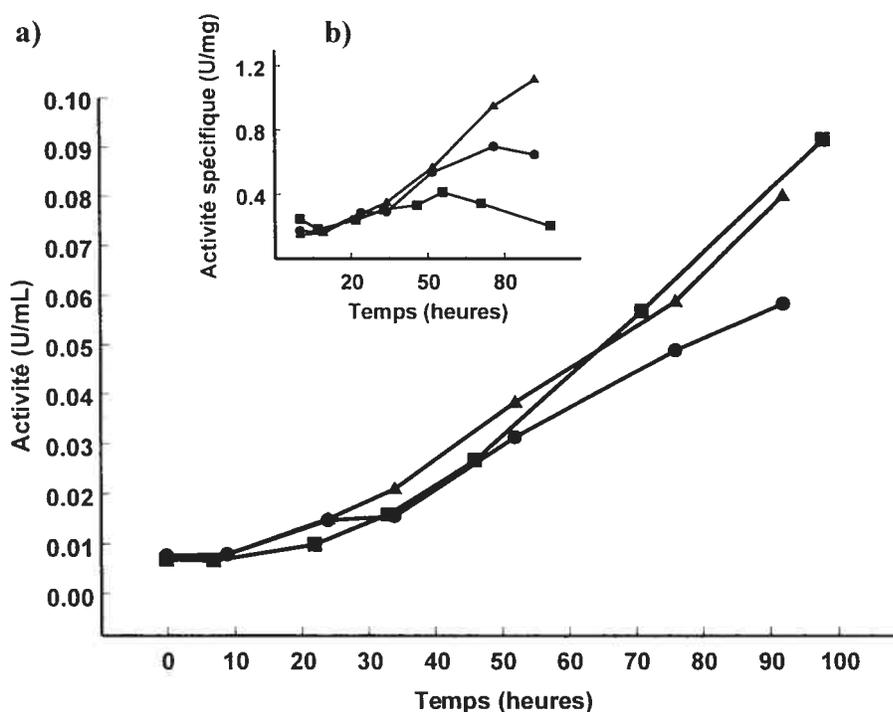
Le pH du milieu de culture des levures peut être varié. En effet, dans la préparation des milieux de culture BMGY et BMMY, un tampon 100 mM phosphate de potassium à pH 6,0 est normalement utilisé. Le pH de celui-ci a été changé afin de voir l'effet sur l'activité et l'activité spécifique de la GGT. À pH 6,0, à la Figure 25, il ne semblait pas y avoir une grande différence entre les deux clones testés. Les mêmes tests ont été effectués à pH 7,0 afin de déterminer avec quel clone il serait préférable d'optimiser les conditions de l'expression. Les manipulations décrites au Schéma 20 ont donc été refaites, avec un tampon phosphate de potassium à pH 7,0 au lieu de pH 6,0. Les résultats obtenus sont représentés à la Figure 27.



**Figure 27.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 et une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour deux clones (clone 1, ●, clone 2, ▲) ayant été transformés avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction.

Ce graphique montre que les deux clones sécrètent une quantité très similaire de GGT dans le milieu de culture. Cela semble donc confirmer l'hypothèse avancée que ces deux clones ont incorporé le même nombre de copies du gène de la GGT. L'activité spécifique, à la Figure 27, semble un peu meilleure dans le cas du premier clone. Celui-ci a donc été utilisé afin d'optimiser les conditions d'expression de la GGT.

Il est maintenant important de varier le pH des milieux de culture BMGY et BMMY afin de déterminer lequel serait le plus intéressant. Les résultats sont montrés à la Figure 28.

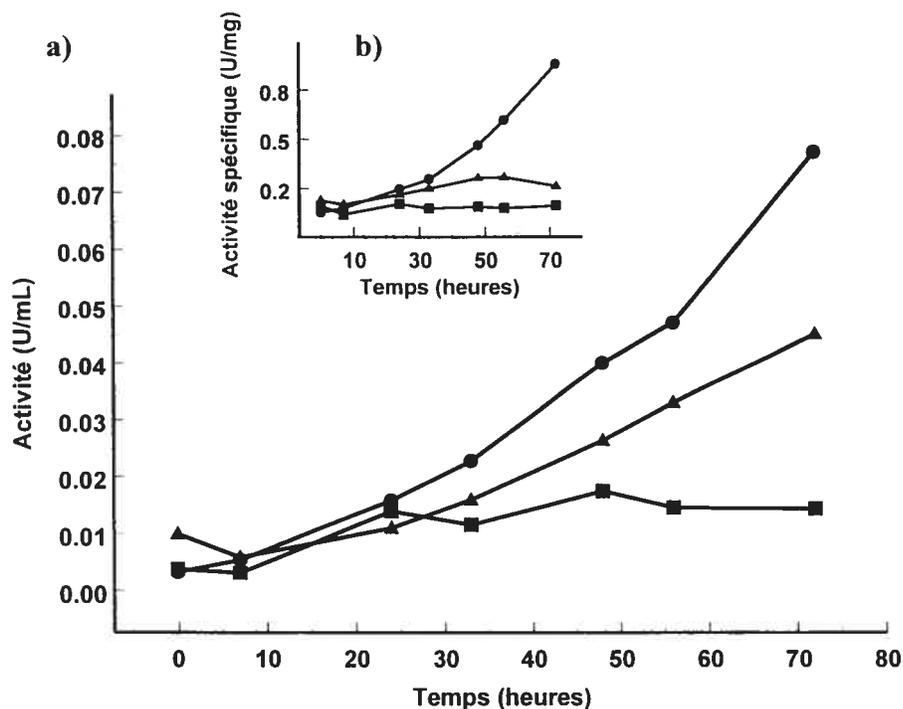


**Figure 28.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture BMMY avec une densité optique de départ de 1,0 à différents pH en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone ayant été transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ -hGGT $\Delta$ . Milieu de culture à pH 6,0, ●, pH 7,0, ▲ et pH 8,0, ■. b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction dans les mêmes conditions.

Les expériences à pH 8,0 ont été difficiles à réaliser. En effet, lors de la préparation des milieux BMGY et BMMY, le mélange du tampon phosphate avec un composé appelé « Yeast Nitrogen Base » (YNB, source d'azote pour les levures) crée la précipitation d'un composé de manière presque instantanée dans le milieu de culture à 4 °C. Une diminution de la concentration du composé YNB a aidé à ralentir la précipitation, mais n'a pas été suffisant. Un changement de la nature du tampon (phosphate de potassium à Tris) a permis d'obtenir un milieu de culture plus stable à 4 °C, mais qui a tout de même fini par précipiter<sup>160</sup>. Les expériences ont été refaites à quelques reprises et les résultats obtenus sont reproductibles. Selon le graphique de l'activité en fonction du temps à la Figure 28, il semble que le milieu de culture à pH 6,0 soit moins propice à la sécrétion de grandes quantités de GGT que les pH 7,0 et 8,0. Ceci représente un facteur à être optimisé pour chacune des protéines. Ensuite, le graphique de l'activité spécifique à la Figure 28 montre que le pH 7,0 représente la meilleure condition. Cela signifie donc qu'à pH 7,0, il y a moins de protéines de toutes sortes sécrétées qu'à pH 8,0, ce qui permet d'obtenir une meilleure activité spécifique. À pH 8,0, il y a le même nombre d'unités de GGT sécrétée, mais l'enzyme se retrouve en présence d'autres protéines indésirables. Ainsi, afin de faciliter la purification ultérieure de la protéine et pour aider lors de la préparation des divers milieux de culture, le pH 7,0 a été choisi pour optimiser les autres conditions d'expression.

#### 4.2.5.2 Effet du pourcentage de méthanol

Le pourcentage de méthanol peut avoir un effet sur l'expression de la GGT. En effet, il s'agit de l'inducteur permettant d'exprimer et de sécréter l'enzyme d'intérêt. Normalement, la présence d'une faible quantité peut suffire, mais il est important d'optimiser le système. Aussi, une grande quantité de méthanol peut mener à la mort des levures. Ainsi, les manipulations décrites au Schéma 20 ont été réalisées, mais différents pourcentages de méthanol ont été utilisés dans le milieu de culture BMMY. Ce pourcentage a été maintenu grâce à l'ajout de méthanol à chaque 24 heures. Les résultats obtenus sont montrés à la Figure 29.



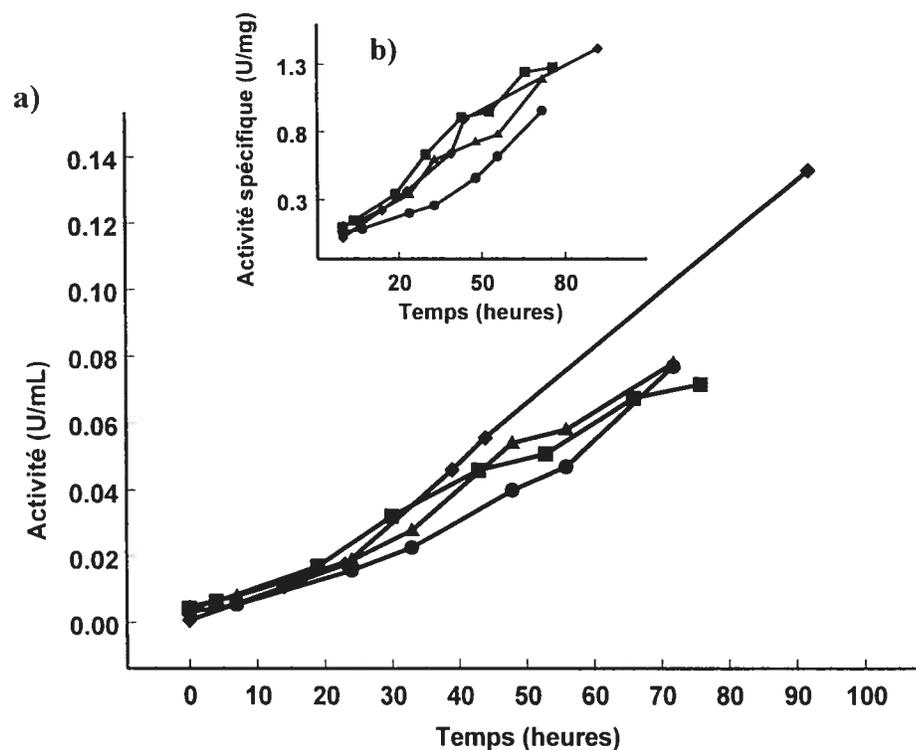
**Figure 29.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 et une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de différents pourcentages de méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . Pourcentages de méthanol testés : 1 %, ●, 2 %, ▲, 3 %, ■. b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes caractéristiques.

Le graphique de l'activité en fonction du temps d'induction montre que la présence de 1 % de méthanol est la meilleure pour induire la formation d'une grande quantité de GGT. En effet, les deux autres pourcentages de méthanol utilisés donnent des résultats beaucoup moins bons. La différence entre ces conditions est encore plus frappante lorsque l'activité spécifique des aliquots prélevés est étudiée. La présence de 1 % de méthanol est nettement la meilleure. Encore une fois, la différence observée entre les deux graphiques est due à une plus grande concentration de protéines avec 2 et 3 % de méthanol, ce qui diminue la pureté de la GGT. Ceci pourrait être dû à un stress créé par les grandes quantités de méthanol, ce qui peut

tuer les levures. L'expression de la GGT va donc être poursuivie avec 1 % de méthanol.

#### 4.2.5.3 Effet de la densité optique de départ dans le milieu de culture BMMY

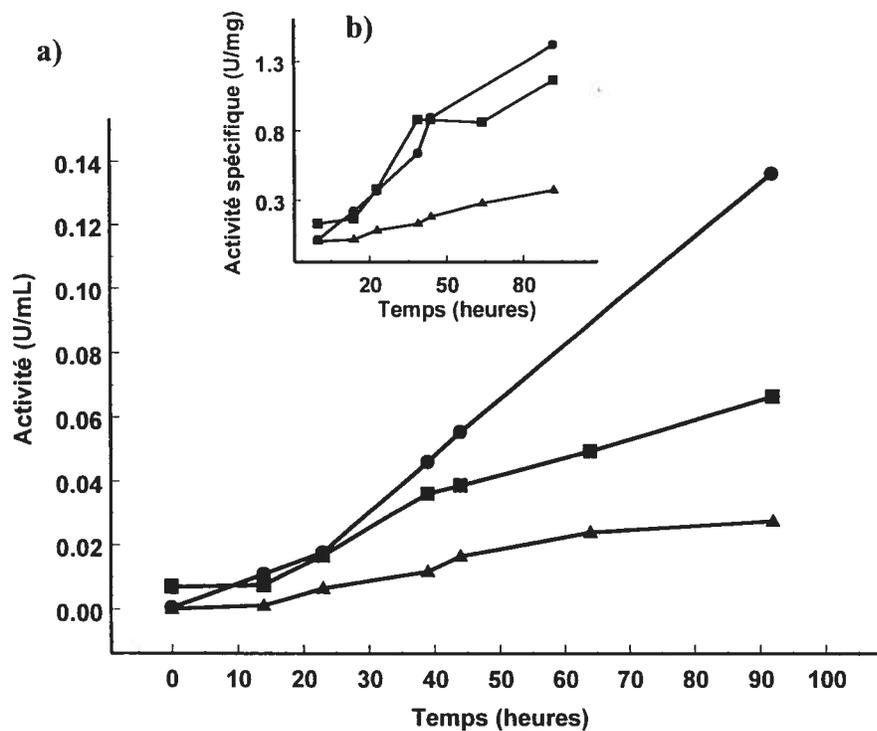
Comme il a été expliqué plus tôt à la section 4.2.4, les levures doivent être resuspendues dans le milieu de culture BMMY afin de débiter l'induction. Normalement, la resuspension est faite à une densité optique de 1,0, mais ce facteur peut probablement être optimisé. Ainsi, les manipulations décrites au Schéma 20 ont été réalisées avec différentes densités de cellules afin de débiter l'induction. Les résultats à la Figure 30 permettent d'obtenir des informations à ce sujet.



**Figure 30.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et resuspendu à différentes densités optiques dans le milieu de culture BMMY. Densités optiques testées : 1,0, ●, 5,0, ▲, 10,0, ■, 15,0, ◆). b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions.

Ce graphique montre que la densité optique de 15,0 semble être la meilleure pour obtenir une grande quantité d'unités de GGT tronquée. Cependant, la différence n'est pas très grande avec les autres densités optiques testées. Elle est surtout évidente après 20 heures d'induction dans le milieu de culture BMMY. L'étude des activités spécifiques montre que celle-ci devient de plus en plus élevée avec l'augmentation de la densité optique. Il semble donc qu'une densité optique élevée permet de sécréter majoritairement de la GGT et non pas d'autres types de protéines, ce qui permet d'augmenter l'activité spécifique. La densité optique de 15,0 semble donc la meilleure, tant au niveau de l'activité obtenue qu'en pureté de l'enzyme, et elle est conservée afin de poursuivre l'optimisation de l'expression.

Cependant, il est possible que l'induction au méthanol se fasse de manière différente avec une densité optique de 15,0 par rapport à une densité optique de 1,0 utilisée au cours de la section 4.2.5.2. Cette optimisation doit donc être refaite. De plus, il est possible que les levures doivent croître en présence d'un pourcentage de méthanol plus faible, puis elles pourraient être placées par la suite dans un milieu où le pourcentage est plus élevé. Les résultats obtenus se retrouvent à la Figure 31.



**Figure 31.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 avec une densité optique de départ de 15,0 en fonction du temps d'induction en présence de différents pourcentages de méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . Pourcentages de méthanol : 1 %, ●, 2 %, ▲, 1 % puis 2 %, ■. b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions.

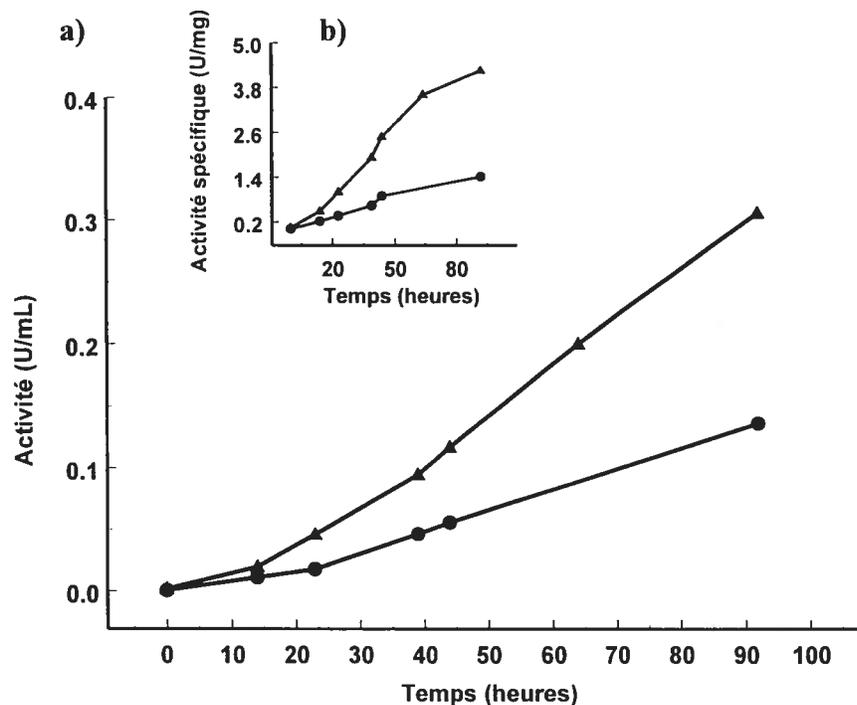
Encore une fois, il semble que la présence de 1 % de méthanol soit la meilleure pour obtenir un grand nombre d'unités d'enzyme. La différence est toujours frappante avec la présence de 2 % de méthanol. L'incubation des cellules pendant 48 heures dans un milieu à 1 %, puis la mise de 2 % de méthanol semble avoir permis la sécrétion d'un plus grand nombre d'unité d'enzyme que la présence, dès le départ, de 2 % de méthanol, mais cela n'a pas permis d'exprimer plus de GGT que la condition de 1 % utilisée jusqu'à maintenant. Pourtant, au niveau de l'activité spécifique, le résultat est presque similaire entre ces deux conditions. La présence de 2 % de méthanol ne semble donc pas permettre la sécrétion d'une grande quantité d'enzyme à cette densité optique. La condition optimale demeure donc la présence

de 1 % de méthanol dans le milieu de culture BMMY, même à une densité optique de départ différente.

#### 4.2.5.4 Présence de « casamino acids »

Il est possible que les levures sécrètent des protéases capables de digérer la GGT présente dans le milieu de culture<sup>150</sup>. Ainsi, cela pourrait expliquer la plus faible quantité d'unités d'enzyme présentes dans les aliquots. Il existe différents trucs afin d'éviter cette réaction secondaire. Pour commencer, il est possible d'utiliser un milieu de culture non tamponné. Ainsi, le milieu de culture possède un pH d'environ 3<sup>150</sup>. Les levures sont capables de croître dans ces conditions, mais la plupart des protéases sont inactives. Alors, la protéine d'intérêt demeure intacte. Cependant, dans le cas de la GGT, le processus d'auto-activation doit être effectué et son endroit exact n'est pas encore connu. Si celui-ci est fait à l'extérieur de la cellule, il est possible que le pH acide modifie l'état d'ionisation de résidus importants dans le processus d'auto-activation, ce qui donnerait de la GGT inactive. Il est également déjà connu qu'à pH 6,0, la GGT ne possède presque plus d'activité<sup>10</sup>, alors à pH 3, il est possible que l'enzyme ne soit plus du tout stable. Une autre possibilité est l'utilisation de « casamino acids ». Il s'agit d'un mélange d'acides aminés provenant de l'hydrolyse chimique de la caséine<sup>161</sup>. Lorsque ceux-ci sont présents à une concentration suffisamment élevée, ils vont servir d'inhibiteurs aux protéases présentes, ce qui va laisser la GGT intacte. Ceci représente donc une bonne manière d'éviter la digestion de la GGT.

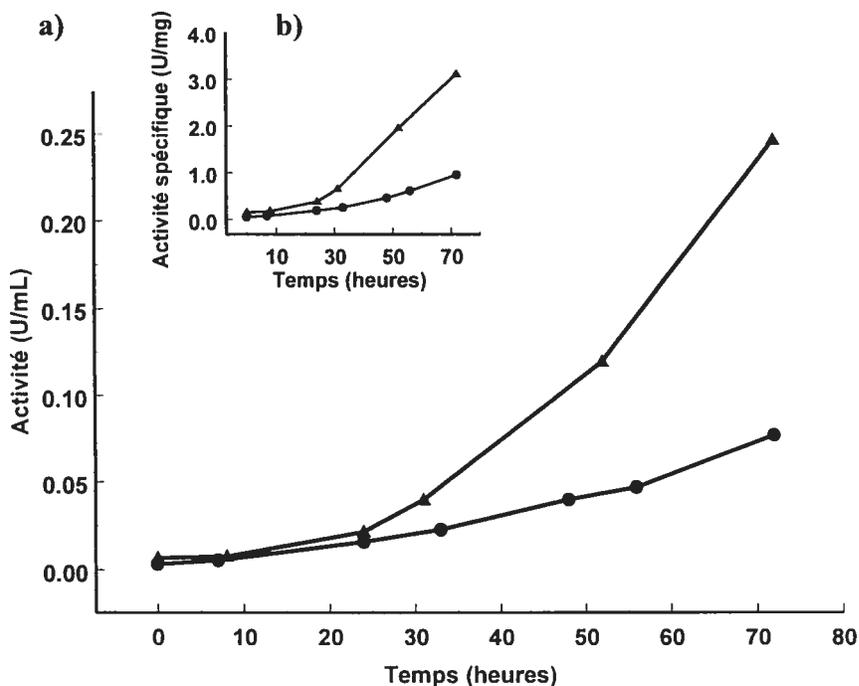
Les manipulations décrites au Schéma 20 ont donc été faites dans les conditions optimales déterminées jusqu'à présent, mais en présence de 1 % de « casamino acids ». Les résultats se retrouvent à la Figure 32.



**Figure 32.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 avec une densité optique de départ de 15,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  et en présence ou non de « casamino acids ». Sans « casamino acids », ●, avec « casamino acids », ▲. b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions.

Il est très clair, à partir de la Figure 32, que la présence de « casamino acids » a fortement aidé au nombre d'unités de GGT. Ceci n'est pas dû à une quelconque modification de la croissance des levures puisque des expériences témoins utilisant des levures transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A mises dans des milieux de culture avec et sans « casamino acids » ont continué leur croissance de la même manière et l'activité basale de GGT préalablement observée est la même. Il semble donc que l'effet observé soit dû à une inhibition de protéases présentes dans le milieu de culture. L'activité spécifique des deux échantillons testés est même très différente, ce qui confirme l'effet de cet additif. Cependant, encore une fois, il est possible que cet effet soit observé avec une densité optique de 15,0, mais qu'il soit

différent à une autre densité optique. Les mêmes expériences ont donc été réalisées à une densité optique de 1,0 et sont représentées par le graphique à la Figure 33.



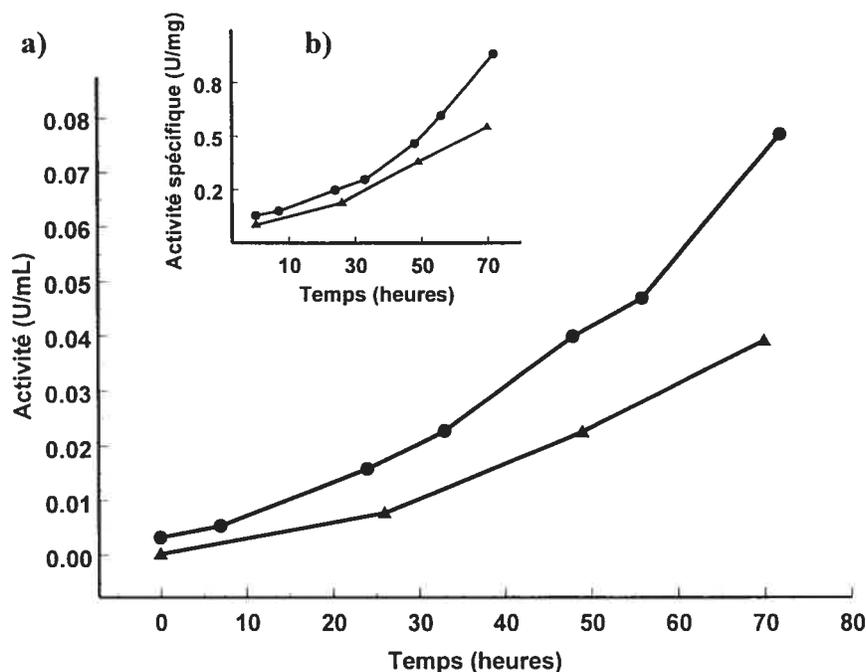
**Figure 33.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 avec une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  en présence ou non de « casamino acids ». Sans « casamino acids », ●, avec « casamino acids », ▲. b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions.

La présence de « casamino acids » permet d'obtenir un plus grand nombre d'unités d'enzymes, même à une densité optique de 1,0. L'effet des « casamino acids » est donc confirmé. Cependant, un point intéressant est observé. Dans le cas de la densité optique à 15,0, il semble y avoir une hausse de l'activité à partir d'environ 5 heures d'induction au méthanol. Pour la densité optique de 1,0, ce délai est plutôt de 25 heures. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'une certaine densité doit être atteinte avant que les levures ne se mettent à exprimer de la GGT. Afin de diminuer le plus possible le temps d'induction des levures, une densité initiale de

15,0 serait peut-être préférable. Cet effet n'avait pas été clairement observé dans la Figure 30, lorsque différentes densités optiques avaient été expérimentées. Les « casamino acids » ont donc un effet très bénéfique sur le nombre d'unités d'activité obtenus à la fin d'un temps d'expression d'environ 80-90 heures.

#### 4.2.5.5 Autres effets

Plusieurs paramètres du système d'expression des levures ont donc été modifiés afin de trouver la meilleure combinaison. Au cours des études effectuées, la source des cellules a changé. Ainsi, les milieux de culture peuvent être inoculés avec des cellules congelées à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou des cellules « fraîches » sur des milieux de culture solides dans des boîtes de Petri. Les cellules « fraîches » croissent un peu plus vite, au début, que les cellules congelées, ce qui a été observé par la hausse de la densité optique d'échantillons. Aussi, un test a été fait afin de voir l'effet du temps sur les cellules « fraîches ». Celles-ci ont toujours été conservées à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La Figure 34 montre les résultats obtenus.

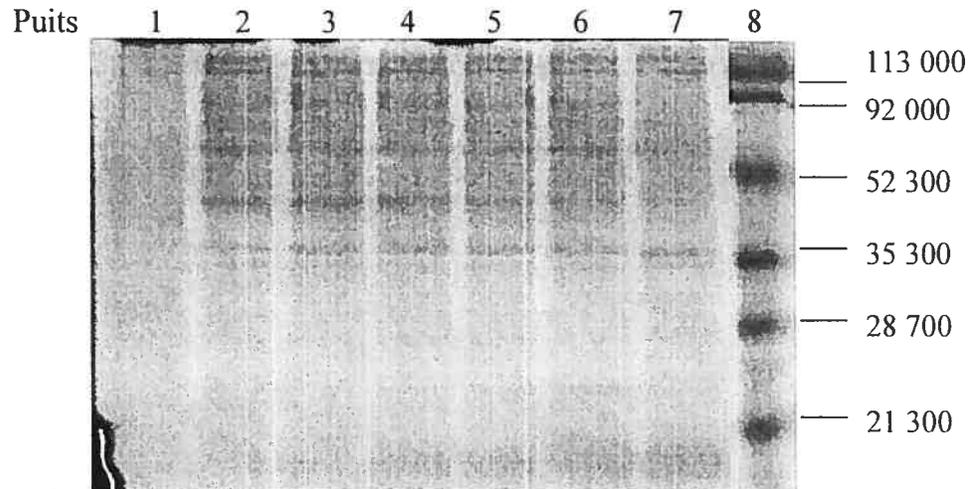


**Figure 34.** a) Graphique de l'activité de la GGT (en U/mL) dans le milieu de culture à pH 7,0 avec une densité optique de départ de 1,0 en fonction du temps d'induction en présence de 1 % méthanol à 30 °C pour le premier clone transformé avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  sous forme de cellules « fraîches » d'une semaine ou d'un mois. Cellules « fraîches » après une semaine, ●, cellules « fraîches » après un mois, ▲. b) Graphique de l'activité spécifique (en U/mg) en fonction du temps d'induction avec les mêmes conditions.

Il est très clair que le temps a un effet sur la capacité des levures à produire de la GGT. En effet, les cellules « fraîches » ont une activité, après 70 heures d'induction, de 0,08 U/mL, alors que les cellules plus vieilles d'un mois ont une activité de 0,04 U/mL, ce qui constitue une baisse importante de l'efficacité de la sécrétion. Il semble donc que des cellules « fraîches » puissent être utilisées, mais leur viabilité diminue avec le temps. De plus, il serait peut-être préférable de prendre des cellules congelées pour s'assurer d'un bon résultat.

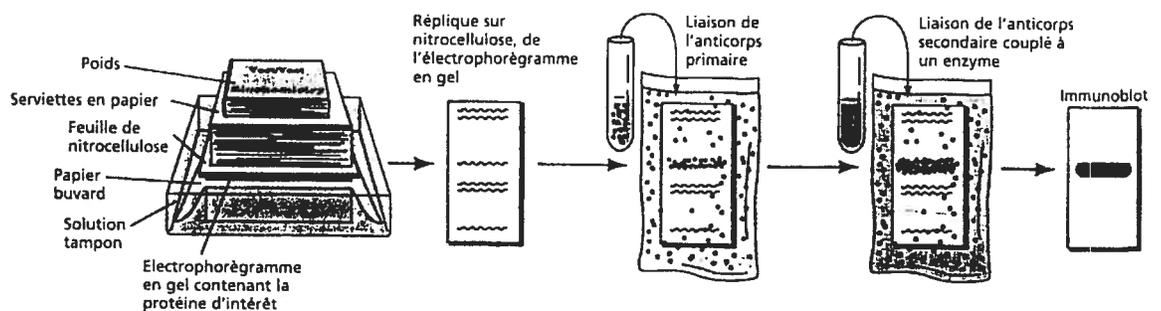
#### 4.2.5.6 Gel d'électrophorèse d'échantillons obtenus avec les meilleures conditions

Il semble donc, selon les résultats obtenus dans les sections précédentes, que les meilleures conditions identifiées soient d'utiliser des cellules assez fraîches dans un milieu de culture BMMY à pH 7,0 avec 1 % de méthanol pour induire l'expression et 1 % de « casamino acids ». De plus, la densité optique de départ doit être préférablement à 15,0. Ces conclusions ont toutes été tirées à partir de résultats de tests d'activité. Il serait important de constater la présence de la GGT grâce à des gels d'électrophorèse et une détection par immunobuvardage. Des aliquots ont donc été prélevés à différents temps d'induction dans ces conditions optimisées et ont été centrifugés. Le surnageant, contenant le milieu de culture et toute protéine sécrétée, de chacun de ces aliquots a été utilisé pour faire un gel d'électrophorèse. Puisque la protéine est sécrétée dans le milieu de culture, celle-ci est très diluée. Chacun des surnageants a donc été concentré selon un protocole décrit au chapitre 6. De plus, la détection a été effectuée selon une méthode utilisant du sulfate de zinc, de l'imidazole et du SDS. Cette technique permet de détecter des protéines présentes à des quantités de l'ordre du nanogramme<sup>162</sup>. Le colorant normalement utilisé, le bleu de Coomassie, permet quant à lui de faire une détection de l'ordre du microgramme de protéine. Le gel d'électrophorèse obtenu est représenté à la Figure 35.



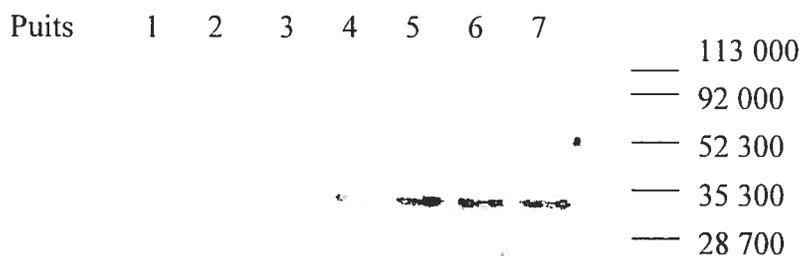
**Figure 35.** Gel d'électrophorèse d'acrylamide (12 % gel de séparation, 4 % gel de concentration) SDS-PAGE de surnageants concentrés provenant d'aliqots prélevés lors de l'induction de levures *P. pastoris* à une densité optique initiale de 15,0 à pH 7,0 avec 1 % de méthanol et 1 % de « casamino acids », puis centrifugés. Puits 1, 0 heure d'induction; puits 2, 14 heures; puits 3, 23 heures; puits 4, 39 heures; puits 5, 44 heures; puits 6, 64 heures; puits 7, 92 heures; puits 8, marqueur de poids moléculaire de protéine (en Da).

Comme il est possible de le constater, plusieurs bandes sont présentes, mais aucune n'augmente réellement en fonction du temps de manière très intense. Puisqu'il s'agit d'un gel dénaturant de protéines, deux bandes auraient dû correspondre aux sous-unités de la GGT. Selon la séquence primaire, des poids de 48 et de 23 kDa sont attendus. Une bande vers 34 kDa et d'autres autour de 60 kDa semblent augmenter en intensité avec le temps, mais il est difficile de clairement les identifier. Un immunobuvardage, tel que décrit au Schéma 21, a donc été réalisé.



**Schéma 21.** Étapes à suivre pour effectuer un immunobuvardage à partir d'un gel d'électrophorèse de protéines (ou électrophorogramme)<sup>3</sup>.

Cette technique consiste à faire un gel d'électrophorèse SDS-PAGE (électrophorégramme) permettant de séparer des protéines selon leur poids moléculaire<sup>3</sup>. Par la suite, les protéines de ce gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Cependant, ce transfert n'est pas effectué par le poids, tel qu'indiqué au Schéma 21, mais plutôt par un appareil de transfert appliquant un faible potentiel au gel d'électrophorèse. Les sites de la membrane non liés à des protéines sont bloqués grâce à de la caséine, retrouvée dans du lait en poudre sans gras. La membrane est ensuite incubée en présence d'un anticorps spécifique à la protéine recherchée. Dans ce cas-ci, un anticorps reconnaissant l'épitope *c-myc* (placé juste avant le « His-tag », Figure 20) a été utilisé. Par la suite, des lavages, en présence d'un détergent, sont effectués afin d'éliminer toute liaison non spécifique. La membrane est ensuite incubée en présence d'un deuxième anticorps reconnaissant une partie antigénique du premier anticorps. Ce deuxième anticorps est relié à une enzyme, la peroxydase de raifort. Après quelques lavages éliminant toute liaison non spécifique de la part du deuxième anticorps, un substrat chimioluminescent est placé avec la membrane afin de voir une réaction avec la peroxydase de raifort qui va libérer un composé luminescent. Ceci permet de révéler les bandes correspondant à la GGT. Les résultats sont montrés à la Figure 36.



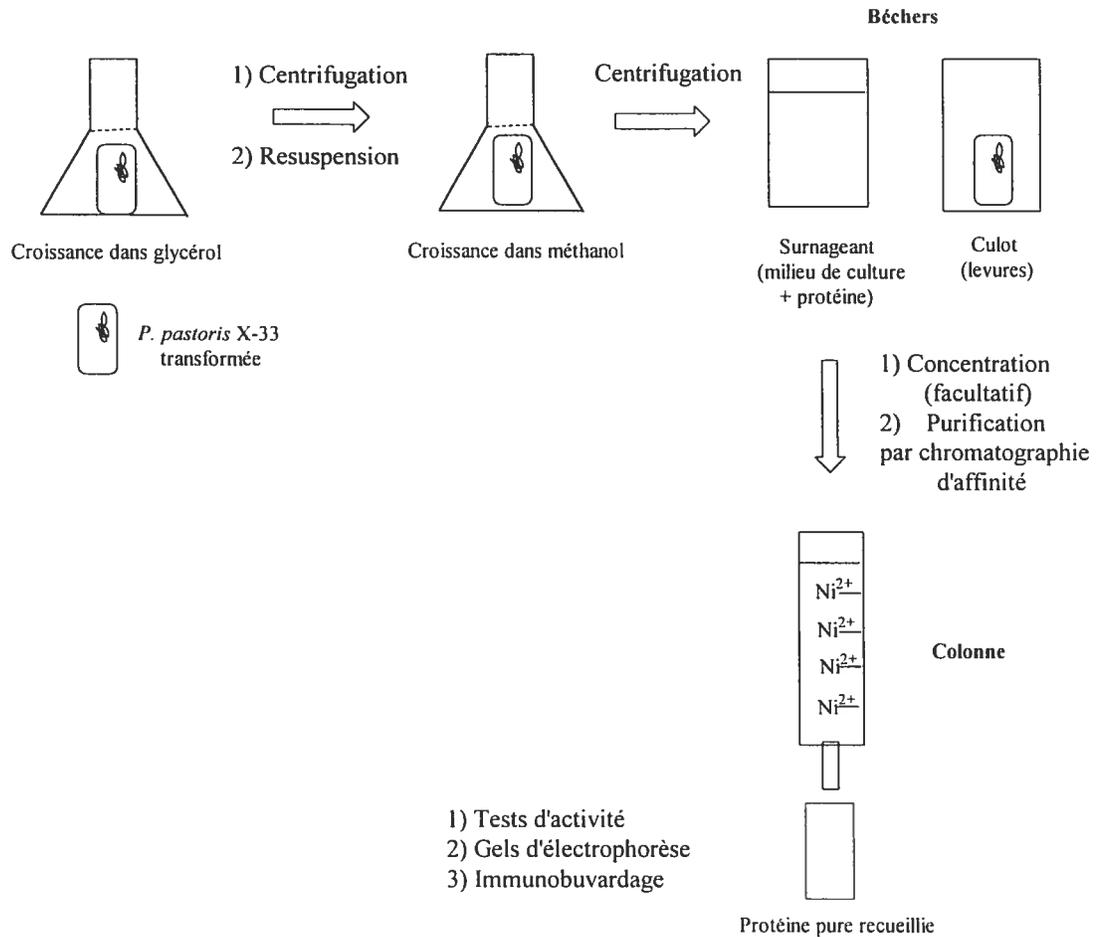
**Figure 36.** Immunobuvardage de surnageants concentrés provenant d'aliqouts prélevés lors de l'induction de levures *P. pastoris* à une densité optique initiale de 15,0 à pH 7,0 avec 1 % de méthanol et 1 % de « casamino acids », puis centrifugés. Puits 1, 0 heure d'induction; puits 2, 14 heures; puits 3, 23 heures; puits 4, 39 heures; puits 5, 44 heures; puits 6, 64 heures; puits 7, 92 heures.

L'anticorps utilisé reconnaît l'épitope *c-myc* situé sur la petite sous-unité de la GGT. Il est clair que la petite sous-unité de la GGT est présente, comme le montre la bande apparaissant autour de 34 kDa comme poids moléculaire. Ceci confirme donc bel et bien que l'activité obtenue dépend bien de la GGT. Pourtant, un poids moléculaire de 23 kDa était attendu pour la petite sous-unité ayant l'épitope *c-myc* et un « His-tag ». Cette différence pourrait être expliquée par la présence de sucres sur l'enzyme. En effet, la levure *P. pastoris* est bien connue pour mettre des sucres sur les protéines et même, parfois, à les hyperglycosyler<sup>163</sup>. Ce phénomène n'est donc pas surprenant et change beaucoup la mobilité sur un gel d'acrylamide qui a été utilisé ici. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en utilisant des enzymes effectuant de la déglycosylation. Cependant, ceci serait plus facile à réaliser avec de l'enzyme pure.

Ainsi, l'expression de la GGT est effectuée de manière efficace dans la levure *P. pastoris*. Il reste maintenant à purifier afin de pouvoir effectuer des études cinétiques avec de la GGT humaine tronquée. Ceci constitue le sujet de la prochaine section.

#### **4.2.6 Purification de la GGT humaine recombinante**

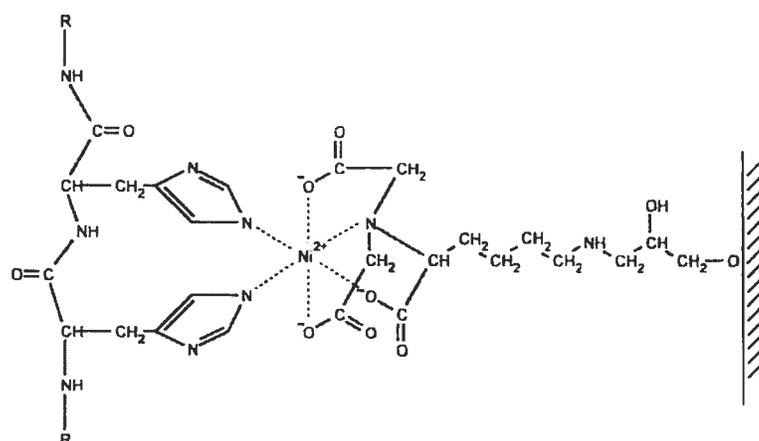
Il est maintenant possible d'obtenir une source de GGT recombinante à partir des levures *P. pastoris*. Il reste donc à purifier celle-ci des autres protéines présentes dans le milieu de culture. Le Schéma 22 représente les différentes étapes à effectuer afin d'y parvenir.



**Schéma 22.** Étapes à suivre pour purifier la GGT humaine tronquée recombinante formée à partir d'un système d'expression utilisant les levures *P. pastoris* transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ .

Les manipulations initiales sont les mêmes que dans le Schéma 20. Les conditions expérimentales utilisées sont celles optimisées, tel que démontré à la section précédente. Cependant, des aliquots ne sont pas prélevés. Tout le volume de milieu de culture contenant des levures est utilisé afin de purifier la GGT. Le protocole de purification a été optimisé avec des cultures de cellules ayant un volume d'environ 40-50 mL. Par la suite, une centrifugation est effectuée afin de séparer les levures du milieu de culture. Ce dernier, présent alors dans le surnageant, peut être concentré ou non avant d'être purifié par chromatographie d'affinité.

La dernière étape de purification, la chromatographie d'affinité, permet normalement d'obtenir de l'enzyme très pure. Dans notre cas, il a été décidé d'exploiter la présence du « His-tag » sur la petite sous-unité de la GGT. En effet, cette particularité permet de séparer la GGT recombinante des autres protéines présentes grâce à une matrice contenant des atomes de nickel. Le fonctionnement de ce type de colonne est montré à la Figure 37.



**Figure 37.** Liaison d'une protéine contenant un « His-tag » sur une matrice contenant un atome de nickel complexé à différents ligands (Ni-NTA)<sup>164</sup>.

Cette technologie est de plus en plus utilisée afin de purifier des protéines recombinantes ayant un « His-tag ». La matrice Ni-NTA contient des ligands de type acide nitrilotriacétique pouvant facilement se lier à un atome de nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ). La présence de quatre ligands autour de l'atome de nickel permet à celui-ci de demeurer solidement ancré à la matrice. En absence de protéine, les deux autres ligands autour de cet atome sont des molécules d'eau. Lorsqu'une protéine contenant une série de résidus histidines est présente, les molécules d'eau sont poussées et une liaison est faite avec l'atome de nickel. Ainsi, puisque les protéines ne contiennent pas toutes des histidines près l'une de l'autre, il est possible de retenir la protéine d'intérêt sur la colonne et de laisser passer les autres non désirées. Par la suite, l'utilisation d'un gradient d'imidazole permet d'éluer la protéine d'intérêt et celle-ci est alors purifiée. Il est certain que certaines protéines non recombinantes peuvent contenir des

histidines dans la même région et se lier à la matrice. Cependant, une série de lavages avec de plus faibles concentrations d'imidazole permet d'éluer les protéines liées de manière non spécifique.

Cette technique permet donc de purifier facilement les protéines. Cependant, il faut faire attention au pH de la solution. En effet, les histidines doivent se retrouver dans le bon état d'ionisation afin d'agir efficacement comme ligand du nickel. De plus, il ne doit pas y avoir d'agent chélatant dans les tampons utilisés pour ne pas enlever le nickel des ligands de la matrice. Enfin, une certaine force ionique doit être respectée. Par exemple, du NaCl est normalement présent à des concentrations autour de 300 mM pour y parvenir<sup>164</sup>. Une certaine optimisation de la méthode est donc nécessaire.

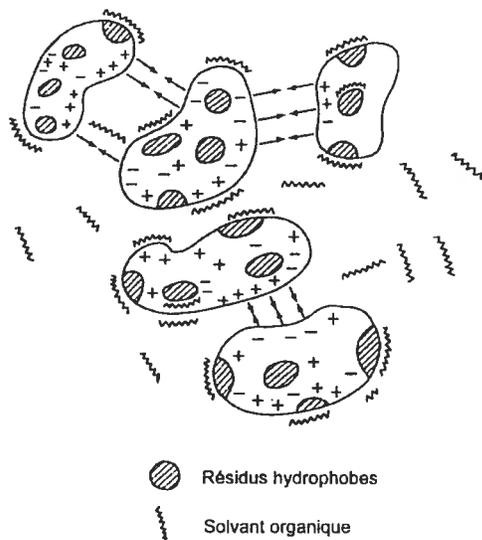
Différents essais ont été effectués afin de voir s'il était possible d'utiliser directement le milieu de culture avec la colonne contenant la matrice Ni-NTA. Pour commencer, le milieu de culture a été directement placé tel quel en contact avec la matrice. Une colonne a donc été préparée avec la matrice liant le nickel, puis le milieu de culture contenant de la GGT a été placé sur la colonne. Le débit, assez lent, permet normalement une bonne liaison de la protéine sur la colonne. Tout ce qui n'est pas fixé par la colonne est recueilli pour des analyses futures. Par la suite, des lavages avec des solutions de 5, 10 et 20 mM d'imidazole ont été faits afin d'éluer les protéines fixées de manière non spécifique à la matrice. Enfin, une élution avec 250 mM d'imidazole permet d'éluer la GGT tronquée contenant le « His-tag ». Ces solutions d'imidazole sont également faites à un pH différent afin d'aider à l'élution des protéines. Cependant, dans ce cas-ci, l'étude des échantillons recueillis à chaque étape a permis de constater que la protéine ne s'était pas liée à la matrice dans la colonne et était donc élue avant même l'utilisation de solutions d'imidazole.

Le milieu de culture contenant la GGT est situé à pH 7,0 et ne contient peut-être pas la bonne force ionique nécessaire à une bonne liaison à la matrice. Le pH du

milieu de culture a donc été ajusté à pH 8,0 grâce à une solution de KOH, puis du NaCl solide a été ajouté afin d'avoir une concentration de 300 mM de ce composé. Il faut dire que des composants dans le milieu de culture doivent déjà créer une certaine force ionique, mais celle-ci est inconnue. De plus, la force ionique peut aller jusqu'à 1 M sans problème. La même expérience a été tentée, mais sans succès. Encore une fois, la majorité de l'enzyme ne semble pas se lier à la matrice grâce au « His-tag ». Il semble donc y avoir interférence dans la liaison. Il ne faut pas oublier que le milieu de culture est très riche en acides aminés. Il est donc fort possible que des histidines, possiblement présentes dans le milieu de culture, saturer les sites de liaison près des atomes de nickel, ce qui ne permet pas une bonne liaison de la protéine. De plus, la concentration de la protéine peut être trop faible pour bien se lier à la matrice. Il semble donc que la concentration préalable de l'échantillon soit nécessaire. Il existe plusieurs manières d'y parvenir.

#### 4.2.6.1 Précipitation à l'acétone

La précipitation de protéine grâce à un solvant organique est une technique connue, mais moins utilisée dans les laboratoires<sup>159</sup>. Pourtant, elle offre beaucoup d'avantages. Le principe général réside dans le fait que la présence d'une certaine concentration de solvant organique diminue le pouvoir de solvation des protéines par les molécules d'eau. Ce phénomène est représenté à la Figure 38.

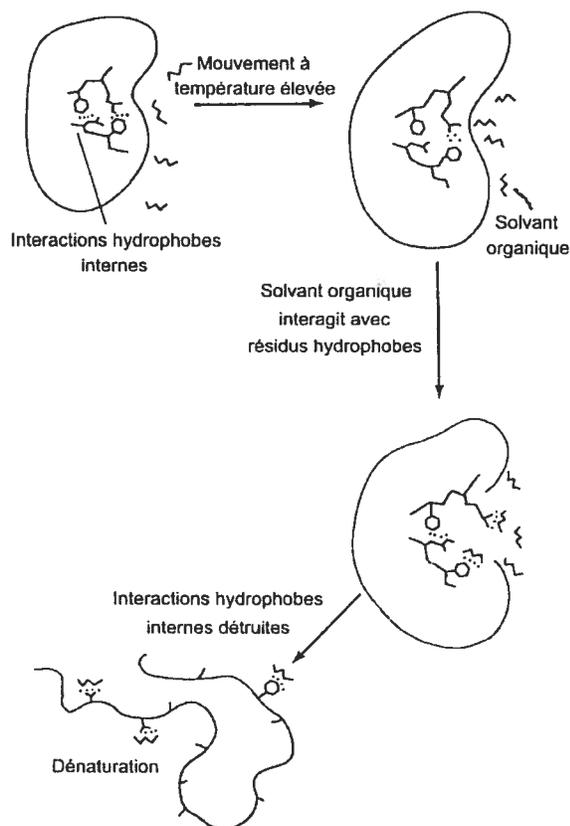


**Figure 38.** Précipitation des protéines en présence d'un solvant organique<sup>159</sup>.

Les protéines contiennent des résidus hydrophobes (phénylalanine, leucine, valine, etc) et des résidus hydrophiles (sérine, acide aspartique, lysine, etc). Normalement, peu de résidus hydrophobes se retrouvent à la surface des protéines. Cependant, lorsque c'est le cas, les molécules d'eau doivent être hautement organisées autour de ces surfaces. Les résidus hydrophiles, quant à eux, sont très bien solubilisés par les molécules d'eau. Lorsqu'un solvant organique est utilisé, il peut bien solvater les résidus hydrophobes. Cependant, celui-ci doit être partiellement solvato par des molécules d'eau, donc ces dernières ne peuvent plus autant servir à stabiliser les résidus hydrophiles. L'effet général est une baisse de la constante diélectrique du milieu<sup>159</sup>. Ceci amène donc les résidus hydrophiles à se stabiliser eux-mêmes d'une protéine à l'autre, ce qui conduit à une précipitation des protéines. Selon la taille des protéines et le nombre de résidus chargés à leur surface, la concentration de solvant organique nécessaire pour la précipitation peut varier.

Il est nécessaire de judicieusement choisir le solvant organique. En effet, celui-ci doit être miscible avec l'eau et ne pas trop dénaturer la protéine. L'acétone est un solvant de choix pour précipiter les protéines<sup>159</sup>. Cependant, il est important d'effectuer ces manipulations à des températures autour de 0 °C. En effet, lorsque la

température est plus élevée, le mouvement des protéines est plus grand, ce qui peut permettre l'interaction entre les résidus hydrophobes à l'intérieur de la protéine et le solvant organique, menant ainsi à la dénaturation. Ce désavantage est représenté au Schéma 23.



**Schéma 23.** Dénaturation possible de la protéine en présence d'un solvant organique à plus haute température<sup>159</sup>.

Donc, comme il est montré au Schéma 23, pour éviter la dénaturation des protéines, il est important de toujours vérifier la température des solutions de protéine, spécialement lors de l'ajout au départ de solvant organique. De plus, l'utilisation de contenants pré-réfrigérés est nécessaire.

L'induction de levures transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  avec une densité optique de départ de 1,0 a donc été tentée avec 1 % de méthanol dans un volume de 40 mL de milieu de culture BMMY à pH 7,0 contenant 1 % de « casamino

acids ». Après 100 heures, le milieu de culture a été centrifugé. Le surnageant, contenant normalement la GGT tronquée sécrétée, a été concentré en utilisant une faible concentration (20 %) d'acétone. Ceci peut permettre la précipitation de protéines non désirées. Ensuite, une centrifugation est effectuée pour séparer les protéines précipitées du milieu de culture. Une concentration de 50 % d'acétone est ensuite atteinte pour le surnageant de la centrifugation (selon une équation décrite au chapitre 6) et les mêmes manipulations sont faites. À cette étape, la GGT devrait se retrouver dans le culot. Les protéines précipitées sont ensuite purifiées par chromatographie d'affinité avec la colonne de Ni-NTA en utilisant des solutions d'imidazole de 5, 10, 20 et 250 mM. Tout ce qui ne s'est pas fixé à la colonne de Ni-NTA et les échantillons recueillis à la suite de l'élution avec les différentes solutions d'imidazole ont été analysés au niveau de l'activité spécifique. Les résultats obtenus se retrouvent dans le Tableau XVI.

**Tableau XVI.** Valeurs de la quantité de protéines, d'activité spécifique et de rendement obtenues pour chacun des échantillons récupérés au cours de la purification de la GGT tronquée recombinante effectuée avec une précipitation à l'acétone et une chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA.

Étape	Quantité de protéine (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Activité (U)	Rendement (%)
Surnageant	2,37	4,02	<b>9,54</b>	100,0
Surnageant 20 % acétone	1,23	5,64	<b>6,91</b>	72,5
Culot 20 % acétone	0,032	6,03	0,19	2,0
Surnageant 50 % acétone	0,74	0,92	0,68	7,1
Culot 50 % acétone	0,46	8,98	<b>4,14</b>	43,4
Milieu non fixé à la colonne	0,089	7,37	0,66	6,9
5 mM imidazole	0,026	9,21	0,24	2,5
10 mM imidazole	0,010	12,86	0,13	1,3
20 mM imidazole	0,0080	24,27	0,19	2,0
250 mM imidazole-1	0,0080	239,35	<b>1,92</b>	20,1
250 mM imidazole-2	0,0044	24,92	0,11	1,1

Plusieurs points importants peuvent être tirés de ce tableau. Pour débiter, comme il a déjà été expliqué plus tôt, l'activité spécifique est une mesure de la pureté de la GGT. Ainsi, après chacune des étapes de purification, celle-ci devrait augmenter puisque des impuretés sont normalement éliminées. L'activité, quant à elle, donne une idée quant à la quantité de GGT présente. Il est normal, au fil des étapes, qu'un peu de GGT soit perdue. Le nombre d'unités diminue donc au cours de

la purification, le but, bien sûr, étant d'en récupérer le plus à la fin. Le rendement de la purification est donc calculé comme étant le nombre d'unités d'enzymes récupérées en fonction du nombre initial présent dans le surnageant.

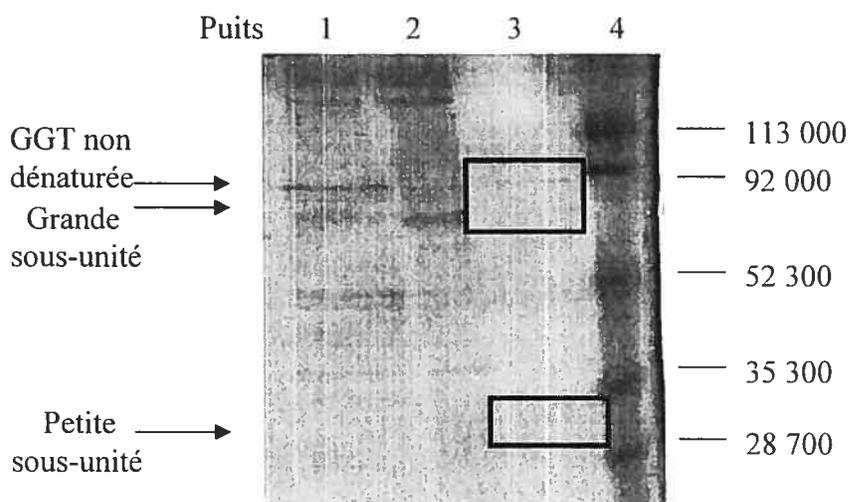
Il est possible de constater que la première étape de purification, la précipitation avec 20 % d'acétone, a permis d'éliminer une très faible quantité de protéine. En effet, le culot contient bien peu de protéines et il semble que de la GGT soit présente dans ce culot, comme le montre la haute activité spécifique dans cet échantillon. Il faut également remarquer qu'une certaine quantité de protéines a été perdue depuis le surnageant. Un certain précipité était initialement présent dans le surnageant à la suite de la décongélation de l'échantillon testé. Ce précipité a été éliminé avant de faire les premières précipitations et ne contenait pas de GGT (comme l'ont montré des tests d'activité). Ceci peut donc expliquer ce résultat. La précipitation avec 20 % d'acétone ne s'est donc pas montrée très efficace.

Cependant, la précipitation avec 50 % d'acétone a permis de faire précipiter la majorité de la GGT, comme le montre le nombre d'unités d'enzyme présente dans le culot par rapport à celui dans le surnageant. Cette étape s'est donc avérée efficace. De plus, la quantité de protéine a été maintenue au cours de la précipitation. Cependant, si la somme du nombre d'unité d'enzyme présente dans le surnageant et le culot est faite, cela donne un résultat inférieur au nombre d'unité initial avant cette étape (4,818 versus 6,910). Une perte d'activité a donc été observée, mais celle-ci n'est pas due à la perte d'une quantité de protéine. Il semble donc que l'acétone ait réussi à dénaturer, malgré plusieurs précautions, la GGT à ces concentrations. Des concentrations plus faibles d'acétone auraient pu être utilisées afin de minimiser cet effet, mais ce dernier aurait probablement été toujours présent et il n'est pas certain que toute la GGT aurait été précipitée.

Par la suite, la chromatographie d'affinité a été effectuée avec la colonne de Ni-NTA. Un peu de GGT ne s'est pas liée à la colonne, comme le montre le résultat du milieu ne s'étant pas fixé à la colonne. Ensuite, une série de lavages a été

effectuée. Peu de GGT s'est décrochée de la colonne, mais d'autres protéines indésirables ont pu être éliminées. Enfin, l'utilisation de 250 mM d'imidazole a permis d'obtenir, dès le premier lavage avec cette solution, un grand nombre d'unités d'enzyme, ce qui donne une enzyme pure avec une activité spécifique de 239 U/mg. Celle-ci se compare très bien avec les valeurs préalablement obtenues (450 U/mg) pour de la GGT humaine recombinante formée dans des cellules d'insectes<sup>14</sup>. Le rendement de 20 % est également très bon.

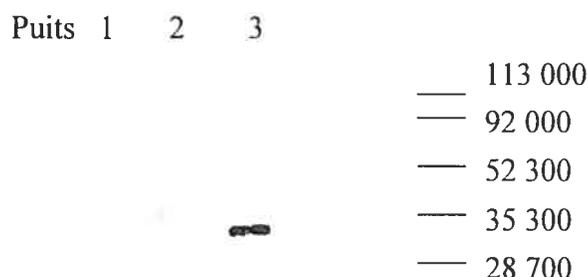
Un gel d'électrophorèse de certaines fractions de cette purification a également été réalisé. Le résultat est montré à la Figure 39.



**Figure 39.** Gel d'électrophorèse de protéines d'échantillons de la purification de la GGT humaine recombinante par précipitation à l'acétone et chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA. Puits 1, surnageant de départ; puits 2, milieu non fixé à la colonne; puits 3, fraction d'élution avec 250 mM imidazole; puits 4, marqueur de poids moléculaire (en Da).

Il est certain que ce gel n'est pas très clair. Ceci représente des échantillons non concentrés. La concentration de ceux-ci n'a pas donné le résultat escompté puisque de l'acétone est normalement utilisée pour faire la précipitation, mais ce composé était déjà présent dans les échantillons. De plus, peu d'échantillon était encore disponible pour utiliser d'autres protocoles de précipitation. Il est possible de voir les petite et grande sous-unités, mais celles-ci ne sont pas aux poids attendus.

Ceci peut être expliqué par la présence de sucres sur l'enzyme. De plus, de la GGT entière, non dénaturée, semble présente. Il est possible que la dénaturation de l'échantillon à 95 °C nécessaire avant de faire le gel d'électrophorèse ne se soit pas bien effectuée, ce qui a toujours été observé lors de gels d'électrophorèse de GGT de reins de rats<sup>93</sup>. Cependant, le gel a tout de même été utilisé pour faire un immunobuvardage et confirmer la présence de la GGT recombinante. Le résultat obtenu est montré à la Figure 40.



**Figure 40.** Immunobuvardage du gel d'électrophorèse d'échantillons de la purification de la GGT humaine recombinante par précipitation à l'acétone et chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA. Puits 1, surnageant de départ; puits 2, milieu non fixé à la colonne; puits 3, fraction d'élution avec 250 mM imidazole.

Il est donc très clair que la protéine présente lors de l'élution avec 250 mM d'imidazole est de la GGT recombinante, elle seule ayant un épitope *c-myc* reconnu par les anticorps utilisés dans l'immunobuvardage. Encore une fois, le poids moléculaire est plus élevé. La bande correspondant à la petite sous-unité n'est malheureusement pas visible dans les autres puits. Il est possible que la concentration de la GGT n'y soit pas assez élevée, comme il a déjà été constaté lors de l'essai d'immunobuvardages au cours de la vérification de l'expression de la GGT à la section 4.3.4.

La purification de la GGT a donc été effectuée avec succès grâce à une précipitation à l'acétone et une étape de chromatographie d'affinité sur colonne de

Ni-NTA. Le résultat de l'immunobuvardage montre clairement que la GGT recombinante est bel et bien présente dans les fractions d'élution et celle-ci semble assez pure, selon le gel d'électrophorèse de protéines. Cependant, l'étape de précipitation avec 50 % d'acétone a mené à une perte importante d'unités de GGT. D'autres concentrations d'acétone seraient possibles (30 ou 40 %), mais le risque de dénaturation est toujours important. Il est donc nécessaire de trouver un autre protocole de concentration. Une précipitation au sulfate d'ammonium est donc envisagée et est présentée à la section suivante.

#### 4.2.6.2 Précipitation au sulfate d'ammonium

Le sulfate d'ammonium est souvent utilisé pour précipiter des protéines. En effet, lorsqu'il est utilisé à de faibles concentrations, celui-ci entoure les charges présentes sur la protéine, ce qui aide cette dernière à être plus soluble dans l'eau<sup>3</sup>. Par la suite, à un certain point, lorsque la concentration de sels est très grande, les molécules d'eau servent plutôt à solvater les ions du sulfate d'ammonium, ce qui laisse la protéine seule avec les charges à solvater<sup>159</sup> et provoque la précipitation de cette dernière. Il reste ensuite à centrifuger le mélange afin d'obtenir la protéine dans le culot et le reste du milieu de culture, dans le surnageant. Par la suite, la protéine peut être resolubilisée dans le tampon désiré pour une prochaine étape de purification. Cette technique est largement utilisée afin de concentrer rapidement et efficacement des protéines en grande quantité. De plus, il peut s'agir d'une technique de purification, comme dans le cas des précipitations avec un solvant organique. En effet, une précipitation de protéines d'un mélange peut être effectuée à un certain pourcentage de saturation de sulfate d'ammonium, puis à un pourcentage plus élevé. Il faut choisir judicieusement le sel utilisé pour faire cette précipitation. Celui-ci ne doit pas interagir avec la protéine de manière à la dénaturer. Certains ions, comme le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{Mg}^{2+}$ , sont reconnus pour avoir cet effet secondaire<sup>3,159</sup>. Le sulfate d'ammonium, quant à lui, ne dénature pas les protéines et est soluble à de très grandes concentrations dans l'eau, donc il a été utilisé pour purifier la GGT.

Ainsi, comme dans le cas de la précipitation à l'acétone, l'induction de levures transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  avec une densité optique de départ de 15,0 a donc été tentée avec 1 % de méthanol dans un volume de 40 mL de milieu de culture BMMY à pH 7,0 contenant 1 % de « casamino acids ». Après 90 heures, le milieu de culture a été centrifugé. Par la suite, une quantité de sulfate d'ammonium solide a été ajoutée au surnageant afin d'obtenir 60 % de saturation de la solution. Après une agitation d'une heure, une centrifugation est effectuée et le culot et le surnageant sont séparés. Le surnageant est ensuite saturé à 95 % avec du sulfate d'ammonium. Encore une fois, une centrifugation est effectuée et le culot, cette fois-ci, est conservé. Ces conditions de saturation ont été utilisées puisqu'elles se sont avérées les meilleures lors de la purification de GGT de rein de rat<sup>83</sup>. Le culot est resuspendu dans du tampon de lavage ne contenant pas d'inhibiteur puis est purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de Ni-NTA. Des échantillons sont conservés tout au long de la purification et sont analysés au niveau de l'activité spécifique. Les résultats obtenus sont montrés au Tableau XVII.

**Tableau XVII.** Valeurs de la quantité de protéines, d'activité spécifique et de rendement obtenues pour chacun des échantillons récupérés au cours de la purification de la GGT tronquée recombinante effectuée avec une précipitation au sulfate d'ammonium et une chromatographie d'affinité avec une colonne de Ni-NTA.

Étape	Quantité de protéine (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Activité (U)	Rendement (%)
Surnageant	2,43	3,02	<b>7,34</b>	100,0
Surnageant 60 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,37	2,49	<b>5,89</b>	80,2
Culot 60 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,62	1,39	0,86	11,7
Surnageant 95 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,89	1,13	2,13	29,0
Culot 95 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,53	7,23	<b>3,85</b>	52,5
Milieu non fixé à la colonne	0,34	1,59	0,54	7,4
5 mM imidazole	0,057	1,83	0,10	1,4
10 mM imidazole	0,0044	7,03	0,031	0,4
20 mM imidazole	0,0050	21,18	0,11	1,4
250 mM imidazole-1	0,012	283,62	<b>3,40</b>	46,4
250 mM imidazole-2	0,011	7,39	0,084	1,1

La signification des colonnes est la même que pour le Tableau XVI. Dans ce cas-ci, la première précipitation avec 60 % de saturation en sulfate d'ammonium a permis d'obtenir la majorité de l'enzyme dans le surnageant, mais cela a mené à une perte d'unités d'enzyme dans le culot. Il ne semble donc pas nécessaire d'effectuer cette étape ultérieurement. Par la suite, une précipitation avec 95 % de saturation a été effectuée. Celle-ci ne semble pas avoir bien fonctionné, comme le montre le

nombre d'unités présent dans le surnageant (encadré dans le Tableau XVII) alors que la majorité de l'enzyme, à ce pourcentage, devrait se retrouver dans le culot. Malgré des vitesses ou des temps de centrifugation différents, il a été impossible de modifier énormément le rendement de cette étape. Il est possible que la concentration de la protéine ne soit pas suffisamment élevée dans la solution, ce qui se traduit par une faible différence de densité entre la protéine et les sels environnants et une mauvaise précipitation par centrifugation<sup>159</sup>. Cependant, l'expérience a été poursuivie afin de purifier l'enzyme par chromatographie d'affinité.

La colonne de Ni-NTA semble avoir bien fonctionné, ce qui se traduit par une majorité de la GGT liée à la colonne, puis à son élution de manière efficace par une solution de 250 mM imidazole. En effet, cette technique a permis d'obtenir de la GGT avec une activité spécifique de 284 U/mg, ce qui est supérieur à la purification faite en présence d'acétone. De plus, aucune dénaturation n'a eu lieu au cours de la précipitation de la protéine, comme le montre la conservation des unités de GGT tout au cours de la purification. Enfin, un rendement de 46 % a été obtenu, ce qui est supérieur au rendement de 20,1 % avec de l'acétone.

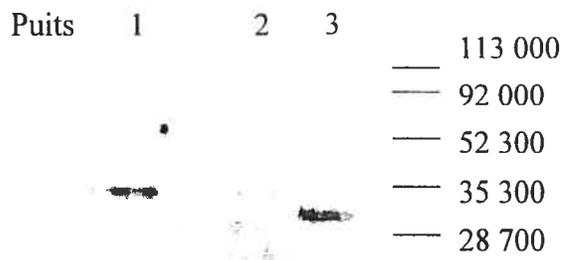
Un gel d'électrophorèse de protéine et un immunobuvardage ont également été effectués pour les échantillons de cette purification. Des résultats très similaires à ceux obtenus pour la purification avec une précipitation à l'acétone ont été observés. Il semble donc que ces deux protocoles permettent de purifier la GGT humaine recombinante de manière efficace. La précipitation avec le sulfate d'ammonium semble plus efficace que celle avec l'acétone, malgré la présence d'un problème au niveau de la centrifugation à haute concentration de sels. Il serait possible d'envisager de concentrer initialement la protéine par ultrafiltration et centrifugation. Cela a été tenté dans le laboratoire, mais sans succès. Il faut dire que le volume à concentrer est assez élevé pour les tubes normalement disponibles sur le marché. De plus, le volume utilisé ici est assez faible, il est possible de penser qu'avec de plus grands volumes de milieu de culture, ce problème puisse être réglé. D'autres solutions à ce problème seront proposées dans la section Discussion.

La GGT humaine recombinante a donc été exprimée avec succès dans un système de levure *P. pastoris* utilisant une induction au méthanol. Il reste maintenant à caractériser cette nouvelle forme de GGT humaine sans ancre transmembranaire et avec un « His-tag » en position C-terminale.

## 4.2.7 Caractérisation de la GGT humaine recombinante

### 4.2.7.1 Présence de sucres

Des gels d'électrophorèse de la GGT recombinante ont toujours montré un poids plus élevé pour les deux sous-unités. Il est possible que cela soit dû à la présence de sucres sur l'enzyme, ce qui change sa mobilité électrophorétique. Normalement, il s'agit de complexes formés de différentes unités de mannose, de glucose et de dérivés de ceux-ci. Afin de vérifier cette possibilité, il existe des déglycosidases capables de cliver certains types de sucres. La levure *P. pastoris* est reconnue pour hyperglycosyler, parfois, des protéines grâce à des sucres liés sur l'azote de la chaîne latérale d'asparagines<sup>163</sup>. La glycosidase F est une enzyme capable de cliver directement le lien reliant l'asparagine de la protéine et le premier sucre du complexe, ce qui permet d'éliminer complètement ce dernier, contrairement à d'autres enzymes clivant seulement un sucre en périphérie du complexe<sup>150</sup>. Des études préliminaires d'incubation de la GGT recombinante avec la glycosidase F ont été réalisées. Un gel d'électrophorèse et un immunobuvardage ont été effectués avec cet échantillon de GGT. Le résultat de l'immunobuvardage est montré à la Figure 41.



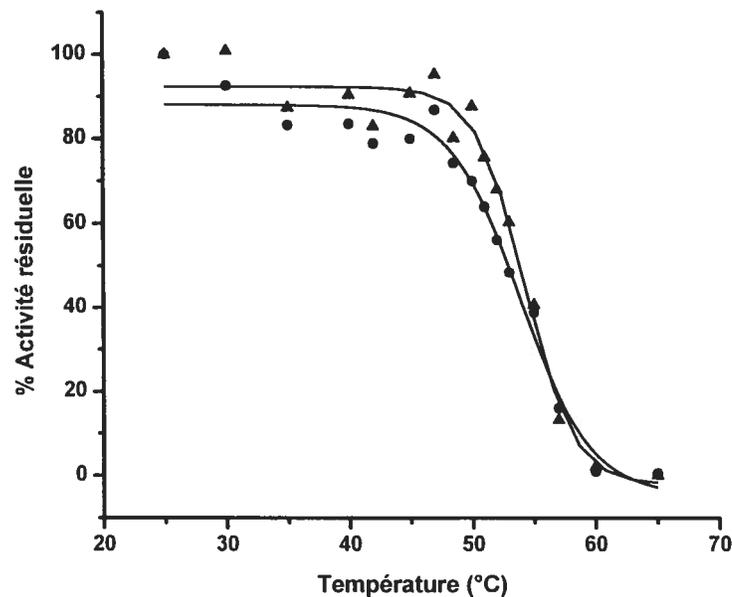
**Figure 41.** Immunobuvardage d'échantillons de GGT humaine recombinante ayant subi, ou non, une déglycosylation. Puits 1, GGT humaine d'aliquote de surnageants concentrés au cours de l'induction; puits 2, GGT humaine ayant subi les mêmes dénaturations que dans le cas de l'échantillon à déglycosyler, mais sans glycosidase F; puits 3, GGT humaine ayant subi des dénaturations et des clivages par la glycosidase F.

La Figure 41 montre une bande pour la petite sous-unité dans tous les puits (même dans le deuxième, ce qui a été confirmé par un temps d'exposition plus long du film, un problème est probablement survenu au cours de la précipitation de l'échantillon). Cependant, celle-ci passe d'un poids d'environ 34 kDa dans le cas de la GGT jamais mise en présence de glycosidase à un poids d'environ 30 kDa. Il semble donc que la présence de sucres influence la mobilité de la protéine sur le gel d'électrophorèse, d'où l'erreur sur la détermination du poids moléculaire. Cependant, le poids observé n'est pas encore celui prédit par la séquence primaire de la GGT. En effet, un poids d'environ 23 kDa est attendu. Il existe également des sucres liés à des résidus thréonine ou sérine pouvant être présents sur la GGT. La levure *P. pastoris* est également capable d'ajouter des sucres de ce type<sup>165</sup>. Il est donc fort possible que la différence de poids moléculaire observée soit donc uniquement due à la présence de différents sucres. Une étude plus exhaustive serait donc nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

#### 4.2.7.2 Stabilité thermique

La GGT humaine recombinante pure a été obtenue à partir d'un système de levure. Il est maintenant important de voir si cette enzyme possède les mêmes caractéristiques que les autres GGT préalablement étudiées. L'une des premières

expériences est de vérifier la stabilité de l'enzyme par rapport à la température. En effet, une hausse de température mène normalement à une dénaturation. La GGT humaine recombinante provenant du système des levures a donc été incubée à différentes températures, puis un aliquot est prélevé afin de faire un test d'activité. Cette expérience a également été effectuée avec la GGT de rein de rat purifiée dans notre laboratoire et qui a été utilisée au cours des études cinétiques effectuées aux chapitres précédents. La courbe de dénaturation obtenue est montrée à la Figure 42.



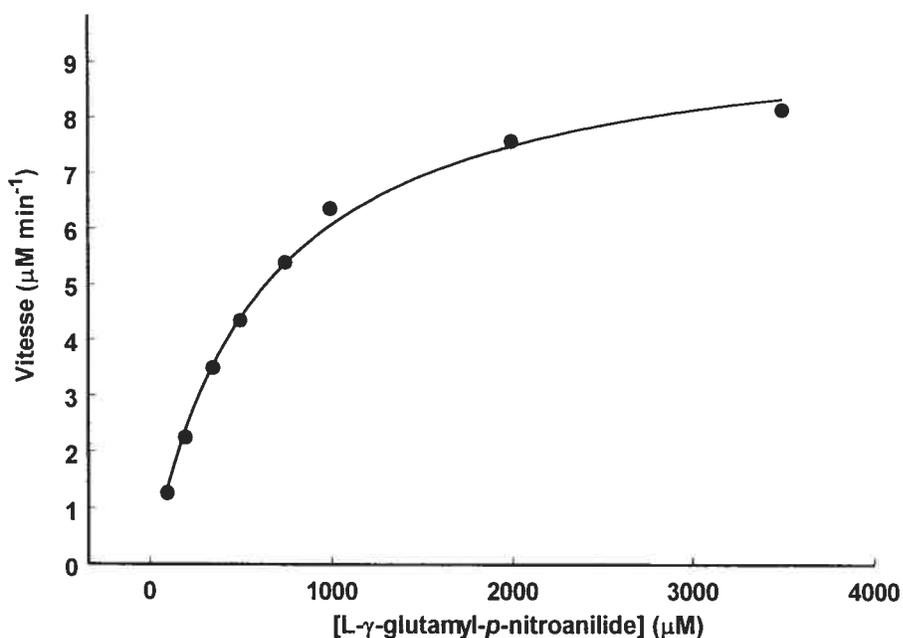
**Figure 42.** Graphique du pourcentage d'activité spécifique résiduelle en fonction de la température de pré-incubation pour la GGT de rein de rat (●) et pour la GGT humaine recombinante du système des levures (▲).

Cette courbe montre que les deux enzymes testées, la GGT de rein de rat et la GGT humaine recombinante du système des levures, sont aussi sensibles l'une que l'autre à la température. Il semble y avoir une meilleure stabilité au niveau de la GGT recombinante (la baisse d'activité spécifique débute à plus haute température que dans le cas de la GGT de rein de rat), mais cette différence n'est pas très significative. Les deux enzymes semblent stables jusqu'à 45 °C, puis une baisse rapide de l'activité spécifique est observée avec un point d'inflexion d'environ 54 °C. Ensuite, après 60 °C, l'activité spécifique est nulle. Il ne semble pas y avoir

d'intermédiaire durant cette dénaturation thermique. La stabilité de ces deux enzymes est donc similaire.

#### 4.2.7.3 Constantes cinétiques pour les substrats donneur et accepteur

Il est maintenant nécessaire de comparer les constantes cinétiques de la GGT recombinante pour les principaux substrats avec les résultats obtenus pour d'autres enzymes. En effet, des différences dans la glycosylation dues au système d'expression utilisé et la présence de l'épitope *c-myc* et du « His-tag » sur l'enzyme purifiée des levures peuvent créer quelques changements. Les constantes cinétiques  $K_M$  et  $k_{cat}^{norm}$  pour le substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et le substrat accepteur glycylglycine ont été déterminées pour la GGT recombinante. Le résultat obtenu pour le substrat donneur est montré à la Figure 43.



**Figure 43.** Graphique Michaelis-Menten pour la détermination des constantes cinétiques  $K_M$  et  $k_{cat}^{norm}$  pour le substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide en présence d'une concentration saturante de 20 mM du substrat accepteur glycylglycine dans du tampon 0,1 M Tris-HCl à pH 8,0 et à 37 °C.

Dans le cas de la détermination des constantes cinétiques pour la glycyglycine, une concentration saturante de 1 mM de L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide a été utilisée. Les résultats obtenus, comparés à ceux d'autres types de GGT, sont présentés au Tableau XVIII.

**Tableau XVIII.** Constantes cinétiques  $K_M$  et  $k_{cat}^{norm}$  des substrats L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et glycyglycine pour la GGT humaine recombinante tronquée provenant du système des levures et pour d'autres types de GGT.

Type de GGT	L- $\gamma$ -glutamyl- <i>p</i> -nitroanilide		Glycyglycine	
	$K_M$ ( $\mu$ M)	$k_{cat}^{norm}$ ( $\times 10^3$ min <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}^{norm}$ ( $\times 10^3$ min <sup>-1</sup> )
GGT humaine tronquée et avec « His-tag » (levure)	614 $\pm$ 40	76 $\pm$ 2	6,3 $\pm$ 0,4	60 $\pm$ 2
GGT humaine tronquée (cellules d'insectes) <sup>14</sup>	2100	79	3,4	42
GGT humaine (foie)	810 <sup>166</sup>	69 <sup>11</sup>	12,4 <sup>166</sup>	---

--- : Aucune valeur n'a été trouvée pour cette constante, sauf pour la GGT humaine recombinante non tronquée dans des cellules d'insectes (42 000 min<sup>-1</sup>).

Les constantes cinétiques sont donc assez similaires d'un système d'expression à l'autre, ce qui confirme que la GGT tronquée et avec un « His-tag » possède un comportement similaire à celle provenant des cellules d'insectes. Il est à noter que le  $K_M$  du substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide semble meilleur dans le cas de l'enzyme provenant des levures. La présence du « His-tag » pourrait créer un changement de conformation menant à une liaison différente des substrats. Cependant, cela ne semble pas vraiment affecter la vitesse de catalyse effectuée par l'enzyme, comme le montrent les valeurs de  $k_{cat}^{norm}$ . Il semble donc, à quelques différences près, que la GGT humaine tronquée recombinante provenant du système

d'expression des levures aie les mêmes propriétés cinétiques que la GGT humaine provenant d'autres systèmes.

### **4.3 Discussion**

La nécessité de posséder une source constante de GGT humaine n'est plus à démontrer. En effet, la GGT humaine est impliquée dans plusieurs réactions et désordres physiologiques et son étude exhaustive doit être réalisée afin de mieux comprendre son mécanisme et connaître sa structure. Cependant, pour y arriver, il est impossible, pour des raisons éthiques et de coûts, de purifier de la GGT directement des organes en grande quantité. Une source de GGT recombinante offre donc la possibilité d'en posséder et de pouvoir la modifier par mutagenèse dirigée.

Comme il a été vu dans l'introduction, les systèmes d'expression de GGT recombinante souffrent tous de quelques lacunes. Dans les systèmes chez *E. coli*<sup>136</sup> ou *S. cerevisiae*<sup>137</sup>, la GGT purifiée est parfois seulement le précurseur, son activité n'est pas très élevée et la quantité obtenue est nettement insuffisante. Ceci peut être dû aux modifications post-traductionnelles différentes dans ces micro-organismes par rapport aux systèmes eucaryotiques supérieurs. Ceci est démontré par les activités spécifiques et les quantités de GGT obtenues dans des systèmes plus complexes tels les cellules V79<sup>139</sup> et les cellules d'insectes Sf21<sup>65</sup>. Cependant, ces systèmes sont très longs à établir, ce qui n'est pas pratique lorsque des mutants doivent être effectués. De plus, ces deux systèmes sont très coûteux et ne s'appliquent pas aisément à la production de grandes quantités d'enzyme pour des études structurales. Un autre système d'expression de GGT recombinante est donc nécessaire afin de pouvoir obtenir aisément de l'enzyme en grande quantité et avec la séquence primaire désirée.

La levure *P. pastoris* est maintenant de plus en plus utilisée pour produire des protéines recombinantes. Depuis son utilisation à cet effet en 1985, un nombre croissant de publications montre l'utilisation de ce système dans la production en grande quantité de protéines<sup>147</sup>. Cet organisme unicellulaire possède l'avantage

d'effectuer plusieurs des modifications post-traductionnelles présentes chez les eucaryotes supérieurs. De plus, il est possible de l'utiliser aisément dans un fermenteur, ouvrant ainsi la porte à une production industrielle, dans certains cas, de ce système.

Ainsi, depuis son étude en 1985<sup>148</sup>, la levure *P. pastoris* a été utilisée pour produire une grande quantité de protéines ayant diverses applications. Ainsi, la glycoprotéine D du virus de l'herpès équin a été obtenue avec succès sous forme sécrétée avec un rendement de 50-100 mg pour un litre de milieu de culture<sup>163</sup>. Ceci représente une quantité largement suffisante pour être utilisée dans des tests *in vivo* vérifiant l'utilité de cette protéine dans l'immunisation de souris contre ce virus, ce qui a été fait avec succès. Dans ce même but, l'hémagglutinine, une protéine présente dans la membrane du virus de l'influenza, a été produite avec succès sous forme monomérique et soluble dans la levure *P. pastoris*<sup>160</sup>. Cette protéine a été injectée à des souris et a permis de protéger celles-ci contre ce virus qui peut mener à la mort d'humains et d'animaux. Une grande quantité de protéine est donc nécessaire et le système d'expression dans la levure permet d'atteindre ce but.

L'expression de ces protéines peut se faire en utilisant différents types de plasmides et de souches de levure. Il a donc été nécessaire de judicieusement choisir les caractéristiques désirées pour la GGT recombinante humaine avant de débiter le travail sur un nouveau système d'expression.

#### 4.3.1 Construction du plasmide

La mise au point d'un nouveau système d'expression permet de choisir le type de GGT désiré et ses principales caractéristiques. Ainsi, comme il a été démontré dans l'introduction, la purification d'une enzyme possédant une ancre transmembranaire est assez problématique et demande l'utilisation d'une protéase ou d'un détergent afin de se débarrasser des membranes cellulaires. Il est possible,

grâce à la mutagenèse dirigée, d'éliminer une partie du gène codant pour la GGT. Il a donc été décidé que la séquence d'ADN correspondant à l'ancre transmembranaire ne serait pas conservée dans le plasmide d'expression pour les levures. Ce type d'ancre a déjà été proposé comme jouant un rôle dans la localisation de l'enzyme dans la cellule<sup>14</sup>. Cependant, l'expression d'une enzyme tronquée à ce niveau a été réalisée dans des cellules d'insectes et a permis d'obtenir une enzyme hautement active sécrétée dans le milieu réactionnel<sup>14</sup>. Ainsi, sa présence ne semble pas nécessaire à l'activité enzymatique. Il est possible que celle-ci aide au bon repliement, mais la dénaturation de la GGT avec ou sans ancre transmembranaire se fait avec les mêmes concentrations d'urée, montrant que la structure quaternaire est probablement la même<sup>14</sup>. Ces résultats encourageants nous ont poussé à désirer une GGT recombinante sans ancre transmembranaire. Cependant, la manipulation de cellules d'insectes est plus fastidieuse que celles de levure, alors un nouveau système d'expression utilisant *P. pastoris* peut combler cette lacune.

L'absence d'ancre transmembranaire aide à la sécrétion, mais il faut également s'assurer que l'enzyme sera bel et bien sécrétée à l'extérieur de la cellule et non enfermée à l'intérieur. Ainsi, le bris des cellules n'est pas nécessaire. Une séquence d'ADN correspondant à un facteur de sécrétion doit donc être ajoutée à celle de la GGT. Cette séquence peut provenir d'un plasmide commercial la contenant déjà. Le choix du plasmide pPICZ $\alpha$ A répond donc bien à cette demande. Il existe d'autres séquences permettant la sécrétion de la protéine, mais, dans plusieurs cas, le facteur  $\alpha$  provenant de *S. cerevisiae* retrouvée dans le plasmide pPICZ $\alpha$ A s'est avéré le meilleur pour y parvenir<sup>149,150</sup>. Il faut cependant bien construire le plasmide afin de s'assurer que la séquence d'ADN du gène de la GGT soit dans le même cadre de lecture que celle du facteur  $\alpha$ . Cette séquence protéique nécessaire à la sécrétion est donc fixée à la protéine. Celle-ci est clivée par les enzymes Kex2 et Ste13p afin de ne pas se retrouver sur la protéine finale. Il a déjà été démontré, dans le cas de l'expression de l'hémagglutinine discuté précédemment, que ces enzymes n'ont pas complètement clivé la séquence, mais un espaceur entre la séquence et le début de l'enzyme est normalement nécessaire, ce qui est le cas dans le

plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  construit ici<sup>160</sup>. Il semble donc moins probable que ce cas arrive dans l'expression de la GGT.

Enfin, l'enzyme étant sécrétée, il serait bien de pouvoir aisément la purifier. La levure *P. pastoris* est déjà reconnue comme étant un organisme ne sécrétant pas beaucoup de protéines et peu de protéines sont présentes dans son milieu de culture, facilitant ainsi la purification<sup>150</sup>. Cependant, l'ajout d'un « His-tag » à la partie C-terminale de la protéine permet d'isoler facilement la protéine grâce à une chromatographie d'affinité avec une matrice de type Ni-NTA. Ainsi, il sera possible d'obtenir de la GGT pure sans trop d'étapes de purification et en peu de jours. De plus, la présence d'un épitope *c-myc* juste avant le « His-tag » permet la détection de l'enzyme au cours d'immunobuvardage.

Le plasmide pPICZ $\alpha$ A possède donc les caractéristiques nécessaires à l'expression d'une GGT humaine recombinante sécrétée et avec un « His-tag ». De plus, un gène de résistance à l'antibiotique Zeocin est présent. Ce type de résistance est nécessaire afin de pouvoir sélectionner les bactéries et les levures contenant le plasmide d'intérêt<sup>151</sup>. Il existe différents plasmides contenant un gène de résistance à un autre antibiotique (par exemple, ampicilline) et un gène codant pour la production de l'acide aminé histidine<sup>148</sup>. Ainsi, lors de transformations dans des bactéries, celles-ci sont sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline. L'ampicilline ne fonctionnant pas avec les levures, un autre type de sélection doit être fait. Ainsi, l'utilisation de souches de levure ne produisant pas leur propre histidine (par exemple, les souches de *P. pastoris* GS-115) est nécessaire<sup>148</sup>. La transformation du plasmide d'intérêt dans ces levures est alors suivie grâce à une sélection sur un milieu minimal ne contenant pas d'histidine, ce qui donne parfois des faux-positifs. L'ajout d'un gène pour la résistance à l'ampicilline et pour la production d'histidine rend donc le plasmide beaucoup plus gros et moins maniable. Le plasmide pPICZ $\alpha$ A confère donc un avantage certain à ce niveau. L'antibiotique Zeocin est un peu plus onéreux et certaines précautions doivent être prises lors de son utilisation, mais ce choix s'avère meilleur par rapport à d'autres systèmes de sélection<sup>151</sup>.

Le plasmide pPICZ $\alpha$ A possède le promoteur *AOX1*. Celui-ci va permettre l'expression de la protéine d'intérêt seulement en présence de méthanol. Ainsi, il est possible d'induire au moment désiré l'expression de la GGT. Il existe cependant d'autres types de promoteur, tel le promoteur GAP (promoteur du gène codant pour l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase)<sup>149,170</sup>. Celui-ci n'est pas induit par la présence d'un inducteur dans le milieu de culture. Il va toujours produire la protéine (il est constitutif<sup>149</sup>), ce qui évite l'usage du méthanol. Cependant, il faut s'assurer que la protéine n'est pas toxique pour la levure, son accumulation pouvant mener à la mort de la cellule. Cependant, dans notre cas, une induction au moment désiré était voulue, ce qui a mené le choix vers un plasmide contenant le promoteur *AOX1*.

Le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  a donc été obtenu avec succès. Celui-ci possède la séquence désirée et les éléments nécessaires à une bonne expression dans les levures. Les levures *P. pastoris* ont donc ensuite été transformées.

#### **4.3.2 Transformation des levures *P. pastoris* et intégration dans le génome**

Comme il a été décrit dans la section 4.2.2, le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  a été linéarisé afin de permettre une meilleure intégration dans le génome de la levure. En effet, il existe différents types d'intégration possibles qui possèdent chacune leurs avantages. Ainsi, l'intégration totale du plasmide dans le génome permet de conserver le gène de résistance à l'antibiotique Zeocin et l'intégrité du gène *AOX1* codant pour l'enzyme oxydase d'alcool. Cette enzyme permet de métaboliser le méthanol et peut représenter jusqu'à 30 % des protéines solubles dans la levure en présence de ce composé<sup>150</sup>. Ainsi, la présence de ce gène permet à la levure de métaboliser rapidement le méthanol et de croître plus rapidement. Dans le cas du remplacement complet du gène *AOX1*, un autre gène, *AOX2*, codant pour le même

type d'enzyme mais métabolisant plus lentement le méthanol, sera amené à contribution<sup>167</sup>. La souche de levure sera alors appelée Mut<sup>S</sup> (S pour « slow »).

La souche utilisée dans notre cas a été la X-33. Cette souche ne contient pas de mutation de gène et est donc considérée de type sauvage<sup>149,158</sup>. L'intégration du plasmide dans le génome devrait permettre une croissance rapide sur un milieu dans le méthanol. Ainsi, si le système d'expression de la GGT s'avère bon, il sera possible d'obtenir de la GGT en moins de temps que dans le cas du remplacement complet du gène *AOX1*. Il existe également des souches déjà Mut<sup>S</sup> (par exemple, KM71). Celles-ci ont un gène *AOX1* muté. Ainsi, quelque soit le type d'intégration effectué dans le génome, ces levures pousseront toujours lentement sur un milieu riche en méthanol. Cependant, il s'est avéré, dans certains cas, que l'expression de la protéine était meilleure dans ce type de souche que dans le cas d'une souche ayant intégré le plasmide sans briser l'intégrité du gène *AOX1*, comme c'est le cas dans la sécrétion de l'enzyme invertase<sup>168</sup>. Il est donc nécessaire normalement d'essayer des souches permettant les deux types de croissance. Cependant, dans notre cas, la mise au point d'un système d'expression rapide a mené au choix de la souche X-33 et d'une intégration complète du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  dans le site du promoteur 5'*AOX1*.

Comme il a été décrit dans la section 4.2.2, la transformation des levures *P. pastoris* X-33 a été réalisée avec succès. Une sélection sur un milieu contenant 100  $\mu$ g/mL de l'antibiotique Zeocin a été faite afin d'identifier les transformants contenant le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$ . Cependant, d'autres expériences auraient pu être effectuées à ce niveau afin d'obtenir de meilleurs transformants. En effet, il est possible que plusieurs copies du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  se soient incorporées dans le génome. Il a déjà été démontré qu'un nombre plus élevé de copies permettait d'obtenir une meilleure expression de l'enzyme désirée<sup>149,151</sup>. Cet effet a notamment été démontré dans le cas de la sécrétion d'un facteur de croissance épidermal de souris (mEGF) dans les levures *P. pastoris*<sup>169</sup>. Dans ce cas, le gène *AOX1* de levures GS-115 a été remplacé par le plasmide d'intérêt, créant ainsi une

souche poussant lentement dans un milieu de culture contenant du méthanol. Les quantités de protéines obtenues ont été plus de 30 fois supérieures lorsque le nombre de copies passe d'une à 19 dans le cas d'une incubation normale utilisant des erlenmeyers. De plus, les auteurs de cette recherche ont comparé leurs résultats à ceux de l'expression de la même protéine dans la levure *S. cerevisiae*. Il s'avère que, dans le cas de cette protéine, le système *P. pastoris* soit supérieur (environ deux fois mieux) que le système *S. cerevisiae* au niveau de la quantité de protéine sécrétée<sup>169</sup>.

Il semble donc, selon cet exemple, que le nombre de copies soit bien important. Cependant, dans le cas de la protéine trypsinogène, il semble qu'un nombre de copies plus élevé nuise, dans le cas d'un plasmide sous le contrôle du promoteur 5'*AOXI*, à sa sécrétion, ayant comme résultat final une plus faible quantité d'enzyme<sup>170</sup>. Cependant, ceci n'est pas observé lors de l'utilisation du promoteur GAP expliqué plus tôt. Il semble donc que le nombre de copies puisse aider à l'expression d'une protéine, mais cela dépend en grande partie de la nature de la protéine et du système d'expression utilisé.

Ainsi, dans le cas de la GGT, la sélection s'est effectuée grâce à un milieu de culture contenant de l'antibiotique Zeocin à des concentrations de 100 µg/mL. Il est important de noter que la protéine de résistance à la Zeocin agit de manière stœchiométrique, et non pas de manière enzymatique, en se liant à l'antibiotique et en l'inactivant<sup>149</sup>. Un nombre supérieur de copies de ce gène de résistance permettra probablement à la levure de croître dans un milieu de culture contenant des concentrations plus élevées de l'antibiotique. Ainsi, au cours de la transformation, il aurait été possible d'étaler les transformants sur des milieux de culture contenant des concentrations plus élevées de Zeocin (par exemple, 500 à 2000 µg/mL), permettant ainsi seulement la croissance de levures ayant incorporé un plus grand nombre de copies du gène de la GGT. Il est ensuite nécessaire de vérifier le nombre de copies présentes dans le génome. Pour y arriver, il est possible de purifier l'ADN et de le mettre sur une membrane de nitrocellulose pour ensuite l'hybrider avec une sonde d'ADN radioactive correspondant à une partie du gène de la GGT<sup>149</sup>. Selon

l'intensité du signal radioactif, il sera possible de connaître le nombre de copies. Cependant, il est impossible de dire si ce paramètre aura un effet positif ou négatif sur la quantité de protéine sécrétée, comme il a été montré précédemment avec les autres exemples. Ainsi, une transformation dans des souches *P. pastoris* Mut<sup>S</sup> (tel KM71) et un nombre de copies plus élevé peuvent aider à obtenir une plus grande quantité de protéine.

#### 4.3.3 Expression de la GGT humaine recombinante

Le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  a bien été intégré dans le génome de la souche de levure *P. pastoris* X-33, mais il restait à vérifier si l'expression est possible. Des tests effectués ont montré que de la GGT sécrétée est présente dans le milieu de culture, confirmant ainsi le choix au départ du plasmide d'expression. De plus, il semble que l'absence de l'ancre transmembranaire n'ait pas nui à l'expression de l'enzyme. Le milieu de culture BMMY des levures ne contient pas vraiment de protéine menant à la transpeptidation du substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et du substrat accepteur glycylglycine utilisés dans le test d'activité. Les résultats proviennent donc bien de l'enzyme GGT. Cependant, un certain nombre d'unités d'enzyme semble présent dans le culot lorsque les levures contiennent le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  comparativement aux levures contenant le plasmide pPICZ $\alpha$ A (vide). Ceci pourrait être expliqué par de la GGT demeurée emprisonnée dans les cellules, et non sécrétée. Il existe un espace périplasmique dans la levure. Ceci représente un espace entre deux couches de membrane. Dans le cas de l'invertase, environ 80-90 % de l'enzyme a été sécrétée dans le milieu de culture et une petite portion de 10-20 % est demeurée dans l'espace périplasmique<sup>168</sup>. Il ne faut également pas oublier que les levures ont également un peu d'activité GGT endogène. En effet, la GGT de *S. cerevisiae* a déjà été étudiée<sup>17</sup>. Chez *P. pastoris*, aucune étude n'a été effectuée à cet effet, cette levure étant plutôt utilisée comme système d'expression de protéines recombinantes, et non comme organisme unicellulaire méritant d'être étudié. Cependant, une différence existe entre les levures ayant incorporé ou non le gène de la GGT humaine. Des tests

d'immunobuvardage avec des échantillons très concentrés en protéine n'ont donné aucune bande, ce qui peut être expliqué par une faible quantité présente dans ces échantillons. Il est donc possible qu'un peu de GGT recombinante, en plus de la GGT endogène probablement liée à la membrane, soit présente à l'intérieur de la levure, mais ceci représente tout de même une quantité plus faible que celle pouvant être obtenue sous forme sécrétée dans le milieu de culture.

L'optimisation des conditions d'expression a permis d'obtenir de la GGT en plus grande quantité. Le premier paramètre varié, le pH, n'a pas apporté de variations importantes. Il semble que le pH de 7,0 soit préférable pour l'expression, mais une faible différence existe avec le pH 6,0. Ce sont des raisons pratiques qui forcent le choix pour le pH 7,0 par rapport à 8,0. En effet, des problèmes de précipitation à pH 8,0 rendent plus difficiles la préparation des milieux de culture. Cependant, dans le cas de l'hémagglutinine, le changement de pH a significativement aidé à l'expression de la protéine, mais il avait déjà été noté que le pH avait cet effet dans d'autres systèmes d'expression pour celle-ci<sup>160</sup>. Alors, cet effet est probablement plutôt lié à la nature de la protéine.

Le deuxième paramètre varié, le pourcentage de méthanol, a montré des effets frappants quant à la quantité de GGT sécrétée. En effet, il semble qu'un pourcentage de plus en plus élevé tende à diminuer la sécrétion de l'enzyme. Pourtant, pour certaines enzymes, des pourcentages aussi élevés que 3 % ont déjà été utilisés<sup>150</sup>. Il est possible qu'un pourcentage plus élevé mène à la mort des cellules, ce qui est peut-être arrivé dans le cas de la GGT. De plus, la concentration de protéine s'est avérée très élevée avec des pourcentages élevés de méthanol, ce qui peut être expliqué par la sécrétion de protéines de stress tentant de protéger la levure<sup>171</sup>. Ainsi, un pourcentage de 1 % a été conservé pour le reste des expériences.

Le troisième paramètre, la densité optique à 600 nm lors de l'induction avec le méthanol, a eu également un effet sur l'expression des protéines. Une densité optique plus élevée mène à une quantité accrue du nombre d'unités de GGT, mais

surtout à une activité spécifique plus élevée, ce qui aide à la purification de l'enzyme. Il est à noter qu'un fermenteur permet justement d'obtenir des densités beaucoup plus élevées menant à la production d'une grande quantité d'enzyme<sup>160,169</sup>. Il aurait peut-être été souhaitable d'essayer une gamme plus large de densités optiques, mais le facteur de l'oxygénation devient alors important et il est plus difficile d'effectuer ces expériences à partir de fioles coniques (« erlenmeyers ») dans un incubateur-agitateur.

Enfin, le quatrième paramètre est la présence de « casamino acids ». Il s'agit d'acides aminés libres déjà reconnus comme étant capables de bloquer diverses protéases formées par la levure *P. pastoris*<sup>169</sup>. En effet, des protéases se retrouvent dans des vacuoles dans la levure. Cependant, lors du bris ou de la mort d'une levure, les protéases se retrouvent dans le milieu réactionnel et peuvent donc dégrader les protéines présentes, notamment la GGT. L'ajout de « casamino acids » permet donc de diminuer cette dégradation. Cet effet a été observé aux deux densités optiques testées. Il est peut-être possible qu'une protéase soit sécrétée, mais elle provient plutôt, normalement, du bris d'une cellule. Afin d'éviter ce problème, il est possible de changer le pH du milieu de culture, un pH acide inactivant les protéases. Cependant, le pH ne doit pas avoir un effet sur la protéine sécrétée. Ensuite, une autre possibilité est l'utilisation de souches de levures ne contenant pas de protéases. Des gènes codant pour des protéases vacuolaires ont été identifiés chez *P. pastoris*. Ceux-ci ont été mutés dans certaines souches, permettant ainsi la sécrétion de la protéine d'intérêt sans risquer sa dégradation abusive. Dans notre cas, l'utilisation de « casamino acids » s'est révélée très efficace afin de conserver une bonne quantité de protéines.

L'expression étant optimisée, la purification de la GGT recombinante a pu être effectuée.

#### 4.3.4 Purification de la GGT humaine recombinante

La GGT humaine recombinante sécrétée par les levures a donc été exprimée avec succès dans le système de levure *P. pastoris*. La purification doit ensuite être effectuée. Le passage direct du milieu de culture sur la matrice Ni-NTA reconnaissant le « His-tag » n'a pas permis de lier efficacement la GGT recombinante. Il est certain que les conditions de culture ne correspondent pas à celles normalement utilisées pour faire ce type de chromatographie d'affinité. Même en ajustant les conditions, il a été impossible de lier la GGT sans faire de concentration préalable.

La concentration de la protéine présente dans le milieu de culture a donc été effectuée par précipitation à l'acétone. Ce solvant organique est reconnu pour ne pas créer trop d'effets secondaires à la structure d'une protéine<sup>159</sup>. Ceci a été réalisé avec succès, comme le montre le nombre d'unités d'enzyme présentes dans le culot par rapport au surnageant lorsque la solution « précipitée » a été centrifugée. Cependant, le gros désavantage de cette technique est la dénaturation possible de l'enzyme. En effet, des concentrations trop élevées de ce solvant organique ou des hausses de température peuvent mener à cet effet secondaire<sup>159</sup>. Dans le cas de la GGT, toutes les manipulations ont été effectuées à 4 °C dans une chambre froide et l'addition de l'acétone a été faite très lentement afin que les hausses de température puissent être contrôlées. Cependant, même dans ce cas, une baisse du nombre d'unités d'enzyme a été observée entre la précipitation avec 20 % d'acétone et celle avec 50 %, alors une dénaturation, telle que décrite au Schéma 23, a été probablement effectuée. Malgré ce désavantage, la technique s'est avérée efficace pour précipiter la protéine et la purification par chromatographie d'affinité a été effectuée avec succès par la suite pour donner une enzyme pure avec une activité spécifique de 239 U/mg (12 µg pour 40 mL de culture), ce qui se compare avantageusement bien à la valeur de 450 U/mg (84 µg pour 300 mL de milieu de culture concentré) obtenue dans la purification de la GGT sans ancre transmembranaire dans un système utilisant des baculovirus et des cellules d'insectes<sup>14</sup>. Il faut dire que la complexité des deux

systèmes (levures et cellules d'insectes) n'est pas la même, ce qui pourrait expliquer cette différence.

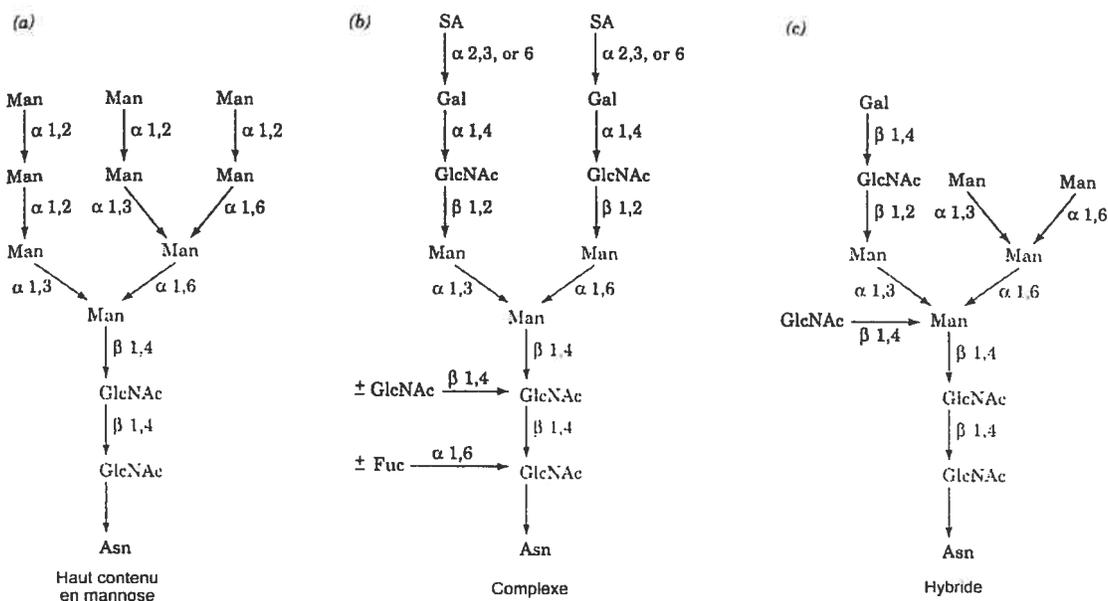
Une précipitation utilisant d'autres interactions entre les protéines a donc été effectuée. Le sulfate d'ammonium permet, à des pourcentages élevés de saturation, de faire sélectivement précipiter des protéines. Ainsi, en plus de la concentration de la protéine, l'élimination d'autres protéines indésirables est possible, aidant ainsi à la purification de l'enzyme. Cela a donc été effectué avec du milieu de culture contenant de la GGT sécrétée. Une première précipitation à 60 % de saturation en sulfate d'ammonium a été faite, mais celle-ci n'a pas permis d'éliminer beaucoup de protéines indésirables. Une hausse de ce pourcentage à 95 % a mené à la précipitation de la majorité de la GGT présente dans l'échantillon et à sa récupération dans le culot à la suite d'une centrifugation. Cependant, comme il est indiqué au Tableau XVII, plusieurs unités sont également présentes dans le surnageant lors de la centrifugation. Il est impossible d'élever encore plus le pourcentage de saturation de l'échantillon. De plus, malgré une modification des conditions de centrifugation afin d'obtenir le maximum de précipitation, il a été impossible d'améliorer significativement la quantité de protéines récupérées dans le culot. Ceci est possiblement expliqué par la différence de densité. Avec un pourcentage élevé de sulfate d'ammonium présent dans la solution, les protéines se rapprochent et vont former des types d'aggrégats plus denses qui vont aller dans le culot lors de la centrifugation. Cependant, si le milieu n'est pas très concentré en protéines et s'il contient déjà plusieurs composantes le rendant assez dense (acides aminés libres, etc), la densité du milieu sera assez élevée et la différence ne sera pas assez grande avec les protéines, menant alors au résultat obtenu ici. Il existe également la possibilité de concentrer l'échantillon par ultrafiltration et centrifugation. Ceci est très efficace et souvent réalisé dans le cas de petits volumes de milieu de culture. Dans le cas de volumes plus importants, il est nécessaire d'utiliser un type d'appareil différent, et non plus une centrifugeuse. Dans le cas de ce système d'expression dans les levures *P. pastoris*, de grands volumes seront utilisés afin d'obtenir de grandes quantités. La concentration, par centrifugation, de grands volumes dans des tubes

acceptant de petits volumes serait fastidieuse. Une précipitation avec du sulfate d'ammonium apparaît donc comme une méthode préférable afin d'obtenir de la GGT en plus grande quantité.

Cette précipitation a tout de même permis d'obtenir suffisamment de GGT afin de faire une purification par chromatographie d'affinité. Une activité spécifique de 284 U/mg a été obtenue, ce qui est supérieur à la purification par précipitation à l'acétone. De plus, la quantité de protéine obtenue est plus élevée avec du sulfate d'ammonium et le rendement global de la réaction est bien meilleur (46,4 % par rapport à 20,1 %). Le protocole utilisant le sulfate d'ammonium est donc le meilleur et constitue celui qui sera appliqué dans l'avenir dans le laboratoire afin d'obtenir de la GGT humaine recombinante. Il est certain que la quantité d'enzyme obtenue ici est tout de même faible, mais celle-ci provient de 40 mL de milieu de culture, ce qui est peu. Le travail ici consistait à mettre au point un système d'expression de la GGT recombinante dans les levures, ce qui a été réalisé avec succès. Il restera donc à optimiser le système à de plus grandes quantités de milieu de culture afin d'obtenir plus de GGT pour faire des études structurales.

#### 4.3.5 Caractérisation de la GGT

La GGT humaine recombinante a été obtenue avec succès. Il reste maintenant à caractériser l'enzyme afin de s'assurer de ses modifications post-traductionnelles et de son bon repliement. Pour débiter, au cours de gels d'électrophorèse et d'immunobuvardages, un mauvais poids moléculaire a été observé pour les deux sous-unités de la GGT. Ceci peut facilement être expliqué par la présence de sucres ajoutés par la levure *P. pastoris*. En effet, celle-ci est reconnue pour hyperglycosyler, parfois, les protéines formées<sup>163</sup>. Il est à noter que la GGT est normalement glycosylée chez les mammifères<sup>172</sup>. Les sucres peuvent être fixés à l'azote de certaines asparagines (sucres *N*-liés) ou à l'oxygène de certaines sérines et thréonines (sucres *O*-liés)<sup>3</sup>. Dans le cas des sucres *N*-liés, la structure est normalement l'une de celles représentées à la Figure 44.



**Figure 44.** Structure de sucres liés à l'azote de certaines asparagines dans les glycoprotéines. Les abréviations sont Asn, asparagine, GlcNAc, sucre *N*-acétylglucosamine, Man, mannose, Gal, galactose et SA, acide sialique.

La connection de ces sucres permet d'obtenir différents types de complexes. Dans le cas de la GGT, des sucres à haut contenu en mannose et de type complexe sont formés<sup>172</sup>. Il y a jusqu'à huit sites de glycosylation sur un azote sur la GGT de mammifère<sup>9</sup>. De plus, les différents isoformes de la GGT proviennent du contenu en acide sialique, ce qui change leur point isoélectrique<sup>173</sup>. Il existe également quelques sucres *O*-liés. Ceux-ci sont principalement formés de galactose et de galactosamine et se fixent sur des sérines et des thréonines, mais il n'existe pas réellement de séquence consensus pour prévoir ces sites de glycosylation<sup>174</sup>. Il semble que deux sites sont possiblement glycosylés sur des sérines ou des thréonines sur la GGT de mammifère, l'un sur chacune des sous-unités.

La levure *P. pastoris* ne possède pas le même type de machinerie pour ajouter des sucres. En effet, des sucres à haut contenu en mannose sont principalement présents sur les azotes de certaines asparagines dans les glycoprotéines<sup>160,165</sup>. Lorsqu'une hyperglycosylation a lieu, il peut parfois y avoir jusqu'à 75-80 résidus de

mannose dans ces sucres *N*-liés. Il existe également des sucres *O*-liés, mais ceux-ci ont été beaucoup moins étudiés<sup>165</sup>. Ces sucres, contrairement à ceux des mammifères, sont surtout formés de mannose. Les séquences reconnues pour la glycosylation sont différentes chez les mammifères et les levures, ce qui explique la différence de glycosylation dans ces organismes.

La GGT recombinante humaine dans les levures est possiblement glycosylée, ce qui explique probablement la masse plus élevée observée sur les gels d'électrophorèse. L'utilisation de glycosidase F permet de cliver complètement les sucres *N*-liés<sup>150,160</sup>. Il est également possible de faire ce clivage avec de l'endoglycosidase H, mais il reste une unité de sucre attachée à l'asparagine de la protéine<sup>168</sup>. Ceci a été réalisé avec succès puisque la bande correspondant à la petite sous-unité est passée de 34 kDa à 30 kDa. Cependant, le poids attendu de 23 kDa n'a pas été atteint. Ceci peut être expliqué par la présence de sucres *O*-liés. Ce type de situation a déjà été observé dans le cas de l'expression de la glycoprotéine D<sup>163</sup>. Il est possible de le vérifier grâce à l'utilisation de NaBH<sub>4</sub>, mais ceci n'a pas été fait<sup>173</sup>. Puisque la GGT a été reconnue par un anticorps se liant à l'épitope *c-myc*, il s'agit bel et bien de cette enzyme et la différence de poids moléculaire est due à la glycosylation.

Quant aux autres caractérisations, la GGT humaine recombinante sécrétée et la GGT de rein de rat possèdent la même stabilité à la température, ce qui démontre que la structure de la GGT produite dans les levures est sensiblement la même que celle présente dans les mammifères. Les constantes cinétiques sont également très similaires à celles des autres GGT de mammifères (recombinantes ou non). Les faibles différences observées ne sont peut-être pas valables, dues à la grande hétérogénéité dans la source de l'enzyme.

Tous ces résultats démontrent donc que de la GGT humaine recombinante a été exprimée avec succès dans un système de levures *P. pastoris*. Ceci a permis d'obtenir de la GGT pure exempte d'ancre transmembranaire et en présence d'un

« His-tag » (ce qui n'a jamais été fait pour quelque GGT que ce soit auparavant) afin de faciliter la purification de l'enzyme. De plus, il est facile et peu coûteux d'utiliser les levures comme système d'expression comparativement à des cellules de mammifère ou des cellules d'insectes. Il est certain que la période de culture des levures est assez longue, mais le protocole de purification est beaucoup plus rapide que ceux déjà existants dans les autres systèmes d'expression. Enfin, ce système permet d'effectuer de la mutagenèse dirigée pour vérifier l'identité des résidus importants dans les mécanismes proposés dans les chapitres précédents. Des quantités importantes de GGT peuvent donc être obtenues afin d'effectuer des études en état pré-stationnaire et de la cristallographie. Ce nouveau système d'expression est donc très utile et s'avère un excellent outil afin de mieux étudier la GGT et son importance au niveau physiologique.

# **CHAPITRE 5**

## **Conclusion**

Les travaux présentés dans cette thèse ont porté sur l'étude de l'enzyme  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT). Il s'agit d'une enzyme hétérodimérique présente dans les bactéries et les mammifères. Dans ce dernier cas, elle est impliquée dans la régulation de la concentration de glutathion présent dans les cellules, l'activation de pro-drogues et l'élimination de déchets grâce à la formation d'acides mercapturiques. Son rôle semble également important dans des désordres physiologiques tels le diabète, les maladies cardiovasculaires et l'inhibition de l'apoptose. Son étude exhaustive est donc nécessaire afin de mieux comprendre son fonctionnement et son importance réelle au niveau physiologique.

Pour débiter, un mécanisme de type ping-pong modifié a toujours été proposé pour la GGT sans être appuyé par de solides preuves. En effet, la GGT se lierait à un substrat donneur contenant une entité  $\gamma$ -glutamyle pour former, après libération d'un premier produit, un intermédiaire acyl-enzyme covalent. La présence de cet intermédiaire serait une preuve que le mécanisme est bien de type ping-pong. Cependant, cet intermédiaire n'a jamais été isolé et son existence a toujours été démontrée de manière indirecte en utilisant de l'enzyme modifiée chimiquement. Grâce à des études en état pré-stationnaire, il a été possible de démontrer, en utilisant de l'enzyme non modifiée (native) provenant du rein de rat et le substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide, l'existence de cet intermédiaire. Un graphique de la libération de la *p*-nitroaniline du substrat donneur en fonction du temps dans une réaction d'hydrolyse a été obtenu. Il est formé de deux pentes, la première ayant une valeur plus grande que la seconde, ce qui constitue une preuve directe de l'accumulation de l'intermédiaire acyl-enzyme. De plus, ce type d'expérience a été réalisé en présence, en plus du substrat donneur, du substrat accepteur L-méthionine, et un graphique biphasique a encore une fois été obtenu, démontrant que l'intermédiaire s'accumule également dans cette réaction de désacylation par aminolyse. Cette série d'expériences à de faibles temps de réaction a permis de prouver, pour la première fois avec de l'enzyme non modifiée chimiquement et de manière directe et continue, la présence de cet intermédiaire acyl-enzyme covalent. Ceci confirme donc que la GGT fonctionne selon un mécanisme ping-pong.

Par la suite, des études de l'étape de désacylation ont été effectuées. L'étape d'acylation de la GGT par un substrat donneur contenant une entité  $\gamma$ -glutamyle a déjà été étudiée grâce à des expériences de physico-chimie organique et un mécanisme détaillé a été proposé. Cependant, l'étape de désacylation de l'intermédiaire acyl-enzyme formé n'a pas été étudiée avec autant de détails dans la littérature. L'utilisation de L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide comme substrat donneur et de dérivés de la L-méthionine comme substrat accepteur a permis d'obtenir plus d'informations à ce niveau. En effet, des dérivés de la L-méthionine ont été synthétisés et caractérisés, notamment au niveau du  $pK_a$  du groupement  $\alpha$ -ammonium libre. Par la suite, ils ont été étudiés en tant que substrat accepteur de la réaction de désacylation par aminolyse. Des manipulations mathématiques des données cinétiques obtenues ont été nécessaires afin d'éliminer l'influence de la réaction d'hydrolyse menant également à la dégradation de l'intermédiaire acyl-enzyme. Ensuite, une courbe de Brønsted a été tracée et une pente positive a été obtenue, ce qui concorde avec une étape limitante où une charge partiellement positive est formée à l'état de transition. D'autres expériences vérifiant l'effet isotopique de solvant et l'effet du pH ont été réalisées et ont mené à la conclusion qu'un proton était en vol à l'état de transition. Celui-ci pourrait provenir d'une base générale nécessaire pour déprotoner le substrat accepteur.

Ces expériences ont permis de proposer pour la première fois un mécanisme détaillé pour l'étape de désacylation par aminolyse. L'étape limitante serait l'attaque nucléophile assez avancée à l'état de transition du substrat accepteur sur l'intermédiaire acyl-enzyme, concertée avec la déprotonation du groupement  $\alpha$ -ammonium, ce qui mènerait au développement d'une charge partiellement positive sur l'azote du substrat utilisé. Ceci concorde avec tous les résultats des expériences réalisées. De plus, d'autres composés faisant partie de la famille des amines, des alcools ou des thiols ont été utilisés, mais ceux-ci se sont avérés de très pauvres substrats accepteurs. Le mécanisme proposé à la suite des expériences effectuées avec des dérivés de la L-méthionine permet de comprendre la faible réactivité de

cette série de composés. Grâce à ces expériences, le mécanisme de la réaction de désacylation par aminolyse est beaucoup mieux compris. De plus, il semble que le rôle physiologique principal de la GGT soit la transpeptidation et non l'hydrolyse.

Tout au cours de ces études, des résidus jouant le rôle d'acide/base général ont été impliqués dans les mécanismes proposés. Cependant, l'enzyme utilisée provient du rein de rat, donc il est impossible de modifier la séquence de la GGT. Un système d'expression de GGT recombinante permettrait de modifier, par mutagenèse dirigée, les résidus désirés, mais également d'obtenir une source constante d'enzyme afin d'effectuer des études structurales. De plus, il est possible de modifier la GGT afin de faciliter sa purification qui s'avère fastidieuse dans le cas des reins de rat. Un système d'expression dans la levure *Pichia pastoris* a donc été mis au point. Pour débiter, le gène de la GGT humaine (et non la GGT de rat) a été modifié afin d'éliminer l'ancre transmembranaire dont le clivage est problématique au cours de la purification. Par la suite, il a été placé dans un plasmide contenant une séquence pour le facteur de sécrétion  $\alpha$  permettant la sécrétion de la GGT dans le milieu de culture. Une séquence de six histidines et un épitope *c-myc* sont également encodés dans le plasmide et sont placés à la fin du gène de la GGT afin de permettre la détection et la purification efficace de la GGT recombinante exprimée. Le plasmide contenant le gène de la GGT a ensuite été transformé dans des bactéries afin d'être obtenu en grande quantité, puis a été transformé dans des cellules de levure. Une intégration génomique dans la levure a été effectuée afin de s'assurer de la réplication du gène de la GGT. Le gène est alors placé sous le contrôle d'un promoteur induit grâce à du méthanol.

Des tests d'expression ont ensuite été effectués afin de détecter la GGT. Celle-ci se retrouve bel et bien sous forme sécrétée dans le milieu de culture des levures. Une optimisation des conditions d'expression a été réalisée, notamment au niveau du pH du milieu de culture utilisé, du pourcentage de méthanol présent en tant qu'inducteur, de la densité optique des cellules au départ lors de l'induction et de la présence de « casamino acids » dans le milieu de culture. Ces conditions ont permis

d'obtenir de la GGT en quantité suffisante pour la purifier. Des protocoles permettant la précipitation des protéines présentes dans le milieu de culture avec de l'acétone ou du sulfate d'ammonium ont été utilisés. L'utilisation de ce dernier a donné de meilleurs résultats. Par la suite, une purification grâce à une chromatographie d'affinité a permis d'obtenir une enzyme pure ayant une activité spécifique finale de 284 U/mg, ce qui se rapproche avantageusement des activités spécifiques préalablement obtenues dans la littérature avec d'autres systèmes d'expression beaucoup plus fastidieux. La GGT humaine recombinante tronquée obtenue a ensuite été caractérisée au niveau des sucres ajoutés à sa structure au cours de l'expression et de sa stabilité à la chaleur par comparaison avec de la GGT purifiée à partir de reins de rat. De plus, des valeurs de constantes cinétiques pour des substrats donneur et accepteur typiques ont été obtenues. Selon ces expériences, la GGT humaine recombinante obtenue est très similaire à de la GGT purifiée d'organes ou produite par d'autres systèmes d'expression. Le système d'expression utilisant la levure *P. pastoris* s'avère donc excellent pour produire de la GGT humaine de manière beaucoup plus efficace que les autres systèmes déjà décrits dans la littérature. De plus, la purification est grandement facilitée par la présence de six histidines (« His-tag ») pour la première fois sur de la GGT. Ce système sera donc d'une très grande utilité pour les recherches futures sur la GGT humaine.

Les travaux présentés dans cette thèse ont donc permis d'avoir une meilleure compréhension du mécanisme de la GGT. De plus, un nouveau système d'expression est maintenant disponible afin d'obtenir de la GGT humaine recombinante. Toutes ces informations permettront donc de continuer les études sur les rôles physiologiques de cette enzyme et d'apporter des solutions pour les désordres physiologiques dans lesquels elle est impliquée.

# **CHAPITRE 6**

## **Partie expérimentale**

## **6.1 Détection de l'intermédiaire acyl-enzyme de la GGT**

### **6.1.1 Matériel**

La GGT utilisée a été purifiée à partir des reins de rats selon le protocole publié<sup>83</sup> et lyophilisée pour être conservée à -20 °C. Le substrat D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide a été synthétisé selon un protocole publié<sup>83</sup>. Le tampon Tris basique et la solution utilisée pour les tests de concentration de Bradford proviennent de chez BioRad. Les autres composés utilisés dans la dérivation ont été achetés chez Aldrich. L'eau déionisée a été obtenue avec un appareil Milli-Q biocel (Millipore). Le mélangeur à inhibition rapide est un KinTek Chemical-Quench-Flow modèle RQF-3 (KinTek) attaché à un bain d'eau circulant (Neslab). Le mélangeur à flux arrêté est un SX.18MV Stopped-Flow Reaction Analyser (Applied Photophysics) avec une cellule de 10 mm de longueur sous le contrôle d'un micro-processeur Risc utilisant le logiciel Pro-K. Les valeurs d'absorbance ont été prises sur un spectrophotomètre Cary 100 Bio (Varian).

### **6.1.2 Méthode expérimentale**

#### 6.1.2.1 Utilisation du mélangeur à inhibition rapide (« rapid-mix quencher »)

L'appareil a été préalablement calibré en utilisant des solutions radioactives selon le protocole établi par la compagnie KinTek. La température de l'eau entourant les seringues est de 37 °C. L'enzyme lyophilisée est resuspendue dans du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 à une concentration finale de 6,2  $\mu$ M (concentration vérifiée par des tests de concentration de Bradford<sup>175</sup>). Une solution de 2 mM de D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide est effectuée dans le même tampon. Les seringues A et B de la Figure 7 sont remplies avec du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 et la seringue C, avec une solution de 40 % d'acide trichloroacétique. La boucle de l'échantillon A, ayant un volume de 13,8  $\mu$ L, est remplie avec la solution d'enzyme préalablement préparée. La boucle de l'échantillon B, d'un volume de 14,6  $\mu$ L, est remplie par le substrat donneur. Les temps de réaction sont entrés dans l'ordinateur qui contrôle la poussée des seringues A, B et C. Les temps choisis sont entre 2 et 2000 ms en

duplicata. Pour chaque temps de réaction, le mélange réactionnel est récupéré. Dans le cas des expériences témoins, la boucle de l'échantillon A a été remplie par du tampon et un volume équivalent de la solution d'enzyme est ajouté par la suite à la réaction inhibée.

Par la suite, la dérivation par diazotation de la *p*-nitroaniline libérée est effectuée selon un protocole déjà établi<sup>83</sup>. Pour chaque milieu réactionnel récupéré, il est possible de connaître le volume exact d'acide trichloroacétique présent (ce volume varie selon la boucle de réaction utilisée). Du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 a été ajouté au mélange réactionnel récupéré afin que le volume d'acide trichloroacétique représente un quart du volume du mélange réactionnel final. Un volume d'une solution de nitrite de sodium (4 mg/mL dans l'eau), équivalent au volume de l'acide trichloroacétique présent, est ajouté. Après agitation, la solution demeure à la température de la pièce durant 3 minutes. Par la suite, le même volume d'une solution de sulfamate d'ammonium (20 mg/mL dans l'eau) est ajouté, le mélange réactionnel est agité et un temps d'attente de 2 minutes est laissé pour que la réaction puisse se faire. Le groupement  $-NH_2$  de la *p*-nitroaniline est alors transformé en  $-N_2$ . Enfin, le double de ce volume d'une solution de *N*-(1-naphthyl)éthylènediamine (1,5 mg/mL dans l'éthanol, à l'abri de la lumière) est ajouté et une incubation est faite durant 10 minutes à la température de la pièce. La solution prend alors une teinte mauve (un complexe diazo est formé) et l'absorbance est mesurée avec un spectrophotomètre à 560 nm. Chacune des valeurs est divisée par le coefficient d'extinction molaire ( $0,057 \mu M^{-1} cm^{-1}$ )<sup>83</sup>, puis multipliée par un facteur de dilution dû à l'arrêt de la réaction et à la dérivation pour obtenir la concentration initiale de *p*-nitroaniline dans le mélange réactionnel de 28,4  $\mu L$ . Les résultats ont été analysés avec le logiciel Axum 5.0. Les pentes obtenues à partir de ce graphique ont été transformées en valeurs de  $k_{cat}^{norm}$  en divisant la valeur de la pente par la concentration en enzyme (6,2  $\mu M$ ) et en normalisant les valeurs avec une activité spécifique pour la GGT de 837 U/mg.

### 6.1.2.2 Utilisation du mélangeur à flux arrêté (« stopped-flow »)

La température de l'eau entourant les seringues et la chambre de mélange est de 37 °C. L'enzyme lyophilisée est resuspendue dans du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 à une concentration finale de 8,8 µM. Une solution de 6,64 mM du substrat donneur D-γ-glutamyl-*p*-nitroanilide est effectuée dans le même tampon. Une seringue de 1,0 mL est remplie avec la solution d'enzyme et la seringue de 0,1 mL, de la solution de substrat, donnant un rapport de 10:1 et des concentrations finales de 8,0 µM pour l'enzyme et de 604 µM pour le substrat donneur. Sous le contrôle de l'appareil, une série de six expériences est effectuée avec le contenu des seringues. Les trois premières expériences servent à s'assurer que la chambre de mélange et la seringue d'arrêt soient bien remplies et les trois dernières expériences peuvent être utilisées pour l'analyse des données. Un total de 1000 points distribués de manière logarithmique a été enregistré par le détecteur d'absorbance à 410 nm sur une durée totale de 10 secondes. Cette expérience a été effectuée avec de l'enzyme provenant de différentes purifications avec des résultats similaires. Les valeurs ont été analysées avec le logiciel Axum 5.0. La valeur de chacune des pentes a été divisée par le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline ( $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>13</sup>, puis transformée en valeur de  $k_{cat}^{norm}$  comme il est décrit à la section 6.1.2.1.

## 6.2 *Élucidation du mécanisme de l'étape de désacylation*

### 6.2.1 Matériel

Pour la synthèse des dérivés de la L-méthionine, tous les composés ont été achetés chez Aldrich et Sigma. Les spectres RMN ont été faits sur des instruments Bruker AMX300, AV300 (300 MHz), ARX400 ou AV400 (400 MHz). Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Thomas Hoover Uni-melt et ont été corrigés avec un composé dont le point de fusion est connu dans la littérature. Les valeurs d'activité optique  $[\alpha]_D$  ont été obtenues avec un appareil Perkin Elmer Polarimeter

341 à 25 °C. Les spectres de masse ont été obtenus sur des instruments Micromass Autospec-TOF (MAB) du Centre Régional de Spectrométrie de Masse de l'Université de Montréal.

Pour le titrage des substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine, un autotitrateur de type Mettler Toledo DL53 (Mettler) a été utilisé. Une électrode combinée Accumet avec la référence Ag/AgCl (Fisher) accompagne l'appareil. L'électrode a été calibrée avant chaque série d'expériences selon le protocole indiqué par le manufacturier<sup>176</sup>.

Pour le suivi des réactions cinétiques, un spectrophotomètre Cary 100 Bio (Varian) est utilisé. Les divers composés utilisés pour faire la courbe pH-vitesse (MES, MOPS, CHES) et le composé L-méthioninamide (**19f**) ont été achetés chez Aldrich.

Pour les expériences utilisant d'autres types de composés comme substrats accepteurs, un lecteur de plaques de type HTS 7000 Bio Assay Reader (Perkin Elmer) a été utilisé. Les composés ont tous été achetés chez Aldrich et VWR (pour les composés agissant également comme des solvants).

## 6.2.2 Méthode expérimentale

### 6.2.2.1 Tests des autres substrats accepteurs possibles

Les expériences ont été effectuées en utilisant un lecteur de plaques. Puisque la libération de la *p*-nitroaniline est suivie, une courbe étalon pour le volume de réaction et la distance parcourue par le faisceau lumineux de cet appareil doit être réalisée. Une solution-mère de 1 mM de *p*-nitroaniline dans l'eau déionisée a été faite. Un total de six concentrations variant entre 5 et 100  $\mu\text{M}$  ont été utilisées dans six puits d'une plaque à 96 puits et le volume a été complété à 200  $\mu\text{L}$  avec du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. La courbe a été effectuée en duplicata. Un graphique de l'absorbance en fonction de la concentration en *p*-nitroaniline a été fait en utilisant le logiciel Axum 5.0. Un coefficient d'extinction molaire de  $(6500 \pm 100) \text{ M}^{-1} \text{ longueur}^{-1}$  (la longueur étant celle formée par le volume de 200  $\mu\text{L}$  dans chaque puits) a été déterminé et a été utilisé dans toutes les études cinétiques effectuées.

Les amines testées ont toutes été solubilisées dans du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 afin de faire des solutions-mères de 1 M. Pour une amine testée, des concentrations de 5, 25 et 100 mM ont été utilisées avec le lecteur de plaques en présence de 1 mM du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (provenant d'une solution-mère de 5 mM dans du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0). Le volume est complété à 200  $\mu\text{L}$  avec du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. La réaction est débutée par l'addition d'environ 14 mU de GGT. Des puits sans enzyme sont préparés de la même manière. De plus, des puits ne contenant pas d'amine sont préparés afin d'étudier l'étape d'hydrolyse enzymatique. La réaction est laissée durant 20 minutes et l'absorbance de la *p*-nitroaniline est mesurée à 405 nm. Un cycle complet pour lire la plaque prend environ 30 secondes. Des pentes de l'absorbance de la *p*-nitroaniline en fonction du temps sont obtenues pour chaque concentration. Une correction est effectuée pour l'hydrolyse chimique du D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide. La valeur est ensuite divisée par le coefficient d'extinction molaire déterminé plus tôt afin

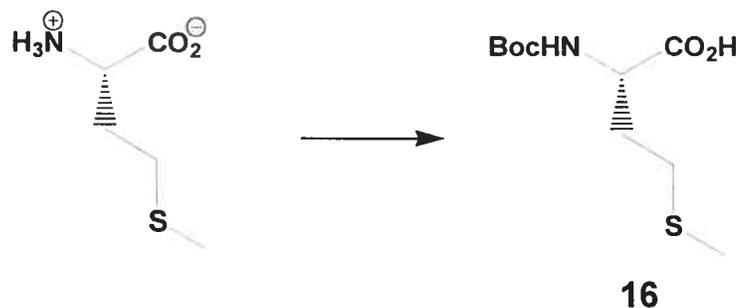
d'obtenir une vitesse de réaction. La vitesse d'hydrolyse enzymatique est soustraite de la vitesse en présence de l'amine.

Les alcools ont été testés de la même manière que les amines. Des concentrations de 0,2 à 2,5 M ont été testées. Pour l'acide D-lactique (**12**), une solution-mère de 2,5 M a été préparée dans du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Une série de cuvettes contenant des concentrations de l'acide D-lactique (**12**) (0-75 mM) a été préparée afin d'être utilisée avec un spectrophotomètre. Une concentration de 1 mM du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et de 20 mM du substrat accepteur glycyglycine sont présentes. Du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 est ajouté jusqu'à complétion du volume à 1 mL. Environ 5,5 mU de GGT sont ajoutées pour démarrer la réaction. L'absorbance de la *p*-nitroaniline libérée est suivie avec un spectrophotomètre Cary sur une période de 20 minutes à 410 nm.

Pour l'acide L-lactique (**13**), une première série de cuvettes contenant des concentrations variables du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (67-1680  $\mu$ M) et 20 mM du substrat accepteur glycyglycine est préparée et complétée à un volume de 1 mL avec du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Une quantité d'environ 6 mU de GGT est ajoutée pour démarrer la réaction. La même série de cuvettes est préparée en ajoutant une concentration fixe d'acide L-lactique (5-20 mM). Pour chaque cuvette, un graphique d'absorbance en fonction du temps est obtenu. La pente est divisée par le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline (8800  $M^{-1}cm^{-1}$ ). Ces données sont utilisées pour faire des graphiques de type Michaelis-Menten ou Lineweaver-Burk grâce au logiciel Axum 5.0. Les constantes d'inhibition sont déterminées en réalisant des courbes de Dixon<sup>86</sup> avec le même logiciel. Une deuxième série de cuvettes contenant une concentration fixe du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (1 mM) et différentes concentrations du substrat accepteur glycyglycine (0,5-20 mM) est préparée et complétée à 1 mL avec du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. La réaction est démarrée par l'addition de 5,5 mU de GGT. La même série de cuvettes est préparée avec des concentrations fixes d'acide L-lactique (**13**) (12,5-25 mM). Le traitement cinétique est le même que dans le cas de la première série de cuvettes.

Pour les dérivés thiolés, des solutions-mères de 1 M ont été préparées dans l'eau déionisée. Dans le cas du méthyl 2-thioacétate (**16**), une solution-mère de 0,5 M dans 50 %/50 % H<sub>2</sub>O/acétonitrile est préparée. Les tests cinétiques sont effectués avec un lecteur de plaques de la même manière que les amines testées. Les concentrations présentes des thiols varient entre 0 et 150 mM, sauf pour le méthyl 2-thioacétate (**16**) qui varie jusqu'à 100 mM. Dans ce dernier cas, de l'acétonitrile a été ajoutée dans chaque puits afin que ce solvant occupe un volume total constant de 10 % du puits. Ce composé est alors comparé à la réaction d'hydrolyse en présence de 10 % d'acétonitrile.

## 6.2.2.2 Synthèse des dérivés de la L-méthionine

*N-tert-butoxycarbonyl-L-méthionine (17)*

La L-méthionine (1 g, 6,7 mmoles) est dissoute dans le méthanol. Le (Boc)<sub>2</sub>O (1,76 g, 8,0 mmoles) et la triéthylamine (5,6 mL, 40,2 mmoles) sont ajoutés et la réaction est laissée sous agitation pour la nuit à la température de la pièce. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le solide obtenu est dissout dans une solution de HCl 1 N (20 mL). Des extractions avec de l'acétate d'éthyle (3 × 20 mL) sont faites, puis les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO<sub>4</sub>, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Une huile incolore est obtenue (1,6 g, 76 %).

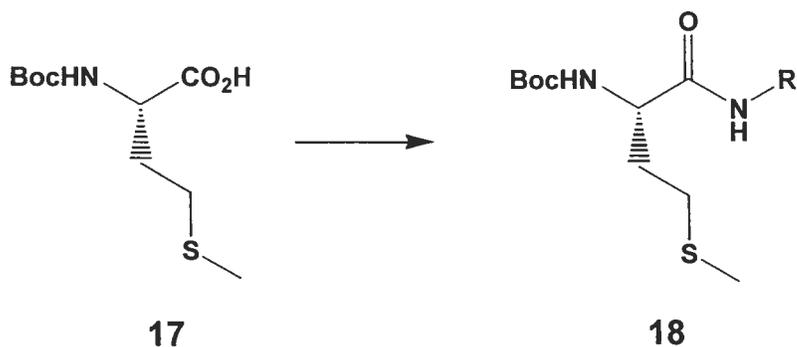
$[\alpha]_{\text{D}} + 17,9^{\circ}$  (c = 1, CHCl<sub>3</sub>) (litt. :  $-7,3^{\circ}$  (c = 1, EtOH, composé solide))<sup>177</sup>.

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 1,40 (s, 9H), 1,94-2,12 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 2,53 (t, *J* = 4,9 Hz, 2H), 4,40 (m, 1H), 6,85 (s *large*, 1H), 11,64 (s *large*, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 15,7, 28,7, 30,3, 32,2, 53,0, 80,7, 156,0, 176,9.

SMHR (MAB, M<sup>+</sup>) 249,1027. C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>S calculé 249,1035.

Protocole général pour les dérivés de *N*-tert-butoxycarbonyl-*L*-méthioninamide (18a-d)



Le composé Boc-*L*-méthionine (**17**) (1 éq) est dissout dans 20 mL d'acétonitrile. La diisopropyléthylamine (DIEA) (2,5 éq) est ajoutée goutte à goutte. L'amine désirée (1,5 éq), puis le tétrafluoroborate de *O*-(benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium (TBTU) (1,5 éq) sont ajoutés au mélange réactionnel et le tout est laissé sous agitation pour la nuit à la température de la pièce. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu huileux obtenu est dissout dans l'acétate d'éthyle. Des lavages avec de l'eau (3 × 20 mL), puis avec une solution de HCl 0,1 N (1 × 20 mL), une solution de 5 % bicarbonate de sodium (2 × 20 mL) et une solution de NaCl saturée (1 × 20 mL) sont faits. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée puis évaporée sous pression réduite.

*N*-tert-butoxycarbonyl-*L*-méthionyl(2,2,2-trifluoroéthylamide) (**18a**).

L'amine 2,2,2-trifluoroéthylamine est utilisée. Un solide blanc-jaune est obtenu (1,4 g, 100 %).

**R<sub>f</sub>** 0,37 (35 %/65 % acétate d'éthyle/hexane, révélateur : ninhydrine).

**p.f.** (88,0-89,5) °C.

**[α]<sub>D</sub>** -22,1° (c = 1, CHCl<sub>3</sub>).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) : 1,41 (s, 9H), 1,88-2,02 (m, 2H), 2,07 (s, 3H), 2,53 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,70-3,98 (m, 2H), 4,39 (m, 1H), 5,56 (*s large*, 1H), 7,48 (*s large*, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) :** 15,7, 28,6, 30,5, 31,6, 40,9 (q,  $J = 34,9$  Hz), 53,6, 81,0, 124,4 (q,  $J = 278,6$  Hz), 156,4, 172,8.

**RMN  $^{19}\text{F}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) :** -72,91 (t,  $J = 8,6$  Hz).

**SMHR (MAB,  $\text{M}^+$ )** 330,1231.  $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$  calculé 330,1225.

*N-tert-butoxycarbonyl-L-méthionyl(3,3,3-trifluoropropylamide) (18b).*

L'amine 3,3,3-trifluoropropylamine synthétisée selon un protocole publié<sup>112</sup> est utilisée. Un solide blanc-jaune est obtenu (236 mg, 62 %).

**R<sub>f</sub>** 0,79 (100 % acétate d'éthyle, révélateur : ninhydrine).

**p.f.** (110-112) °C

**$[\alpha]_{\text{D}}$**  -4,89 ° (c = 0,675,  $\text{CHCl}_3$ ).

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) :** 1,42 (s, 9H), 1,85-2,07 (m, 2H), 2,08 (s, 3H), 2,33 (m, 2H), 2,53 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 3,50 (m, 2H), 4,25 (m, 1H), 5,31 (s large, 1H), 6,86 (s large, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) :** 15,6, 28,6, 30,5, 32,0, 33,4, 33,9 (q,  $J = 27,5$  Hz), 53,8, 80,6, 126,7 (q,  $J = 277,1$  Hz), 156,2, 172,6.

**RMN  $^{19}\text{F}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) :** -65,62 (t,  $J = 10,4$  Hz).

**SMHR (MAB,  $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>** 345,1471.  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$  calculé 345,1460.

*N-tert-butoxycarbonyl-L-méthionyl(2-fluoroéthylamide) (18c).*

L'amine 2-fluoroéthylamine a été utilisée. Une huile jaune a été obtenue (730 mg, 100 %).

$R_f$  0,46 (50 %/50 % acétate d'éthyle/hexane, révélateur : ninhydrine).

$[\alpha]_D -9,0^\circ$  (c = 1,  $\text{CHCl}_3$ ).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 1,39 (s, 9H), 1,96 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 2,51 (t,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 3,51 (m, 2H), 4,28 (m, 1H), 4,43 (td,  $J = 4,7, 47,3$  Hz, 2H), 5,50 (s large, 1H), 7,14 (s large, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 15,1, 28,1, 30,0, 31,8, 39,7 (d,  $J = 20,1$  Hz), 53,3, 79,9, 82,2 (d,  $J = 167,4$  Hz), 155,6, 172,1.

**RMN  $^{19}\text{F}$  (376 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : -119,65 (t,  $J = 57,5$  Hz).

**SMHR (MAB,  $\text{M}^+$ )** 294,1410.  $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_3\text{S}$  calculé 294,1413.

*N-tert-butoxycarbonyl-L-méthionylpropylamide (18d).*

L'amine propylamine est utilisée. Une huile jaune est obtenue<sup>178</sup> (280 mg, 86 %).

$R_f$  0,63 (50 %/50 % acétate d'éthyle/hexane, révélateur : ninhydrine).

$[\alpha]_D +9,5^\circ$  (c = 1,  $\text{CHCl}_3$ ).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 0,90 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H), 1,42 (s, 9H), 1,51 (sxt,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,88-2,05 (m, 2H), 2,09 (s, 3H), 2,53 (t,  $J = 6,9$  Hz, 2H), 3,20 (t,  $J = 5,3$  Hz, 2H), 4,24 (m, 1H), 5,36 (s large, 1H), 6,48 (s large, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$  (ppm) : 11,7, 15,7, 23,1, 28,7, 30,6, 32,3, 41,5, 53,9, 80,3, 156,2, 172,0.

**SMHR (MAB,  $\text{M}^+$ )** 290,1667.  $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$  calculé 290,1664.

*N-tert-butoxycarbonyl-L-méthionyléthylamide (18e).*

À une solution de *N-tert*-butoxycarbonyl-L-méthionine (17) (230 mg, 0,92 mmole) dans du dichlorométhane anhydre, la triéthylamine (142  $\mu$ L, 1,02 mmole), le *p*-nitrophényl chloroformate (205 mg, 1,02 mmole) et enfin la diméthylaminopyridine (DMAP) (11 mg, 0,092 mmole) sont ajoutés. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince ( $R_f$  = 0,91 (100 % acétate d'éthyle, révélateur : UV et ninhydrine)) et laissée sous agitation pour la nuit. Le solvant est évaporé sous pression réduite.

Le résidu est utilisé sans autre purification afin d'éviter la décomposition. Le résidu est dissout dans du THF anhydre et placé à 0 °C. Ensuite, l'éthylamine (600  $\mu$ L d'une solution 2,0 M dans le THF, 1,20 mmol) est ajouté et la réaction est laissée sous agitation durant la nuit en permettant au mélange réactionnel de revenir à la température de la pièce. La réaction est suivie par chromatographie sur couche mince ( $R_f$  = 0,43 (50 %/50 % acétate d'éthyle/hexane), révélateur : UV et ninhydrine). Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est dissout dans l'acétate d'éthyle. Le solide non soluble est filtré par gravitation et le composé dissout est purifié par chromatographie « flash » (50 %/50 % acétate d'éthyle/hexane). Un solide blanc est obtenu (176 mg, 69 %).

$R_f$  0,43 (50 %/50 % acétate d'éthyle/hexane, révélateur : ninhydrine).

p.f. (78-79) °C.

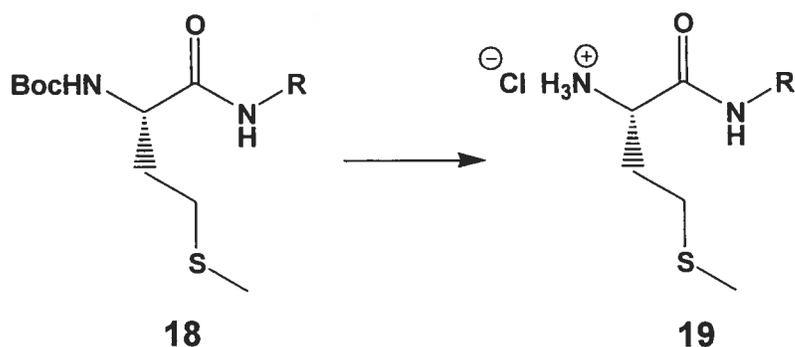
$[\alpha]_D$  -4,6 ° (c = 1, CHCl<sub>3</sub>).

RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) : 1,15 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H), 1,46 (s, 9H), 1,92-2,08 (m, 2H), 2,12 (s, 3H), 2,56 (m, 2H), 3,31 (m, 2H), 4,24 (m, 1H), 5,31 (*s large*, 1H), 6,36 (*s large*, 1H).

RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) : 15,1, 15,7, 28,7, 30,7, 32,7, 34,7, 54,0, 80,3, 156,2, 172,1.

SMHR (MAB, M<sup>+</sup>) 276,15080. C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S calculé 276,15077.

Protocole général pour les dérivés de L-méthioninamide **19a-e**



Le dérivé *N-tert*-butoxycarbonyl-L-méthioninamide (**18a-e**) (1 éq) est dissout dans le dichlorométhane et placé dans un bain de glace. De l'anisole (1 éq) et l'acide trifluoroacétique (TFA) (10 éq) sont ajoutés goutte à goutte. La réaction est laissée dans le bain de glace durant 3 heures, puis laissée à la température de la pièce jusqu'à ce qu'elle soit complète (5 heures ou toute la nuit). Un volume correspondant à 5 éq de TFA est ajouté au mélange réactionnel si nécessaire pour compléter la réaction. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est lavé trois fois avec du cyclohexane (3 × 10 mL). Le résidu huileux est ensuite dissout dans une solution de HCl 0,1 N (10 mL) et des lavages avec du diéthyl éther sont faits (3 × 10 mL). La phase aqueuse est évaporée sous pression réduite et le résidu est placé sur une pompe pour la nuit.

*L*-méthionyl(2,2,2-trifluoroéthylamide)•HCl (**19a**)

Un solide est obtenu (69 mg, 100 %).

**p.f.** (128-130) °C.

$[\alpha]_D^{20}$  +21,2° (c = 1, H<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm) : 2,10 (s, 3H), 2,20 (q, *J* = 6,9 Hz, 2H), 2,20 (t, *J* = 6,6 Hz, 2H), 3,90-4,12 (m, 2H), 4,17 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) :** 14,3, 28,4, 30,3, 40,7 (q,  $J = 34,7$  Hz), 52,8, 124,3 (q,  $J = 275,5$  Hz), 170,5.

**RMN  $^{19}\text{F}$  (376 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) :** -73,97 (t,  $J = 8,9$  Hz).

**SMHR (MAB,  $\text{M}^+$ )** 230,0704.  $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$  calculé 230,0701.

*L*-méthionyl(3,3,3-trifluoropropylamide)•HCl (**19b**)

Une huile jaune est obtenue (147 mg, 80 %).

$[\alpha]_{\text{D}} +2,6^\circ$  (c = 0,742,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) :** 2,07-2,20 (m, 2H), 2,13 (s, 3H), 2,47 (m, 2H), 2,60 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 3,42-3,60 (m, 2H), 4,01 (t,  $J = 6,6$  Hz, 1H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) :** 15,1, 29,8, 32,0, 33,9 (q,  $J = 28,1$  Hz), 34,0, 53,7, 127,8 (q,  $J = 276,0$  Hz), 169,9.

**RMN  $^{19}\text{F}$  (376 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) :** -68,25 (t,  $J = 11,4$  Hz).

**SMHR (MAB,  $\text{M}^+$ )** 244,0848.  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{OS}$  calculé 244,0857.

*L*-méthionyl(2-fluoroéthylamide)•HCl (**19c**)

Un solide jaune est obtenu (99 mg, 98 %).

**p.f.** (110-113) °C.

**[α]<sub>D</sub>** +37,3 ° (c = 1, H<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm) : 2,11 (s, 3H), 2,18 (q, *J* = 7,0 Hz, 2H), 2,60 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,50-3,68 (m, 2H), 4,12 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,56 (td, *J* = 4,5, 47,0 Hz, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm) : 14,8, 28,9, 30,7, 40,8 (d, *J* = 19,7 Hz), 53,2, 83,4 (d, *J* = 163,9 Hz), 170,3.

**RMN <sup>19</sup>F (376 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm) : -124,25 (t, *J* = 57,5 Hz).

**SMHR (MAB, M<sup>+</sup>)** 194,08889. C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>OS calculé 194,08891.

*L*-méthionylpropylamide•HCl (**19d**).

Une huile jaune est obtenue (182 mg, 94 %).

**[α]<sub>D</sub>** +33,1 ° (c = 0,717, H<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm) : 0,88 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 1,52 (sxt, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,11 (s, 3H), 2,16 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,59 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 4,07 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm) : 11,1, 14,4, 22,1, 28,6, 30,4, 41,8, 52,9, 169,3.

**SMHR (MAB, M<sup>+</sup>)** 190,1138. C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>OS calculé 190,1140.

*L*-méthionyléthylamide•HCl (**19e**).

Une huile jaune est obtenue<sup>179</sup> (129 mg, 96 %).

$[\alpha]_{\text{D}} +31,7^{\circ}$  (c = 1, H<sub>2</sub>O).

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm) : 1,14 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H), 2,13 (s, 3H), 2,17 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,61 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,27 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 4,07 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, D<sub>2</sub>O)** δ (ppm) : 14,3, 15,0, 29,1, 30,8, 35,6, 53,3, 169,5.

**SMHR (MAB, M<sup>+</sup>)** 176,0981. C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>OS calculé 176,0983.

### 6.2.2.3 Titrage des substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine

Le  $pK_a$  des substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine (**19a-f**) est mesuré à l'aide de l'autotitrateur. Une solution de 55 mM de KCl est utilisée afin de faire des solutions de 0,2 M pour chaque substrat accepteur. Le titrage est effectué avec une solution de 0,1 N de NaOH. Des courbes sigmoïdales ont été obtenues en duplicata pour chaque composé. La détermination du  $pK_a$  est effectuée grâce à une équation correspondant à la présence d'un seul  $pK_a$  présente dans le logiciel DLWin utilisé pour analyser les données. La moyenne des deux valeurs obtenues a été utilisée.

### 6.2.2.4 Études cinétiques en état stationnaire avec les substrats accepteurs dérivés de la L-méthionine

Une solution de 0,1 M de chaque substrat accepteur testé est faite dans du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Une série de cuvettes contenant différentes concentrations (5-150  $\mu$ M) du substrat donneur D- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (à partir d'une solution-mère de 5 mM) et du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 pour compléter jusqu'à 1 mL est préparée. Les réactions cinétiques sont débutées par l'ajout d'environ 39 mU d'enzyme purifiée à partir du rein de rat. La libération de la *p*-nitroaniline est suivie par spectrophotométrie UV-Vis à 410 nm à 37 °C. La même série de cuvettes est réalisée, mais en présence d'une concentration fixe de substrat accepteur (entre 4 et 20 mM, sauf pour le composé L-méthioninamide **19f**, jusqu'à 8 mM). La valeur des pentes des droites obtenues pour l'absorbance en fonction du temps est divisée par le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline (8800  $M^{-1}cm^{-1}$ ). Ces vitesses sont utilisées pour tracer des courbes de type Lineweaver-Burk où l'inverse de la vitesse est représenté en fonction de l'inverse de la concentration du substrat donneur pour chacune des concentrations fixes du substrat accepteur. Des expériences témoins sont également effectuées de la même manière, mais en absence d'enzyme, pour corriger pour l'hydrolyse chimique du

substrat donneur. L'équation (1) de la section 3.2.4 est utilisée pour analyser ces données.

L'ordonnée à l'origine de la droite sur le graphique Lineweaver-Burk correspondant à la réaction d'hydrolyse est appelée  $int_0$  alors que l'ordonnée à l'origine des autres droites obtenues en présence d'une certaine concentration de substrat accepteur est appelée  $int_x$ . Le graphique de  $(int_0 - int_x)^{-1}$  en fonction de  $[substrat\ accepteur]^{-1}$  est tracé. L'abscisse à l'origine correspond à l'inverse de la constante de partage ( $-1/K_{iab}$ ). Cette valeur, correspondant à  $(K_b V_h)/V_b$ , est utilisée pour trouver la valeur de  $V_b/K_b$ . Celle-ci est transformée en  $k_{cat,b}^{norm} / K_b$  en divisant par la concentration en enzyme (poids moléculaire de 68 000 Da) et en normalisant pour une activité spécifique de 837 U/mg selon l'équation (2) de la section 3.2.4. Ces données sont ensuite utilisées pour tracer un graphique de Brønsted. L'erreur expérimentale sur la courbe de Brønsted provient de l'erreur sur la valeur de la constante de partage. Tous les graphiques ont été tracés en utilisant le logiciel Axum 5.0.

#### 6.2.2.5 Études de l'effet du pH

Le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline à pH 6,25 a été déterminé en traçant une courbe de l'absorbance de ce composé en fonction de sa concentration. Une série de cuvettes contenant différentes concentrations de *p*-nitroaniline (0-100  $\mu$ M) complétées à un volume de 1 mL par l'ajout de tampon 0,1 M MES pH 6,25 a été préparée. La mesure des absorbances a été faite à 410 nm avec un spectrophotomètre UV-Vis. La pente de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration représente le coefficient d'extinction molaire selon l'équation de la loi de Beer-Lambert. L'analyse a été effectuée avec le logiciel Axum 5.0.

Les expériences cinétiques ont été effectuées de la même manière que dans la section 6.2.2.4. Le substrat accepteur utilisé est le L-méthionylpropylamide (**19d**). Les solutions de tampon ont été préparées avec des concentrations de 0,1 M (avec le

tampon MES pour le pH 6,25, tampon MOPS pour les pH 7,0, 7,25 et 7,50, tampon Tris pour les pH 8,0, 8,5 et 8,75 et tampon CHES pour les pH 9,0 et 9,5). Les valeurs des pentes pour les droites d'absorbance en fonction du temps ont été divisées par le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline correspondant à chaque pH. Dans le cas du pH 6,25, le coefficient d'extinction molaire a été déterminé comme il a été indiqué plus haut. Pour les autres pH, les valeurs utilisées sont celles publiées dans la littérature<sup>83</sup>. Les analyses des données cinétiques ont été effectuées avec le logiciel Axum 5.0 et le tracé de la courbe pH-vitesse a été réalisé avec le logiciel Origin 6.0.

#### 6.2.2.6 Effets isotopiques de solvant

Les solutions préparées sont les mêmes qu'à la section 6.2.2.4. De l'oxyde de deutérium (D<sub>2</sub>O) remplace l'eau déionisée habituellement utilisée. Le pD des solutions est ajusté avec une électrode combinée en lisant une valeur de pH de 7,6 au pH-mètre<sup>115</sup>. Le coefficient d'extinction molaire de la *p*-nitroaniline à pD 8,0 a été mesuré et est le même que dans l'eau déionisée. Les substrats accepteurs utilisés sont le L-méthionyl(2-fluoroéthylamide) (**19c**), le L-méthionylpropylamide (**19d**) et la L-méthioninamide (**19f**). Les résultats cinétiques ont été analysés de la même manière qu'à la section 6.2.2.4.

## **6.3 Expression et purification de la GGT humaine dans la levure *P. pastoris***

### **6.3.1 Matériel**

Le plasmide pVL1392-hGGT a été gracieusement donné par le Pr. Taniguchi<sup>14</sup>. Le plasmide pPICZ $\alpha$ A provient de la compagnie Invitrogen. Les cellules *E. coli* XL-1 Blue ont été gracieusement données par la Pr. Joelle Pelletier du département de chimie de l'Université de Montréal. Les levures *P. pastoris* X-33 proviennent de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB-CNRC, Montréal) grâce au Docteur Robert Lortie.

Les amorces utilisées pour la PCR ont été fabriquées par la compagnie AlphaDNA (Montréal). Les solutions utilisées pour les réactions de PCR proviennent de la compagnie New England Biolabs (NEB). Les solutions nécessaires pour la mini-purification d'ADN (plasmidique ou génomique, notamment la lyticase) et pour les transformations (tel l'ADN de sperme de saumon), les billes de verre, les inhibiteurs de protéases et les « casamino acids » proviennent de Sigma-Aldrich ou de BioShop. Les enzymes de restriction *EcoRI*, *NotI*, *BamHI* et *SacI*, leurs tampons respectifs, et l'enzyme T4 Ligase proviennent de la compagnie Fermentas. Le marqueur de fragments d'ADN ayant différents nombres de paires de base est le Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas). Le marqueur de poids moléculaire protéique, déjà coloré avec du bleu de Coomassie et couvrant une gamme de faibles poids, provient quant à lui de BioRad. La glycosidase F et les tampons nécessaires à la déglycosylation (NEB) ont été donnés par le Pr. Guy Boileau du département de biochimie de l'Université de Montréal. L'ensemble QIAEX et la matrice de Ni-NTA pour la chromatographie d'affinité ont été achetés chez QIAGEN. Les composés entrant dans la composition des milieux de culture LB, YPD, BMGY et BMMY proviennent principalement de la compagnie BioShop (Montréal). Les solutions pour les gels d'électrophorèse proviennent de la compagnie BioRad ou ont été gracieusement données par le Pr. Pascal Chartrand du département de biochimie de

l'Université de Montréal. L'anticorps primaire est un clone 9E10 anti-myc monoclonal de souris, isotype IgG1. L'anticorps secondaire est un anticorps Affinipure IgG (H+L) de chèvre anti-souris conjugué avec la peroxydase provenant de la compagnie Jackson Immunoresearch et a été donné, comme l'anticorps primaire et la solution du substrat (Lumi-Light) pour la peroxydase de raifort (Roche), par le Pr. Pascal Chartrand. L'antibiotique Zeocin a été gracieusement donné par le Pr. Stephen Michnick du département de biochimie de l'Université de Montréal.

Les mesures d'absorbance ont été prises avec l'appareil décrit à la section 6.2.1 ou le spectrophotomètre Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 (Pharmacia). L'appareil de PCR est un PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Les micro-centrifugeuses sont de type Eppendorf 5417R (Eppendorf). Une centrifugeuse Beckman GS-6R, possédant un rotor GS-3.8, a été utilisée. La centrifugeuse Sorvall RC 5C est munie d'un rotor Sorvall SS-34. Pour l'immunobuvardage, l'appareil de transfert sur membrane de nitrocellulose est un Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad). Le développement du film est fait avec un appareil appartenant au département de biochimie de l'Université de Montréal. Le séquençage du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  a été effectué sur un appareil de la compagnie Licor par le Service de séquençage d'ADN du département de biochimie de l'Université de Montréal.

### 6.3.2 Méthode

#### 6.3.2.1 Clonage du gène de la GGT humaine dans un plasmide et transformation des bactéries *E. coli*

*Amorces de la PCR* : Des amorces pour la réaction de PCR ont été élaborées afin de contenir, tel qu'indiqué à la section 4.2.1, des sites de reconnaissance pour des enzymes de restriction et afin de pouvoir éliminer l'ADN correspondant à l'ancre transmembranaire. L'amorce 1 possède la séquence de nucléotides 5'-CACACAGAAATTCTCAGCCTCCAAGGAACCT-3'. Elle contient le site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction *EcoRI* (nucléotides soulignés) et se lie

au résidu 27 de la grande sous-unité de la GGT humaine. L'amorce 2 possède la séquence de nucléotides 5'-CACACAGCGGCCGCGTAGCCGGCAGGCTCCCC-3' et contient le site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction *NotI* (nucléotides soulignés).

*Réaction de PCR* : La réaction de PCR a été réalisée selon le protocole suivant, modifié d'un autre préalablement publié<sup>153</sup>. Dans un tube eppendorf sont mélangés de l'eau (74  $\mu$ L), du DMSO (5  $\mu$ L, pourcentage final de 5 %), un mélange des quatre nucléotides (2  $\mu$ L d'une solution de 10 mM), l'amorce 1 (2  $\mu$ L d'une solution-mère de 50 pmoles/ $\mu$ L), l'amorce 2 (2  $\mu$ L d'une solution-mère de 50 pmoles/ $\mu$ L), la matrice d'ADN (plasmide pVL1392-hGGT, 2  $\mu$ L d'une concentration de 0,3  $\mu$ g/ $\mu$ L), le tampon Thermopol (concentré 10 fois; 10  $\mu$ L), du MgSO<sub>4</sub> (3  $\mu$ L d'une solution de 100 mM) et la Vent DNA Polymerase (0,5  $\mu$ L d'une solution à 2000 U/mL). Ce tube est préparé quatre fois. Un programme pour la réaction de PCR est préparé de la manière suivante : 2 minutes à 92 °C, 30 secondes à 92 °C, 30 secondes à une température précise située entre 50 et 60 °C, puis 1 minute à 72 °C. Ce cycle des deux dernières minutes est répété 29 fois. Enfin, la réaction de PCR est terminée par 3 minutes à 72 °C, puis un temps infini à 4 °C. Il est possible de créer un gradient de température dans le bloc de l'appareil à PCR. Un tube préparé selon le protocole décrit plus tôt est placé à l'endroit correspondant aux températures 50, 52,8, 56 et 60 °C afin de déterminer si l'une de celles-ci est meilleure pour l'amplification de l'ADN par la Vent DNA Polymerase. L'échantillon est déposé pour migration sur un gel d'électrophorèse horizontal fait avec de l'agarose 1 % (tampon TAE 1X<sup>153</sup>) afin de déterminer si la réaction de PCR a fonctionné. Un aliquot de 10  $\mu$ L de chacun des tubes est mélangé avec 2  $\mu$ L d'une solution contenant du bleu de bromophénol (dont la composition se retrouve dans la littérature<sup>153</sup>), puis placé dans un puits sur le gel d'agarose. La migration est effectuée à 120 V durant environ 30 minutes, puis la révélation est effectuée sous une lampe UV grâce au bromure d'éthyldium présent dans le gel d'agarose. La bande correspondant à l'amplification par PCR est comparée avec un échantillon de fragments d'ADN ayant différents nombres de paires de base (Gene Ruler DNA Ladder Mix).

*Précipitation de l'ADN* : L'ADN obtenu dans le tube avec la température de 56 °C est précipité avec du *n*-butanol. Le volume de 100 µL dans le tube de PCR est divisé en deux tubes eppendorf. Dans chacun, un volume de 450 µL de *n*-butanol est ajouté et le tout est mélangé par inversion jusqu'à ce que la solution soit homogène. Ensuite, une centrifugation à 14 000 rpm durant 30 minutes à 4 °C est effectuée dans une micro-centrifugeuse. Le surnageant est doucement enlevé et le culot (ADN) est laissé à la température de la pièce durant environ deux heures afin de bien le sécher. Le culot est ensuite resuspendu dans un volume de 50 µL d'eau déionisée.

*Digestion enzymatique* : Les digestions enzymatiques sont effectuées pour le fragment d'ADN obtenu par PCR et pour le plasmide pPICZαA commercial. Pour le premier, le volume total de 50 µL a été placé dans un eppendorf, puis du tampon O<sup>+</sup> (6 µL), de l'enzyme de restriction *EcoRI* (1 µL), de l'enzyme de restriction *NotI* (1 µL), puis de l'eau déionisée (2 µL) sont ajoutés. Ce tube est placé à 37 °C pour la nuit. Le lendemain, un volume de 0,5 µL de chacune des enzymes de restriction est ajouté et la digestion est laissée durant une heure. Dans le cas du plasmide pPICZαA, un volume de 15 µL (provenant d'une solution-mère dont la concentration est de 7,1 ng/µL) et un volume de 37 µL d'eau sont utilisés. Les autres éléments sont présents en même quantité.

*Purification de l'ADN* : Tout l'ADN est ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse horizontal d'agarose 1 % puis la migration est effectuée à 120 V durant environ 45 minutes. Les bandes correspondant à l'ADN désiré sont ensuite découpées, puis placées dans des eppendorfs. Une purification de l'ADN est effectuée avec un ensemble QIAEX en suivant le protocole fourni par le manufacturier<sup>180</sup>. Cet ADN purifié est ensuite quantifié sur gel d'agarose 1 %. Pour y arriver, une quantité de 5 µL de l'ADN purifié avec 1 µL de solution de bleu de bromophénol est mise sur le gel d'agarose, tout comme un échantillon de 6 µL de marqueur de paires de bases d'ADN. La migration est effectuée durant environ 30 minutes. Ensuite, l'intensité

de la bande d'ADN du gène de la GGT mutée et celle du plasmide pPICZ $\alpha$ A digérées est comparée à l'intensité de bandes présentes dans le marqueur grâce au bromure d'éthyldium présent dans le gel lors de la visualisation sous une lampe UV. Puisque la quantité d'ADN est connue pour certaines bandes<sup>181</sup>, il est possible de connaître la concentration d'ADN des deux bandes désirées.

*Ligaturation* : La ligaturation des deux fragments d'ADN (GGT mutée et plasmide pPICZ $\alpha$ A) est effectuée selon le protocole suivant. Un ratio de 5 moles d'insert (gène de la GGT mutée) pour 1 mole de vecteur est réalisé. Cependant, il est nécessaire de tenir compte du nombre de paires de bases de chacun des fragments. L'utilisation d'un site web<sup>182</sup> a permis de calculer le nombre de nanogrammes nécessaire pour chacun des fragments. Un certain volume de chacun est utilisé selon la concentration déterminée plus tôt. Ensuite, un volume de 7  $\mu$ L de tampon pour la ligase et un volume de 1  $\mu$ L de la T4 ligase sont ajoutés aux volumes d'ADN. Le tout est complété à 70  $\mu$ L avec de l'eau déionisée et laissé à 4 °C pour la nuit. La même expérience a été réalisée en respectant un ratio de 10 :1. Les deux solutions sont ensuite précipitées avec le *n*-butanol comme il est inscrit plus haut et le culot est resuspendu dans un volume de 25  $\mu$ L d'eau déionisée.

*Électrotransformation* : Des cellules *E. coli* de la souche XL-1 Blue ont été rendues électrocompétentes (affaiblissement de leur membrane plasmidique) selon un protocole préalablement établi<sup>153</sup>. Toutes les manipulations sont faites sur la glace. Un volume de 10  $\mu$ L d'ADN précipité préalablement est ajouté à 80  $\mu$ L de cellules électrocompétentes et le tout est agité sans faire de bulles. Le mélange est placé dans une cuvette à électroporation, puis celle-ci est mise dans l'électroporateur. Le courant électrique est lancé (1800 V), puis un mélange de 880  $\mu$ L de milieu LB, de 10  $\mu$ L d'une solution de 0,25 M KCl/1 M MgCl<sub>2</sub> et de 20  $\mu$ L de 20 % glucose, stériles, est ajouté aux cellules bactériennes. Le tout est récupéré, puis placé dans un tube eppendorf stérile laissé sous agitation durant 45 minutes à 37 °C. Un volume de 10  $\mu$ L est étalé sur une boîte de Petri contenant un milieu de culture solide LB (dont

la composition se retrouve dans des protocoles déjà établis<sup>151</sup>) et une concentration finale de 25 µg/mL de l'antibiotique Zeocin (à partir d'une solution-mère de 100 mg/mL). Un volume de 100 µL de cellules électrotransformées est également étalé sur une autre boîte de Petri. Enfin, le reste des cellules a été centrifugé à 14000 rpm durant 10 secondes, puis le culot, resuspendu dans environ 100 µL de surnageant, est étalé sur une troisième boîte de Petri. Le tout est placé à 37 °C pour la nuit. Le lendemain, les colonies bactériennes sont comptées. Une expérience témoin avec des bactéries non transformées est menée et aucune colonie n'a été observée. Cette expérience a été effectuée avec l'ADN provenant des deux ratios de ligaturation afin d'observer si l'un des ratios est meilleur.

*Pré-culture bactérienne* : Des tubes de culture contenant 4 mL d'un milieu de culture LB liquide (avec une concentration de 25 µg/mL de l'antibiotique Zeocin) sont préparés<sup>153</sup>. Dans douze d'entre eux, une colonie de bactérie provenant d'une boîte de Petri est transférée, de manière stérile, dans le tube. Un tube témoin ne reçoit pas de bactérie. Le tout est laissé à 37 °C durant la nuit sous agitation (250 rpm) dans un incubateur.

*Mini-préparation d'ADN* : Un échantillon de 0,5 mL de bactéries provenant de chacun des tubes est mélangé à un volume de 0,5 mL d'une solution de 50 % glycérol/1 % NaCl puis entreposé à -80°C. Le reste des bactéries est utilisé afin d'effectuer la mini-préparation d'ADN servant à isoler l'ADN plasmidique. Un protocole déjà publié a été suivi<sup>183</sup>.

*Analyse par restriction* : Pour chacun des douze échantillons d'ADN plasmidique purifié, une digestion enzymatique a été effectuée. Un volume de 2 µL d'ADN provenant de chaque purification est placé dans un tube eppendorf contenant un volume de 1 µL de l'enzyme de restriction *Bam*HI, un volume de 2,5 µL de tampon *Bam*HI<sup>+</sup> et le tout est complété à 25 µL avec de l'eau déionisée. Le tube est laissé à 37 °C pour la nuit. Un échantillon de 1 µL d'ADN digéré est placé avec un volume de 9 µL d'eau et de 2 µL de solution de bleu de bromophénol, puis est mis sur un gel

d'électrophorèse d'agarose 1 % en présence d'un marqueur de fragments de paires de bases. Les bandes obtenues après digestion enzymatique sont comparées à celles présentes dans le marqueur.

#### 6.3.2.2 Linéarisation du plasmide purifié et transformation des levures *P. pastoris*

*Linéarisation du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$*  : Un volume de 40  $\mu$ L du plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  (correspondant à une quantité d'environ 15  $\mu$ g d'ADN) est placé dans un tube eppendorf. Un volume de 3  $\mu$ L d'enzyme de restriction *SacI* puis un volume de 6  $\mu$ L du tampon *SacI*<sup>+</sup> sont ajoutés. De l'eau déionisée complète le volume à 60  $\mu$ L. Le tout est laissé à 37 °C pour la nuit. Ensuite, un échantillon de 1  $\mu$ L d'ADN digéré est mélangé avec 9  $\mu$ L d'eau déionisée et 2  $\mu$ L de la solution de bleu de bromophénol. Le tout est placé sur un gel d'électrophorèse horizontal d'agarose 1 % afin de vérifier si l'ADN est bien tout linéarisé. Le tout est également fait avec le plasmide commercial pPICZ $\alpha$ A.

*Précipitation à l'acétate de sodium* : Ce protocole provient d'une variation d'un protocole déjà publié<sup>153</sup>. Dans le tube eppendorf dans lequel la digestion enzymatique s'est effectuée, est ajouté un volume de 6  $\mu$ L (1/10 du volume initial) d'une solution de 3 M NaOAc. Par la suite, un volume de 120  $\mu$ L (2 fois le volume initial) d'éthanol 100 % préalablement placé à -20 °C est ajouté. Le tout est agité doucement et est placé à -80 °C durant environ 45 minutes. Ensuite, une centrifugation à 14000 rpm dans une micro-centrifugeuse durant 15 minutes à la température de la pièce est effectuée, puis le surnageant est jeté. Le culot est laissé durant environ 30 minutes à la température de la pièce pour bien sécher. Il est ensuite resuspendu dans un volume de 50  $\mu$ L d'eau déionisée afin d'être transformé dans les levures.

*Transformation des levures *P. pastoris* X-33* : Les levures *P. pastoris* X-33 sont transformées selon la méthode utilisant le LiCl décrite dans la littérature<sup>151</sup>. Durant

la transformation, une quantité de 15 µg d'ADN (et non 5-10 µg, comme il est inscrit) est utilisée afin de favoriser le plus possible la transformation. Les levures affaiblies n'ont pas été vortexées avec la solution de transformation, tel qu'indiqué, mais plutôt mélangées par aspiration et expulsion avec un pipetteur (« Pipetman »). Un volume de 100 µL de la solution de transformation a été étalé sur une boîte de Petri contenant un milieu de culture YPD (dont la composition se retrouve dans le protocole<sup>150</sup>) et une concentration de 100 µg/mL de l'antibiotique Zeocin. Le reste du volume a été centrifugé à 14000 rpm durant 15 secondes à la température de la pièce, puis le culot est resuspendu dans environ 100 µL du surnageant avant d'être étalé sur une boîte de Petri. Ces expériences sont effectuées avec l'ADN du plasmide pPICZαA-hGGTΔ et du plasmide pPICZαA. Les boîtes de Petri sont laissées pour 3-4 jours dans un incubateur à 30 °C.

#### 6.3.2.3 Purification de l'ADN génomique et vérification de l'intégration du gène

*Pré-culture de levures* : Un tube contenant un volume de 10 mL de milieu de culture YPD (sans antibiotique) est inoculé avec une colonie de levure provenant de la transformation avec le plasmide pPICZαA-hGGTΔ. Ceci est effectué avec d'autres colonies obtenues avec ce plasmide et avec le plasmide pPICZαA. Le tout est placé dans un incubateur à 30 °C avec agitation durant toute la nuit.

*Isolation de l'ADN génomique* : L'ADN génomique a été isolé selon le protocole décrit<sup>150</sup>. Les seules modifications portent sur l'extraction avec le phénol/chloroforme. L'étude effectuée ici a été faite avec un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique selon le ratio 25/24/1 acheté de la compagnie Sigma. Aussi, le culot d'ADN obtenu lors de la dernière étape a été laissé à la température de la pièce toute la nuit. Les autres étapes ont été effectuées de la même manière.

*Quantification de l'ADN* : Une cuvette contenant 999  $\mu\text{L}$  d'eau déionisée et 1  $\mu\text{L}$  de la solution d'ADN a été préparée pour chaque échantillon analysé. L'absorbance est mesurée à 260 et à 280 nm avec un spectrophotomètre UV-Vis. Le ratio  $A_{260}/A_{280}$  a été calculé afin de vérifier la pureté de l'ADN génomique purifié. Ensuite, la valeur d'absorbance à 260 nm est multipliée par 50  $\text{ng}/\mu\text{L}^{153}$ , puis par 1000 (le facteur de dilution de l'ADN) pour donner la valeur de la concentration d'ADN en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

*Amplification par PCR* : Un tube eppendorf est préparé avec les volumes suivants pour les différentes solutions : 71,25  $\mu\text{L}$  d'eau déionisée, 5  $\mu\text{L}$  de DMSO, 2,5  $\mu\text{L}$  d'une solution-mère de 10 mM de nucléotides (mélange de dNTP), 3  $\mu\text{L}$  d'une solution 50 pmoles/ $\mu\text{L}$  de l'amorce 1 (voir section 6.3.2.1), 3  $\mu\text{L}$  d'une solution 50 pmoles/ $\mu\text{L}$  de l'amorce 2 (voir section 6.3.2.1), 1  $\mu\text{L}$  de la solution d'ADN génomique, 10  $\mu\text{L}$  de tampon Thermopol, 3  $\mu\text{L}$  d'une solution 100 mM  $\text{MgSO}_4$  et 0,75  $\mu\text{L}$  de l'enzyme Vent DNA Polymerase. Un tube est ainsi préparé quatre fois pour chaque ADN afin de pouvoir faire la réaction de PCR à quatre températures différentes.

Le programme de la réaction de PCR est le suivant : 94 °C durant 2 minutes, 94 °C durant 1 minute, entre 50 et 60 °C pendant 1 minute, puis 72 °C durant 1 minute. Ces trois dernières étapes sont répétées 29 fois. Enfin, il y a un temps de 7 minutes à 72 °C, puis l'échantillon est laissé à 4 °C pour un temps indéfini. Ensuite, un échantillon de 2  $\mu\text{L}$  d'ADN est mélangé à 8  $\mu\text{L}$  d'eau et à 2  $\mu\text{L}$  de solution de bleu de bromophénol, puis placé sur un gel d'électrophorèse horizontal d'agarose 1 %. La migration est effectuée durant environ 30 minutes, puis la révélation est faite par exposition à la lumière UV.

#### 6.3.2.4 Vérification de l'expression de la GGT dans *P. pastoris*

*Culture des levures* : Des cellules congelées à -80 °C ou fraîches sur un milieu de culture solide YPD contenant de l'antibiotique Zeocin sont utilisées afin d'inoculer

un tube de pré-culture contenant 10 mL de milieu de culture BMGY (dont la composition se retrouve dans la littérature<sup>150</sup>). Ceci est fait pour des cellules ayant été transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  ou avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A. Les tubes sont laissés sous agitation dans l'incubateur à 30 °C pour la nuit. Par la suite, les cellules sont centrifugées dans des tubes stériles à 2000 rpm durant 5 minutes en utilisant un rotor GS-3.8 d'une centrifugeuse Beckman GS-6R à la température de la pièce. Par la suite, le surnageant est éliminé et le culot, contenant les levures, est resuspendu dans un milieu de culture BMMY (1 % méthanol) afin d'obtenir une densité optique à 600 nm de 1,0 (donnant environ 40 mL de milieu de culture) à 30 °C. Du méthanol (1 %) est ajouté à chaque 24 heures afin de maintenir l'induction. Des échantillons de 1 mL sont prélevés à différents temps sur une période allant jusqu'à environ 90 heures. Chaque échantillon est centrifugé à 14000 rpm durant 3 minutes dans une micro-centrifugeuse à la température de la pièce. Le surnageant et le culot sont congelés séparément à -80 °C jusqu'au moment d'effectuer les analyses.

*Tests d'activité et de concentration* : Les tests d'activité sont effectués tel qu'indiqué dans la littérature<sup>13</sup> en utilisant le substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et le substrat accepteur glycylglycine. Les tests de concentration sont faits selon la méthode de Bradford<sup>175</sup>. Les surnageants sont étudiés tel quel, sans autre modification. Les culots sont resuspendus dans environ 100  $\mu$ L du tampon de lyse (50 mM phosphate de sodium, pH 7,4, 5 % glycérol, 300 mM NaCl) contenant des inhibiteurs de protéases. Ces inhibiteurs sont le PMSF (solution-mère de 17,5 mg/mL préparée dans l'éthanol, concentration finale dans le tampon de 87,5  $\mu$ g/mL), l'aprotinine (solution-mère de 1 mg/mL dans l'eau, concentration finale de 5  $\mu$ g/mL) et de pepstatine (solution-mère de 0,85 mg/mL dans l'éthanol, concentration finale de 5  $\mu$ g/mL). Par la suite, un volume équivalent de billes de verre lavées à l'acide est ajouté au culot resuspendu. Le tout est vortexé durant 30 secondes, puis placé sur la glace durant 30 secondes. Ce cycle est répété sept fois. Les tests sont effectués avec cette solution, aucune centrifugation n'est effectuée afin de séparer les membranes de la solution. L'activité spécifique est calculée en unité par mg de protéine, une unité

correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour voir la libération de 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitroaniline par minute à 37 °C en présence de 20 mM de glycylglycine.

#### 6.3.2.5 Optimisation des conditions d'expression de la GGT

*Optimisation de l'expression* : Le protocole suivi pour optimiser les conditions d'expression de la GGT est le même qu'à la section 6.3.2.4. Cependant, dans le cas de l'effet du pH, le tampon 100 mM phosphate de potassium pH 6,0 généralement utilisé présent dans les milieux de culture BMGY et BMMY est remplacé par 100 mM phosphate de potassium pH 7,0 ou pH 8,0. Pour le pH 8,0, le tampon 60 mM Tris-HCl pH 8,2 a également été testé. Dans le cas de l'effet du méthanol, le pourcentage initial présent dans le milieu de culture BMMY a été modifié (de 1 % à 3 %) et ce pourcentage a été maintenu par l'ajout d'un volume de méthanol à chaque 24 heures. Pour l'effet de la densité optique de départ, les levures présentes dans le milieu de culture BMGY sont centrifugées, puis resuspendues dans le milieu de culture BMMY à la densité optique désirée à 600 nm. Pour l'effet de la présence des « casamino acids », une solution de 0,2 g/mL de ceux-ci est faite dans l'eau, stérilisée sur des filtres 0,22  $\mu\text{m}$ , puis congelée à -20 °C à l'abri de la lumière. Un volume de cette solution est ajouté au milieu de culture BMMY afin que les « casamino acids » soient présents à une concentration de 1 %.

*Gel d'électrophorèse de protéines* : Les échantillons de surnageant ont été concentrés selon le protocole suivant. Un volume d'acide trichloroacétique (TCA) est ajouté à quatre volumes de l'échantillon à concentrer. Typiquement, des volumes de 400  $\mu\text{L}$  de surnageant ont été mélangés à 100  $\mu\text{L}$  de TCA dans un tube eppendorf. Ensuite, le mélange est incubé à 4 °C durant 10 minutes. Une centrifugation à 14000 rpm durant 5 minutes à 4 °C est effectuée dans une micro-centrifugeuse. Le surnageant est enlevé, puis le culot est lavé avec 200  $\mu\text{L}$  d'acétone préalablement placée à -20 °C. Une centrifugation à 14000 rpm durant 5 minutes à 4 °C est faite à nouveau. Le surnageant est enlevé, puis le lavage à l'acétone est refait. Le culot est séché à 95 °C durant 5-10 minutes. Par la suite, le culot est resuspendu dans 20  $\mu\text{L}$  de solution de chargement (fait à partir de bleu de bromophénol et de dithiothréitol<sup>153</sup>).

Du tampon de chargement plus concentré (6X à la place de 1X) est ajouté, puis le culot est dénaturé à 95 °C durant 10 minutes. Ces échantillons sont placés sur les gels d'électrophorèse.

Les gels d'électrophorèse sont réalisés selon un protocole décrit dans la littérature<sup>153</sup>. Le gel de séparation de protéine (« running gel ») possède une concentration de 12 % en acrylamide et le gel de concentration des protéines (« stacking gel »), une concentration de 4 %. Les échantillons (environ 20 µL) et un marqueur de poids moléculaire sont placés sur le gel. La migration est effectuée à 80 V lorsque les protéines sont dans le gel de concentration, puis à 120 V lorsque les protéines se retrouvent dans le gel de séparation. Par la suite, les gels sont révélés grâce à du sulfate de zinc et de l'imidazole<sup>162</sup>. Une solution d'imidazole-SDS est préparée grâce à 0,680 g d'imidazole et un mL de SDS 10 % dans un volume total de 50 mL d'eau déionisée. Le gel d'électrophorèse de protéine est placé en contact avec cette solution durant environ sept minutes sous agitation, puis le gel est rincé rapidement deux fois avec de l'eau déionisée. Ensuite, il est placé en contact avec une solution de 0,2 M sulfate de zinc et le tout est agité jusqu'à ce que les bandes de protéines soient bien visibles. Le gel est par la suite rincé à l'eau déionisée trois fois.

*Immunobuvardage* : Le protocole suivi se trouve dans la littérature<sup>184</sup>. Le gel d'électrophorèse de protéines est placé dans une solution de transfert (formée de tampon Tris base, de glycine et de méthanol). Une membrane de nitrocellulose et des papiers absorbants sont également placés dans cette solution. Par la suite, sur l'électrode de l'appareil de transfert Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, sont placés, dans l'ordre, quatre papiers absorbants, la membrane de nitrocellulose, le gel d'électrophorèse et quatre autres papiers absorbants en s'assurant de l'absence de bulles d'air. Le tout est laissé dans l'appareil pour le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose durant environ 1h-1h30 à 15 V. Par la suite, la membrane de nitrocellulose est placée dans une solution de blocage faite à base de lait écrémé en poudre et de tampon PBS durant la nuit.

Une série de lavages doit maintenant être effectuée afin de révéler la protéine d'intérêt. Pour commencer, deux lavages de 15 minutes de la membrane de nitrocellulose avec 100 mL de tampon PBS 1X sont effectués sous agitation constante. Par la suite, la membrane est placée en contact avec une solution de 10 mL de l'anticorps primaire (anticorps contre l'épitope *c-myc* monoclonal de souris, la description complète se retrouve dans la section 6.3.1) durant une heure. La solution d'anticorps est ensuite récupérée, puis trois lavages successifs de 15 minutes de la membrane sont effectués avec une solution de 100 mL PBS 1X/0,3 % Tween 20. La solution de l'anticorps secondaire (anticorps contre l'anticorps de souris et lié à la peroxydase de raifort) est mise sur la membrane de nitrocellulose durant 30 minutes sous agitation. Par la suite, une succession de cinq lavages de 15 minutes avec 100 mL de PBS 1X/0,3 % Tween 20 sont faits. La membrane est placée en contact avec une solution de substrat chimioluminescent (Lumi-Light) pour la peroxydase de raifort durant 5 minutes. Par la suite, la membrane est placée dans une pellicule moulante, puis placée dans un boîtier d'exposition. Dans une chambre noire, un film est placé sur la membrane, puis une exposition du film est faite durant 2 minutes. Le film est par la suite développé.

#### 6.3.2.6 Purification de la GGT humaine recombinante

*Purification directe de la GGT sans concentration préalable* : Un volume de 1,0 mL de la matrice de la colonne Ni-NTA est placé dans un tube eppendorf, puis centrifugé à 3000 rpm dans une micro-centrifugeuse à 4 °C durant une minute. Par la suite, le surnageant est enlevé, puis la colonne est resuspendue dans un volume de 800 µL de tampon de lavage (0,1 M tampon phosphate de potassium pH 8,0). La centrifugation est faite à nouveau. La resuspension de la colonne est faite deux autres fois. Au dernier lavage, la matrice est placée dans une petite colonne de plastique pour être déposée dans le fond. Par la suite, lorsqu'il ne reste plus de tampon de lavage à l'extérieur de la colonne, l'échantillon de protéines (provenant de l'induction de levures transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  à pH 7,0 avec 1 % de méthanol et une densité optique initiale de 1,0 (environ 30 mL)) est placé sur la

colonne. Un débit d'environ 1 mL par minute est observé. Le milieu non fixé à la colonne est recueilli, puis des lavages avec des solutions de tampon de lavage contenant 5, 10 et 20 mM d'imidazole sont effectués. Par la suite, l'élution est effectuée avec un tampon d'élution (0,1 M phosphate de potassium pH 7,4) contenant 250 mM d'imidazole. Des échantillons sont recueillis à chaque étape puis sont analysés par des tests d'activité et de concentration. Les mêmes expériences sont effectuées après avoir ajusté le pH du milieu de culture à 8,0.

*Purification avec concentration par de l'acétone* : Des levures transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  puis induites à pH 7,0 dans du milieu de culture BMMY avec 1 % de méthanol et une densité optique initiale de 1,0 et 1 % de « casamino acids » (environ 40 mL) sont placées dans un incubateur à 30 °C durant 100 heures. Après centrifugation, le surnageant est conservé. Tous les contenants à utiliser sont préalablement placés à 4 °C. Le volume d'acétone à ajouter est calculé selon l'équation (1) suivante<sup>159</sup> :

$$Volume = \frac{1000(y - x)}{100 - y} \quad (1)$$

où x est le pourcentage initial d'acétone et y, le pourcentage final désiré pour un volume initial d'un litre de milieu de culture. Ainsi, dans le cas présent, un volume de 10 mL doit être ajouté. Celui-ci est ajouté goutte à goutte assez lentement au milieu de culture placé dans un bécher dans la chambre froide afin de ne pas trop élever la température de l'échantillon. Par la suite, le tout est laissé sous agitation à 4 °C durant 15 minutes. Le milieu de culture est placé dans des tubes de centrifugation pré-refroidis puis le tout est centrifugé à 8000 g durant 15 minutes à 4 °C dans une centrifugeuse Sorvall RC 5C avec un rotor Sorvall SS-34. Ensuite, le surnageant est mis de côté et le culot est séché à la température de la pièce sous la hotte durant 4 minutes. Avec l'équation (1), un volume de 16,2 mL d'acétone est ajouté au surnageant de la même manière que précédemment. Le culot final est resuspendu dans du tampon de lavage décrit précédemment.

La colonne de Ni-NTA est conditionnée de la même manière que précédemment. Cependant, la matrice est mise avec le culot resuspendu et le tout est laissé sous agitation assez lente à 4 °C durant 30 minutes. Ensuite, le tout est versé dans une colonne en plastique permettant à la matrice de se déposer dans le fond. Les autres étapes sont similaires à celles décrites précédemment pour l'élution. Les échantillons ont été analysés pour leur activité et leur concentration en protéine. Le gel d'électrophorèse et l'immunobuvardage ont été effectués de la même manière qu'à la section 6.3.2.5, mais les échantillons de protéine n'ont pas été concentrés.

*Purification avec concentration par du sulfate d'ammonium :* Des levures transformées avec le plasmide pPICZ $\alpha$ A-hGGT $\Delta$  puis induites à pH 7,0 dans du milieu de culture BMMY avec 1 % de méthanol et une densité optique initiale de 15,0 et 1 % de « casamino acids » (environ 40 mL) sont placées dans un incubateur à 30 °C durant 90 heures. Du méthanol est ajouté à chaque 24 heures afin de conserver le même pourcentage durant l'induction. Après centrifugation du milieu de culture, le surnageant est conservé. La masse de sulfate d'ammonium à ajouter au milieu de culture a été calculée selon des formules préalablement établies<sup>159</sup>. Pour 40 mL de milieu de culture, une masse de 14,44 g de sulfate d'ammonium a été ajoutée lentement à la température de la pièce pour un pourcentage de saturation de 60 %. Par la suite, le tout est laissé sous agitation durant une heure. Une centrifugation est faite à 12000 rpm (avec un rotor Sorvall SS-34) durant une heure à 4 °C avec une centrifugeuse Sorvall RC 5C. Par la suite, le surnageant est utilisé et une masse de 9,56 g de sulfate d'ammonium est ajoutée lentement sous agitation pour un pourcentage de saturation de 95 %. Les mêmes étapes sont ensuite répétées au niveau de la centrifugation. Le culot est alors récupéré et resuspendu dans un volume d'environ 2 mL de tampon de lavage. Le tout est agité en présence de la matrice de Ni-NTA. La chromatographie d'affinité et les tests sont effectués de la même manière que dans le cas de la concentration par acétone.

### 6.3.2.7 Caractérisation de la GGT humaine recombinante

*Déglycosylation* : Deux échantillons de 50  $\mu\text{L}$  de GGT humaine recombinante purifiée sont dénaturés en les mélangeant à 2,5  $\mu\text{L}$  d'une solution de SDS 10 % (concentration finale de 0,5 %) et de 0,5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoéthanol (concentration finale de 1 %). Le tout est bouilli à 100 °C durant 10 minutes, puis est laissé pour refroidir. Le premier échantillon est placé en présence de 7  $\mu\text{L}$  d'un tampon de réaction G7 (50 mM phosphate de sodium à pH 7,5), de 7  $\mu\text{L}$  du détergent NP-40, de 1  $\mu\text{L}$  de glycosidase F (500 000 U/mL, ce qui correspond à l'ajout de 500 U) et le tout est complété à 70  $\mu\text{L}$  avec de l'eau déionisée. Le deuxième échantillon, quant à lui, est mélangé aux mêmes composantes, mais en absence de glycosidase F. Le tout est laissé sous incubation à 37 °C pour la nuit. Ensuite, ce volume, pour les deux échantillons, est précipité grâce à de l'acide trichloroacétique, tel que décrit à la section 6.3.2.5. Un gel d'électrophorèse et un immunobuvardage sont effectués selon le protocole trouvé dans la même section.

*Stabilité thermique* : Un échantillon d'environ 100  $\mu\text{L}$  de GGT de rein de rat avec une concentration finale de 0,0034 mg/mL dans de l'eau a été préparé dans un tube eppendorf. Un échantillon du même volume pour la GGT humaine recombinante purifiée avec une concentration finale de 0,008 mg/mL est également préparé. Ceux-ci sont placés à 25 °C durant au moins 7 à 10 minutes, puis un aliquot est prélevé afin de faire un test d'activité. Par la suite, la température est montée à 30 °C et le même délai est attendu afin de s'assurer que l'enzyme soit bien équilibrée à cette température. Un test d'activité est fait. Ces manipulations sont répétées pour une gamme de température de 25 à 65 °C.

*Constantes cinétiques* : Une série de cuvettes est préparée avec différentes concentrations du substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide (100 à 3500  $\mu\text{M}$  à partir d'une solution-mère de 5 mM), une concentration saturante de 20 mM du substrat accepteur glycylglycine (à partir d'une solution-mère de 0,1 M) et le tout est complété à un volume de 1,0 mL avec du tampon 0,1 M Tris-HCl pH 8,0. Un

volume correspondant à environ 8 milliunités d'activité de GGT humaine recombinante est ajouté pour démarrer la réaction. Une cuvette témoin contenant du tampon à la place de l'enzyme est également préparée. L'absorbance de la *p*-nitroaniline libérée du substrat donneur est suivie à 410 nm avec un spectrophotomètre UV-Vis sur une période de 10 minutes. Les pentes obtenues à chaque concentration de substrat donneur sont divisées par le coefficient d'extinction molaire ( $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), puis un graphique de type Michaelis-Menten, correspondant à la formule  $v = \frac{V_{MAX} * [S]}{K_M + [S]}$  où  $v$  est la vitesse initiale,  $V_{MAX}$  est la vitesse maximale de la réaction enzymatique,  $[S]$  est la concentration du substrat donneur et  $K_M$ , la constante de Michaelis, est effectué. La valeur de  $V_{MAX}$  est ensuite transformée en valeur de  $k_{cat}^{norm}$  selon les équations décrites à la section 6.2.2.3.

Les manipulations sont les mêmes pour la détermination des constantes cinétiques du substrat accepteur glycyglycine. Cependant, dans ce cas-ci, une concentration saturante de 1 mM du substrat donneur L- $\gamma$ -glutamyl-*p*-nitroanilide et des concentrations variables de glycyglycine (entre 0,5 et 20 mM) sont utilisées. Le traitement mathématique est le même que dans le cas précédent.

## Références

- <sup>1</sup> Wolfenden, R., Ridgway, C. et Young, G. « Spontaneous Hydrolysis of Ionized Phosphate Monoesters and Diesters and the Proficiencies of Phosphatases and Phosphodiesterases as Catalysts » *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 833-834.
- <sup>2</sup> Benkovic, S.J. et Hammes-Schiffer, S. « A Perspective on Enzyme Catalysis » *Science* **2003**, *301*, 1196-1202.
- <sup>3</sup> Voet, D. et Voet, J.G. « Biochemistry » John Wiley and Sons Inc., New York, 2<sup>e</sup> édition, **1995**, 1361 pages.
- <sup>4</sup> Suzuki, H., Kumagai, H., et Tochikura, T. «  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12 : Purification and Properties » *J. Bacteriol.* **1986**, *168* (3), 1325-1331.
- <sup>5</sup> Takahashi, H., Hirose, K. et Watanabe, H. « Necessity of Meningococcal  $\gamma$ -Glutamyl Aminopeptidase for *Neisseria meningitidis* Growth in Rat Cerebrospinal Fluid (CSF) and CSF-Like Medium » *J. Bacteriol.* **2004**, *186* (1), 244-247.
- <sup>6</sup> Mehdi, K., Thierie, J. et Penninckx, M.J. «  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Role in the Vacuolar Transport and Metabolism of Glutathione » *Biochem. J.* **2001**, *359*, 631-637.
- <sup>7</sup> Kasai, T. et Larsen, P.O. « Chemistry and Biochemistry of  $\gamma$ -Glutamyl Derivatives from Plants Including Mushrooms (Basidiomycetes) » *Proc. Chem. Org. Nat. Prod.* **1980**, *29*, 173-285.
- <sup>8</sup> Martin, M.N. et Slovin, J.P. « Purified  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidases from Tomato Exhibit High Affinity for Glutathione and Glutathione S-Conjugates » *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 1417-1426.
- <sup>9</sup> Taniguchi, N. et Ikeda, Y. «  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase: Catalytic Mechanism and Gene Expression » *Adv. Enz. Rel. Areas Mol. Biol.* **1998**, *72*, 239-278.
- <sup>10</sup> Lherbet, C. « Synthèse et études cinétiques de substrats analogues et d'inhibiteurs de l'étape d'acylation de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase » *Thèse U. de Montréal*, **2004**, 275 pages.
- <sup>11</sup> Tate, S.S. et Ross, M.E. « Human Kidney  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase. Catalytic Properties, Subunit Structure, and Localization of the  $\gamma$ -Glutamyl Binding Site on the Light Subunit » *J. Biol. Chem.* **1977**, *252* (17), 6042-6045.

- 
- <sup>12</sup> Hashimoto, W., Suzuki, H., Nohara, S. et Kumagai, H. « *Escherichia coli*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase Mutants Deficient in Processing to Subunits » *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1992**, *189* (1), 173-178.
- <sup>13</sup> Tate, S.S. et Meister, A. «  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase from Kidney » *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 400-419.
- <sup>14</sup> Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. et Meister, A. « Expression of an Active Glycosylated Human  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Mutant that Lacks a Membrane Anchor Domain » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 126-130.
- <sup>15</sup> Suzuki, H., Kumagai, H. et Tochikura, T. «  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12 : Formation and Localization » *J. Bacteriol.* **1986**, *168* (3), 1332-1335.
- <sup>16</sup> Takahashi, H. et Watanabe, H. « Post-translational Processing of *Neisseria meningitidis*  $\gamma$ -Glutamyl Aminopeptidase and its Association with Inner Membrane Facing to the Cytoplasmic Space » *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *234*, 27-35.
- <sup>17</sup> Jaspers, C.J. et Penninckx, M.J. « Glutathione Metabolism in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase is a Vacuolar Enzyme » *Biochimie* **1984**, *66*, 71-74.
- <sup>18</sup> Horiuchi, S., Inoue, M. et Morino, Y. «  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase: Sidedness of Its Active Site on Renal Brush-Border Membrane » *Eur. J. Biochem.* **1978**, *87*, 429-437.
- <sup>19</sup> Tate, S.S., Ross, L.L. et Meister, A. « The  $\gamma$ -Glutamyl Cycle in the Choroid Plexus: Its Possible Function in Amino Acid Transport » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, *70* (5), 1447-1449.
- <sup>20</sup> Tate, S.S. et Meister, A. «  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase: Catalytic, Structural and Functional Aspects » *Mol. Cell. Biochem.* **1981**, *39*, 357-368.
- <sup>21</sup> Meister, A., Tate, S.S. et Griffith, O.W. «  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *Methods Enzymol.* **1981**, *77*, 237-253.
- <sup>22</sup> Meister, A. « On the Antioxidant Effects of Ascorbic Acid and Glutathione » *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1905-1915.
- <sup>23</sup> Meister, A. « On the Enzymology of Amino Acid Transport » *Science* **1973**, *180*, 33-39.
- <sup>24</sup> Meister, A. « The  $\gamma$ -Glutamyl Cycle. Diseases Associated with Specific Enzyme Deficiencies » *Ann. Int. Med.* **1974**, *81*, 247-253.

- <sup>25</sup> Anderson, M.E., Allison, R.D. et Meister, A. « Interconversion of Leukotrienes Catalyzed by Purified  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase: Concomitant Formation of Leukotriene D<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Glutamyl Amino Acids » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 1088-1091.
- <sup>26</sup> Misicka, A., Maszczyńska, I., Lipkowski, A.W., Stropova, D., Yamamura, H.I. et Hruby, V.J. « Synthesis and Biological Properties of Gamma-Glutamyl-Dermorphin, a Prodrug » *Life Sci.* **1996**, 58 (11), 905-911.
- <sup>27</sup> Antczak, C., Bauvois, B., Monneret, C. et Florent, J.C. « A New Acivicin Prodrug Designed for Tumor-Targeted Delivery » *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2843-2848.
- <sup>28</sup> Magnan, S.D.J., Shirota, F.N. et Nagasawa, H.T. « Drug Latentiation by  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 1018-1021.
- <sup>29</sup> Nemesánszky, E. et Lott, J.A. « Gamma-Glutamyltransferase and Its Isoenzymes: Progress and Problems » *Clin. Chem.* **1985**, 31 (6), 797-803.
- <sup>30</sup> Suzuki, H., Kajimoto, Y. et Kumagai, H. « Improvement of the Bitter Taste of Amino Acids through the Transpeptidation Reaction of Bacterial  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase » *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 313-318.
- <sup>31</sup> Kumagai, H., Echigo, T., Suzuki, H. et Tochikura, T. « Synthesis of  $\gamma$ -glutamyl-DOPA from L-glutamine and L-DOPA by  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12. » *Agric. Biol. Chem.* **1988**, 52, 1741-1745.
- <sup>32</sup> Goswin, A.K., Meister, A., O'Dwyer, P.J., Huang, C.S., Hamilton, T.C. et Anderson, M.E. « High Resistance to Cisplatin in Human Ovarian Cancer Cell Lines is Associated with Marked Increase of Glutathione Synthesis » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3070-3074.
- <sup>33</sup> Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Jenner, P. et Marsden, C.D. « Glutathione-related Enzymes in Brain in Parkinson's Disease » *Ann. Neurol.* **1994**, 36, 356-361.
- <sup>34</sup> Djavaheri-Mergny, M., Accaoui, M.-J., Rouillard, D. et Wietzerbin, J. «  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Activity Mediates NF- $\kappa$ B Activation Through Lipid Peroxidation in Human Leukemia U937 Cells » *Mol. Cell. Biochem.* **2002**, 232, 103-111.
- <sup>35</sup> Del Bello, B., Paolicchi, A., Comporti, M., Pompella, A. et Maellaro, E. « Hydrogen Peroxide Produced During  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Activity is Involved in Prevention of Apoptosis and Maintenance of Proliferation in U937 Cells » *FASEB J.* **1999**, 13, 69-79.

- <sup>36</sup> Lee, D.-H., Jacobs, Jr. D.R., Gross, M., Kiefe, C.I., Roseman, J., Lewis, C.E. et Steffes, M. «  $\gamma$ -Glutamyltransferase Is a Predictor of Incident Diabetes and Hypertension: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study » *Clin. Chem.* **2003**, *49* (8), 1358-1366.
- <sup>37</sup> Drozd, R., Parmentier, C., Hachad, H., Leroy, P., Siest, G. et Wellman, M. «  $\gamma$ -Glutamyltransferase Dependent Generation of Reactive Oxygen Species from a Glutathione/Transferrin System » *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, *25* (7), 786-792.
- <sup>38</sup> Zacharski, L.R., Ornstein, D.L., Woloshin, S. et Schwartz, L.M. « Association of Age, Sex, and Race with Body Iron Stores in Adults: Analysis of NHANES III data » *Am. Heart J.* **2000**, *140*, 98-104.
- <sup>39</sup> Owen, A.D., Schapira, A.H., Jenner, P. et Marsden, C.D. « Indices of Oxidative Stress in Parkinson's Disease, Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies » *J. Neural. Transm. Suppl.* **1997**, *51*, 167-173.
- <sup>40</sup> Fernandez-Real, J.-M., Ricart-Engel, W., Arroyo, E., Balanca, R., Casamitjana-Abella, R., Cabrero, D., Fernandez-Castaner, M. et Soler, J. « Serum Ferritin as a Component of the Insulin Resistance Syndrome » *Diabetes Care* **1998**, *21* (1), 62-68.
- <sup>41</sup> Sullivan, J.L. « Iron and the Sex Difference in Heart Disease Risk » *Lancet* **1981**, *1* (8233), 1293-1294.
- <sup>42</sup> Huang, X. « Iron Overload and its Association with Cancer Risk in Humans: Evidence for Iron as a Carcinogenic Metal » *Mutat. Res.* **2003**, *533* (1-2), 153-171.
- <sup>43</sup> Allison, R.D. «  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase : Kinetics and Mechanism » *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 419-437.
- <sup>44</sup> Thompson, G.A. et Meister, A. « Hydrolysis and Transfer Reactions Catalyzed by  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase; Evidence for Separate Substrate Sites and for High Affinity of L-Cystine » *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1976**, *71* (1), 32-36.
- <sup>45</sup> McIntyre, T.M. et Curthoys, N.P. « Comparison of the Hydrolytic and Transfer Activities of Rat Renal  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase » *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (14), 6499-6504.
- <sup>46</sup> Allison, R.D. et Meister, A. « Evidence That Transpeptidation Is a Significant Function of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *J. Biol. Chem.* **1981**, *256* (6), 2988-2992.
- <sup>47</sup> Elce, J.S. « Active-Site Amino Acid Residues in  $\gamma$ -Glutamyltransferase and the Nature of the  $\gamma$ -Glutamyl-Enzyme Bond » *Biochem. J.* **1980**, *185*, 473-481.

- 
- <sup>48</sup> Gololobov, M.Y. et Bateman, Jr., R.C. «  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase-Catalysed Acyl-transfer to the Added Acceptor Does not Proceed Via the Ping-Pong Mechanism » *Biochem. J.* **1994**, *304*, 869-876.
- <sup>49</sup> Fersht, A. « Enzyme Structure and Mechanism » W.H. Freeman and company, New York, 2<sup>e</sup> edition, 1985, 475 pages.
- <sup>50</sup> Tate, S.S. « Interaction of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase with S-Acyl Derivatives of Glutathione » *FEBS Lett.* **1975**, *54* (3), 319-322.
- <sup>51</sup> Rivard, C. « Études cinétiques par HPLC de l'étape d'acylation de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase purifiée des reins de rats à l'aide de substrats analogues » *Mémoire U. de Montréal* **2003**, 86 pages.
- <sup>52</sup> Orłowski, M. et Meister, A. «  $\gamma$ -Glutamyl-*p*-nitroanilide: A New Convenient Substrate for Determination and Study of L- and D- $\gamma$ -glutamyltranspeptidase Activities » *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *73*, 679-681.
- <sup>53</sup> Laursen, T. et Jacyszyn, K. « Fluorimetric Determination of the Electrophoretic Heterogeneity of  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase » *Clin. Chim. Acta*, **1968**, *21*, 497-499.
- <sup>54</sup> Thompson, G.A. et Meister, A. « Interrelationships between the Binding Sites for Amino Acids, Dipeptides, and  $\gamma$ -Glutamyl Donors in  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *J. Biol. Chem.* **1977**, *252* (19), 6792-6798.
- <sup>55</sup> Orłowski, M. et Meister, A. « Isolation of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase from Hog Kidney » *J. Biol. Chem.* **1965**, *240* (1), 338-347.
- <sup>56</sup> Griffith, O.W. et Meister, A. « Selective Inhibition of  $\gamma$ -Glutamyl-Cycle Enzymes by Substrate Analogs » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74* (8), 3330-3334.
- <sup>57</sup> Castonguay, R., Lherbet, C. et Keillor, J.W. « Mapping of the Active Site of Rat Kidney  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase using Activated Esters and Their Amide Derivatives » *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 4185-4191.
- <sup>58</sup> Lherbet, C., Morin, M., Castonguay, R. et Keillor, J.W. « Synthesis of Aza and Oxaglutamyl-*p*-nitroanilide Derivatives and Their Kinetic Studies with  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase » *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 997-1000.
- <sup>59</sup> Kumagai, H., Nohara, S., Suzuki, H., Hashimoto, W., Yamamoto, K., Sakai, H., Sakabe, K., Fukuyama, K. et Sakabe, N. « Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase from *Escherichia coli* K-12 » *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 1259-1262.

- <sup>60</sup> Sakai, H., Sakabe, N., Sasaki, K., Hashimoto, W., Suzuki, H., Tachi, H., Kumagai, H. et Sakabe, K. « A Preliminary Description of the Crystal Structure of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase from *E. coli* K-12. » *J. Biochem.* **1996**, *120*, 26-28.
- <sup>61</sup> Thompson, G.A. et Meister, A. « Modulation of the Hydrolysis, Transfer, and Glutaminase Activities of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase by Maleate Bound at the Cysteinylglycine Binding Site of the Enzyme » *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (8), 2956-2960.
- <sup>62</sup> Stole, E. et Meister, A. « Interaction of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase with Glutathione Involves Specific Arginine and Lysine Residues of the Heavy Subunit » *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (27), 17850-17857.
- <sup>63</sup> Ikeda, Y., Fujii, J. et Taniguchi, N. « Significance of Arg-107 and Glu-108 in the Catalytic Mechanism of Human  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase. Identification by Site-Directed Mutagenesis » *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (6), 3980-3985.
- <sup>64</sup> Smith, T.K. et Meister, A. « Chemical Modification of Active Site Residues in  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (21), 12476-12480.
- <sup>65</sup> Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. et Meister, A. « Human  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Mutants Involving Conserved Aspartate Residues and the Unique Cysteine Residue of the Light Subunit » *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (21), 12471-12475.
- <sup>66</sup> Tate, S.S. et Meister, A. « Affinity Labeling of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase and Location of the  $\gamma$ -Glutamyl Binding Site on the Light Subunit » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74* (3), 931-935.
- <sup>67</sup> Kozak, E.M. et Tate, S.S. « Interaction of the Antitumor Drug, L-( $\alpha$ S,5S)- $\alpha$ -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (AT-125) with Renal Brush Border Membranes. Specific Labeling of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *FEBS Lett.* **1980**, *122* (2), 175-178.
- <sup>68</sup> Stole, E., Seddon, A.P., Wellner, D. et Meister, A. « Identification of a Highly Reactive Threonine Residue at the Active Site of Gamma-Glutamyl Transpeptidase » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87* (5), 1706-1709.
- <sup>69</sup> Tate, S.S. et Meister, A. « Serine-Borate Complex as a Transition-State Inhibitor of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75* (10), 4806-4809.
- <sup>70</sup> Stein, R.L., DeCicco, C., Nelson, D. et Thomas, B. « Slow-Binding Inhibition of Gamma-Glutamyl Transpeptidase by Gamma-boroGlu » *Biochemistry* **2001**, *40* (19), 5804-5811.

- <sup>71</sup> Inoue, M., Horiuchi, S. et Morino, Y. « Inactivation of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase by Phenylmethanesulfonyl Fluoride, a Specific Inactivator of Serine Enzymes » *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1978**, 82 (4), 1183-1188.
- <sup>72</sup> Smith, T.K., Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. et Meister, A. « Different Sites of Acivicin Binding and Inactivation of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidases » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 2360-2364.
- <sup>73</sup> Ikeda, Y., Fujii, J., Anderson, M.E., Taniguchi, N. et Meister, A. « Involvement of Ser-451 and Ser-452 in the Catalysis of Human Gamma-Glutamyl Transpeptidase » *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (38), 22223-22228.
- <sup>74</sup> Inoue, M., Hiratake, J., Suzuki, H., Kumagai, H. et Sakata, K. « Identification of Catalytic Nucleophile of *Escherichia coli* Gamma-Glutamyltranspeptidase by Gamma-Monofluorophosphono Derivative of Glutamic Acid: *N*-Terminal Thr-391 in Small Subunit is the Nucleophile » *Biochemistry* **2000**, 39 (26), 7764-7771.
- <sup>75</sup> Lee, Y.S., Kim, H.W. et Park, S.S. « The Role of  $\alpha$ -Amino Group of the *N*-terminal Serine of  $\beta$ -Subunit for Enzyme Catalysis and Autoproteolytic Activation of Glutaryl 7-Aminocephalosporanic Acid Acylase » *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (50), 39200-39206.
- <sup>76</sup> Du, W. et Risley, J.M. « Acylation is Rate-Limiting in Glycosylasparaginase-Catalyzed Hydrolysis of *N*<sup>4</sup>-(4'-Substituted Phenyl)-L-asparagines » *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1900-1905.
- <sup>77</sup> Suresh, C.G., Pundle, A.V., SivaRaman, H., Rao, K.N., Brannigan, J.A., McVey, C.E., Verma, C.S., Dauter, Z., Dodson, E.J. et Dodson, G.G. « Penicillin V Acylase Crystal Structure Reveals New Ntn-Hydrolase Family Members » *Nature Struct. Biol.* **1999**, 6 (5), 414-416.
- <sup>78</sup> Yoon, J., Oh, B., Kim, K., Park, J., Han, D., Kim, K.K., Cha, S.-S., Lee, D. et Kim, Y. « A Bound Water Molecule Is Crucial in Initiating Autocatalytic Precursor Activation in an *N*-terminal Hydrolase » *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (1), 341-347.
- <sup>79</sup> Oinonen, C. et Rouvinen, J. « Structural Comparison of Ntn-hydrolases » *Protein Sci.* **2000**, 9, 2329-2337.
- <sup>80</sup> Dodson, G. et Wlodawer, A. « Catalytic Triads and Their Relatives » *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 347-352.
- <sup>81</sup> Suzuki, H. et Kumagai, H. « Autocatalytic Processing of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase » *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (45), 43536-43543.

- 
- <sup>82</sup> Ikeda, Y., Fujii, J. et Taniguchi, N. « Effects of Substitutions of the Conserved Histidine Residues in Human  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *J. Biochem.* **1996**, *119*, 1166-1170.
- <sup>83</sup> Ménard, A., Castonguay, R., Lherbet, C., Rivard, C., Roupioz, Y. et Keillor, J.W. « Nonlinear Free Energy Relationship in the General-Acid-Catalyzed Acylation of Rat Kidney  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase by A Series of  $\gamma$ -Glutamyl Anilide Substrate Analogues » *Biochemistry* **2001**, *40*, 12678-12685.
- <sup>84</sup> Gardell, S.J. et Tate, S.S. « Latent Proteinase Activity of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Light Subunit » *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (12), 4942-4945.
- <sup>85</sup> Gardell, S.J. et Tate, S.S. « Subunit Interactions in  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase. Reconstitution of the Active Species from Isolated Subunits » *J. Biol. Chem.* **1981**, *256* (10), 4799-4804.
- <sup>86</sup> Pelmont, J. « Enzymes », Presses Universitaires de Grenoble, Grenoble, **1989**, 605 pages.
- <sup>87</sup> Elce, J.S. et Broxmeyer, B. «  $\gamma$ -Glutamyltransferase of Rat Kidney. Simultaneous Assay of the Hydrolysis and Transfer Reactions with [Glutamate-<sup>14</sup>C]Glutathione » *Biochem. J.* **1976**, *153*, 223-232.
- <sup>88</sup> Tate, S.S. et Meister, A. « Stimulation of the Hydrolysis Activity and Decrease of the Transpeptidase Activity of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase by Maleate; Identity of a Rat Kidney Maleate-Stimulated Glutaminase and  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, *71* (9), 3329-3333.
- <sup>89</sup> Elce, J.S. « Active-Site Amino Acid Residues in  $\gamma$ -Glutamyltransferase and the Nature of the  $\gamma$ -Glutamyl-Enzyme Bond » *Biochem. J.* **1980**, *185*, 473-481.
- <sup>90</sup> Lowry, T.H. et Richardson, K.S. « Mechanism and Theory in Organic Chemistry », Harper et Row, New York, **1987**, p. 143-159.
- <sup>91</sup> Jencks, W.P. « Structure-Reactivity Correlations and General Acid-Base Catalysis in Enzymic Transacylation Reactions » *Cold Spring Harbor Symp. Quantum Biol.* **1971**, *36*, 1-11.
- <sup>92</sup> Funderburk, L.H., Aldwin, L. et Jencks, W.P. « Mechanisms of General Acid and Base Catalysis of the Reactions of Water and Alcohols with Formaldehyde » *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5444-5459.
- <sup>93</sup> Ménard, A. « Études cinétiques de l'étape d'acylation de la  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase des reins de rats à l'aide des dérivés  $\gamma$ -glutamylanilides-*p*-substitués » *Mémoire U. de Montréal*, 1999, 68 pages.

- 
- <sup>94</sup> Hartley, B.S. et Kilby, B.A. « The Reaction of *p*-Nitrophenyl Esters with Chymotrypsin and Insulin » *Biochem. J.* **1954**, *56*, 288-297.
- <sup>95</sup> Keillor, J.W. et Jencks, W.P. « Phosphorylation of the Sodium-Potassium Adenosinetriphosphatase Proceeds Through a Rate-Limiting Conformational Change Followed by Rapid Phosphoryl Transfer » *Biochemistry* **1996**, *35*, 2750-2753.
- <sup>96</sup> Livre d'instruction « KinTek Corporation Chemical-Quench-Flow Model RQF-3 », KinTek.
- <sup>97</sup> Gibson, Q.H. « Apparatus for the Study of Rapid Reactions » *J. Physiol.* **1952**, *117*, 49P-50P.
- <sup>98</sup> Livre d'instruction « SX.18MV Stopped-Flow Reaction Analyser », Applied Photophysics.
- <sup>99</sup> Keillor, J.W., Ménard, A., Castonguay, R., Lherbet, C. et Rivard, C. « Pre-steady-state Kinetic Studies of Rat Kidney  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Confirm its Ping-pong Mechanism » *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, *17*, 529-536.
- <sup>100</sup> Aeschlimann, D. et Paulsson, M. « Transglutaminases: Protein Cross-linking Enzymes in Tissues and Body Fluids » *Thromb. Haemost.* **1994**, *71* (4), 402-415.
- <sup>101</sup> Jensen, P.H., Sorensen, E.S., Petersen, T.E., Gliemann, J. et Rasmussen, L.K. « Residues in the Synuclein Consensus Motif of the Alpha-Synuclein Fragment, NAC, Participate in Transglutaminase-Catalysed Cross-linking to Alzheimer-Disease Amyloid Beta A4 Peptide » *Biochem. J.* **1995**, *310*, 91-94.
- <sup>102</sup> Molberg, O., McAdam, S.N., Korner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., Fugger, L., Scott, H., Noren, O., Roepstorff, P., Lundin, K.E.A., Sjostrom, H. et Sollid, L.M. « Tissue Transglutaminase Selectively Modifies Gliadin Peptides that are Recognized by Gut-Derived T Cells in Celiac Disease » *Nat. Med.* **1998**, *4* (6), 713-717.
- <sup>103</sup> Cook, N.D. et Peters, T.J. « The Effect of pH on the Transpeptidation and Hydrolytic Reactions of Rat Kidney  $\gamma$ -Glutamyltransferase » *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *832*, 142-147.
- <sup>104</sup> Cook, N.D. et Peters, T.J. « Purification of  $\gamma$ -Glutamyltransferase by Phenyl Boronate Affinity Chromatography. Studies on the Acceptor Specificity of Transpeptidation by Rat Kidney  $\gamma$ -Glutamyltransferase » *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *828*, 205-212.
- <sup>105</sup> Perrin, D.D. « *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solutions* » Butterworth, London, 1965.

- <sup>106</sup> « *CRC Handbook of Chemistry and Physics* », Lide, D.R. éd., CRC Press, New York, 83<sup>e</sup> édition, **2002**.
- <sup>107</sup> <http://www2.latech.edu/~hji/org252/01mar07new/01mar07new.htm>
- <sup>108</sup> Ege, S. « *Organic Chemistry, Structure and Reactivity* », Houghton Mifflin Company, Boston, 4<sup>e</sup> édition, **1999**, 1148 pages.
- <sup>109</sup> Hupe, D.J. et Jencks, W.P. « Nonlinear Structure-Reactivity Correlations. Acyl Transfer between Sulfur and Oxygen Nucleophiles » *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (2), 451-464.
- <sup>110</sup> March, J. « *Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms and Structure* » **1992**, 4<sup>e</sup> édition, John Wiley and Sons, New York, p. 349.
- <sup>111</sup> Dean, J.A. « *Lange's Handbook of Chemistry* » McGraw-Hill, New York, 15<sup>e</sup> édition, **1999**.
- <sup>112</sup> Josse, O., Labar, D., Georges, B., Grégoire, V. et Marchand-Brynaert, J. « Synthesis of [<sup>18</sup>F]-Labeled EF3 [2-(2-Nitroimidazol-1-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)-acetamide], a Marker for PET Detection of Hypoxia » *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 665-675.
- <sup>113</sup> Gagnon, P., Huang, X., Therrien, É. et Keillor, J.W. « Peptide Coupling of Unprotected Amino Acids Through *in situ* *p*-Nitrophenyl Ester Formation » *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7717-7719.
- <sup>114</sup> Leblanc, A., Gravel, C., Labelle, J. et Keillor, J.W. « Kinetic Studies of Guinea Pig Liver Transglutaminase Reveal a General-Base-Catalyzed Deacylation Mechanism » *Biochemistry* **2001**, *40*, 8335-8342.
- <sup>115</sup> Glasoe, P.K. et Long, F.A. « Use of Glass Electrodes to Measure Acidities in Deuterium Oxide » *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 188-190.
- <sup>116</sup> Bender, M.L. et Hamilton, G.A. « Kinetic Isotope Effects of Deuterium Oxide on Several  $\alpha$ -Chymotrypsin-Catalyzed Reactions » *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2570-2576.
- <sup>117</sup> Salih, E. « Catalysis by Acetylcholinesterase in Two-Hydronic-Reactive States: Integrity of Deuterium Oxide Effects and Hydron Inventories » *Biochem. J.* **1992**, *285*, 451-460.
- <sup>118</sup> Jencks, W.P. « *Catalysis in Chemistry and Enzymology* » **1969**, McGraw-Hill, New York, p. 243-281.

- <sup>119</sup> Melander, L. et Saunders, W.H. Jr. « *Reaction Rates of Isotopic Molecules* » **1980**, Wiley-Interscience, New York, p. 202-224.
- <sup>120</sup> Schowen, R.L. « Mechanistic Deductions from Solvent Isotope Effects » *Prog. Phys. Org. Chem.* **1972**, *9*, 275-332.
- <sup>121</sup> Tate, S.S. et Meister, A. « Interaction of Gamma-Glutamyl Transpeptidase with Amino Acids, Dipeptides, and Derivatives and Analogs of Glutathione » *J. Biol. Chem.* **1974**, *249* (23), 7593-7602.
- <sup>122</sup> Case, A. et Stein, R.L. « Kinetic Analysis of the Action of Tissue Transglutaminase on Peptide and Protein Substrates » *Biochemistry* **2003**, *42*, 9466-9481.
- <sup>123</sup> Zeeberg, B. et Caplow, M. « Transition State Charge Distribution in Reactions of an Acetyltyrosylchymotrypsin Intermediate » *J. Biol. Chem.* **1973**, *248* (16), 5887-5891.
- <sup>124</sup> Inward, P.W. et Jencks, W.P. « The Reactivity of Nucleophilic Reagents with Furoyl-Chymotrypsin » *J. Biol. Chem.* **1965**, *240* (5), 1986-1996.
- <sup>125</sup> Jencks, W.P. et Gilchrist, M. « Nonlinear Structure-Reactivity Correlations. The Reactivity of Nucleophilic Reagents toward Esters » *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (10), 2622-2637.
- <sup>126</sup> Schellenberger, V., Schellenberger, U., Mitin, Y.V. et Jakubke, H.-D. « Characterization of the S'-Subsite Specificity of Bovine Pancreatic  $\alpha$ -Chymotrypsin via Acyl Transfer to Added Nucleophiles » *Eur. J. Biochem.* **1990**, *187*, 163-167.
- <sup>127</sup> Castonguay, R., Lherbet, C. et Keillor, J.W. « Kinetic Studies of Rat Kidney  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Deacylation Reveal a General Base-Catalyzed Mechanism » *Biochemistry* **2003**, *42*, 11504-11513.
- <sup>128</sup> Malathi, P., Preiser, H., Fairclough, P., Mallett, P. et Crane, R.K. « A Rapid Method for the Isolation of Kidney Brush Border Membranes » *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *554*, 259-263.
- <sup>129</sup> Heinle, H., Wendel, A. et Schmidt, U. « The Activities of the Key Enzymes of the  $\gamma$ -Glutamyl Cycle in Microdissected Segments of the Rat Nephron » *FEBS Lett.* **1977**, *73* (2), 220-224.
- <sup>130</sup> Ikeda, Y., Fujii, J., Taniguchi, N. et Meister, A. « Expression of an Active Glycosylated Human  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase Mutant that Lacks a Membrane Anchor Domain » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 126-130.

- 
- <sup>131</sup> Hughey, R.P. et Curthoys, N.P. « Comparison of the Size and Physical Properties of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase Purified from Rat Kidney Following Solubilization with Papain or with Triton X-100 » *J. Biol. Chem.* **1976**, 251 (24), 7863-7870.
- <sup>132</sup> Kumar, C., Sharma, R. et Bachhawat, A.K. « Investigations into the Polymorphisms at the ECM38 Locus of Two Widely Used *Saccharomyces cerevisiae* S288C Strains, YPH499 and BY4742 » *Yeast* **2003**, 20, 857-863.
- <sup>133</sup> Gillet, S.M.F.G., Chica, R.A., Keillor, J.W. et Pelletier, J.N. « Expression and Rapid Purification of Highly Active Hexahistidine-tagged Guinea Pig Liver Transglutaminase » *Prot. Exp. Purif.* **2004**, 33, 256-264.
- <sup>134</sup> Suzuki, H., Kumagai, H. et Tochikura, T. « Isolation, Genetic Mapping, and Characterization of *Escherichia coli* K-12 Mutants Lacking  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase » *J. Bacteriol.* **1987**, 169 (9), 3926-3931.
- <sup>135</sup> Chevalier, C., Thiberge, J.-M., Ferrero, R.L. et Labigne, A. « Essential Role of *Helicobacter pylori*  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase for the Colonization of the Gastric Mucosa of Mice » *Mol. Microbiol.* **1999**, 31 (5), 1359-1372.
- <sup>136</sup> Angele, C., Wellman, M., Thioudellet, C., Guellaen, G. et Siest, G. « Expression of Rat Renal Gamma-Glutamyltransferase cDNA in *Escherichia coli* » *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, 160 (3), 1040-1046.
- <sup>137</sup> Angele, C., Oster, T., Visvikis, A., Michels, J.-M., Wellman, M. et Siest, G. « Different Constructs for the Expression of Mammalian  $\gamma$ -Glutamyltransferase cDNAs in *Escherichia coli* and in *Saccharomyces cerevisiae* » *Clin. Chem.* **1991**, 37 (5), 662-666.
- <sup>138</sup> Visvikis, A., Thioudellet, C., Oster, T., Fournel-Gigleux, S., Wellman, M. et Siest, G. « High-level Expression of Enzymatically Active Mature Human  $\gamma$ -Glutamyl Transferase in Transgenic V79 Chinese Hamster Cells » *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7361-7365.
- <sup>139</sup> Thioudellet, C., Oster, T., Wellman, M. et Siest, G. « Molecular and Functional Characterization of Recombinant Human  $\gamma$ -Glutamyltransferase; Coupling of its Activity to Glutathione Levels in V79 Cells » *Eur. J. Biochem.* **1994**, 222, 1009-1016.
- <sup>140</sup> Sastre, J., Siegrist, S., Bulle, F., Asensi, M., Baik, J.-H., Pawlak, A. et Guellaen, G. « High-Level Expression of Functional Human  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase using the Baculovirus System » *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, 38 (4), 801-811.

- <sup>141</sup> Suzuki, H., Kumagai, H., Echigo, T. et Tochikura, T. « Molecular Cloning of *Escherichia coli* K-12 *ggt* and Rapid Isolation of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase » *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1988**, 150 (1), 33-38.
- <sup>142</sup> Hashimoto, W., Suzuki, H., Yamamoto, K. et Kumagai, H. « Effect of Site-Directed Mutations on Processing and Activity of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase of *Escherichia coli* K-12 » *J. Biochem.* **1995**, 118, 75-80.
- <sup>143</sup> Kresze, G.B. et Ronft, H. « Pyruvate Dehydrogenase Complex from Baker's Yeast. 1. Purification and Some Kinetic and Regulatory Properties » *Eur. J. Biochem.* **1981**, 119, 573-579.
- <sup>144</sup> Gunji, H., Kochi, H. et Hiraiwa, K. « Comparison of Kinetic Property Between Human Seminal and Renal  $\gamma$ -Glutamyltransferase » *Fukushima J. Med. Sci.* **1994**, 40 (2), 119-132.
- <sup>145</sup> Oster, T., Visvikis, A., Schiele, F., Wellman-Rousseau, M. et Siest, G. « Gene Transfer Technologies for the Production of Enzyme and Protein Reference Materials » *Clin. Chim. Acta* **1997**, 257, 3-23.
- <sup>146</sup> Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y. et Maniatis, T. « Identification of DNA Sequences Required for Transcription of the Human Alpha 1-Globin Gene in a New SV40 Host-Vector System » *Cell* **1981**, 27 (2), 279-288.
- <sup>147</sup> Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. et Struhl, K. « *Current Protocols in Molecular Biology* » John Wiley & Sons, New York, **1997**, 16.9.1-16.11.12.
- <sup>148</sup> Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. et Madden, K.R. « *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations » *Mol. Cell. Biol.* **1985**, 5 (12), 3376-3385.
- <sup>149</sup> Higgins, D.R. et Cregg, J.M. « *Methods in Molecular Biology : Pichia Protocols* » Humana Press Inc., Totowa, Vol. 103, **1998**, 261 pages.
- <sup>150</sup> Livre d'instruction de la compagnie Invitrogen « *Pichia Expression Kit : Protein Expression* », version F.
- <sup>151</sup> Livre d'instruction de la compagnie Invitrogen « *Instruction Manual pPICZ $\alpha$ A, B, and C* », version E.
- <sup>152</sup> Sakamuro, D., Yamazoe, M., Matsuda, Y., Kangawa, K., Taniguchi, N., Matsuo, H., Yoshikawa, H. et Ogasawara, N. « The Primary Structure of Human Gamma-Glutamyl Transpeptidase » *Gene* **1988**, 73, 1-9.

- 
- <sup>153</sup> Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. « *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* » Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2<sup>e</sup> édition, **1989**, p. 9.8-9.49, 14.1-14.33.
- <sup>154</sup> Ninkovic, M., Dietrich, R., Aral, G. et Schwienhorst, A. « High-fidelity *in vitro* Recombination Using a Proofreading Polymerase » *Biotechniques* **2001**, 30 (3), 530-536.
- <sup>155</sup> Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. et Madden, K.R. « *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations » *Mol. Cell. Biol.* **1985**, 5 (12), 3376-3385.
- <sup>156</sup> Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K. et Romanos, M.A. « High-Level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of the Gene » *Bio/Technology* **1991**, 9, 455-460.
- <sup>157</sup> Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. et Woods, R.A. « Studies on the Transformation of Intact Yeast Cells by the LiAC/SS-DNA/PEG Procedure » *Yeast* **1995**, 11, 355-360.
- <sup>158</sup> Catalogue de la compagnie Invitrogen, **2002**.
- <sup>159</sup> Scopes, R.K. « Protein Purification; Principles and Practice », Springer-Verlag, New York, 2<sup>e</sup> édition, **1987**, 329 pages.
- <sup>160</sup> Saelens, X., Vanlandschoot, P., Martinet, W., Maras, M., Neiryck, S., Contreras, R., Fiers, W. et Min Jou, W. « Protection of Mice Against a Lethal Influenza Virus Challenge after Immunization with Yeast-Derived Secreted Influenza Virus Hemagglutinin » *Eur. J. Biochem.* **1999**, 260, 166-175.
- <sup>161</sup> [http://formedium.com/Europe/media\\_components.htm#Casamino%20Acids](http://formedium.com/Europe/media_components.htm#Casamino%20Acids)
- <sup>162</sup> Fernandez-Patron, C., Hardy, E., Sosa, A., Seoane, J. et Castellanos, L. « Double Staining of Coomassie Blue-Stained Polyacrylamide Gels by Imidazole-Sodium Dodecyl Sulfate-Zinc Reverse Staining: Sensitive Detection of Coomassie Blue-Undetected Proteins » *Anal. Biochem.* **1995**, 224, 263-269.
- <sup>163</sup> Ruitenbergh, K.M., Gilkerson, J.R., Wellington, J.E., Love, D.N. et Whalley, J.M. « Equine Herpesvirus 1 Glycoprotein D Expressed in *Pichia pastoris* is Hyperglycosylated and Elicits a Protective Immune Response in the Mouse Model of EHV-1 Disease » *Virus Res.* **2001**, 79, 125-135.
- <sup>164</sup> Livre d'instruction de la compagnie QIAGEN, « The QIAexpressionist », 4<sup>e</sup> édition, **2000**.

- 
- <sup>165</sup> Trimble, R.B., Lubowski, C., Hauer III, C.R., Stack, R., McNaughton, L., Gemmill, T.R. et Kumar, S.A. « Characterization of *N*- and *O*-Linked Glycosylation of Recombinant Human Bile Salt-Stimulated Lipase Secreted by *Pichia pastoris* » *Glycobiology* **2004**, *14* (3), 265-274.
- <sup>166</sup> Huseby, N.E. « Purification and Some Properties of  $\gamma$ -Glutamyltransferase from Human Liver » *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *483* (1), 46-56.
- <sup>167</sup> Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P. et Stillman, C.A. « Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris* » *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9* (3), 1316-1323.
- <sup>168</sup> Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. et Grinna, L. « High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris* » *Bio/Technology* **1987**, *5*, 1305-1308.
- <sup>169</sup> Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K. et Henwood, C.A. « Production of Mouse Epidermal Growth Factor in Yeast: High-Level Secretion using *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Gene Copies » *Gene* **1991**, *105*, 205-212.
- <sup>170</sup> Hohenblum, H., Gasser, B., Maurer, M., Borth, N. et Mattanovich, D. « Effects of Gene Dosage, Promoters, and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant *Pichia pastoris* » *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *85* (4), 367-375.
- <sup>171</sup> Kaufman, R.J. « Stress Signaling from the Lumen of the Endoplasmic Reticulum: Coordination of Gene Transcriptional and Translational Controls » *Genes Dev.* **1999**, *13* (10), 1211-1233.
- <sup>172</sup> Yamashita, K., Hitoi, A., Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunuma, N. et Kobata, A. « Structural Studies of the Carbohydrate Moieties of Rat Kidney  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase. An Extremely Heterogeneous Pattern Enriched with Nonreducing Terminal *N*-Acetylglucosamine Residues » *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (2), 1098-1107.
- <sup>173</sup> Yamashita, K., Tachibana, Y., Hitoi, A., Matsuda, Y., Tsuji, A., Katunuma, N. et Kobata, A. « Difference in the Sugar Chains of Two Subunits and of Isozymic Forms of Rat Kidney  $\gamma$ -Gluamyltranspeptidase » *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *227* (1), 225-232.
- <sup>174</sup> Blochberger, T.C., Sabatine, J.M., Lee, Y.C. et Hughey, R.P. « *O*-Linked Glycosylation of Rat Renal  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase Adjacent to Its Membrane Anchor Domain » *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (34), 20718-20722.
- <sup>175</sup> Livre de référence de BioRad « BioRad Protein Assay ».

- 
- <sup>176</sup> Livre de référence de Mettler Toledo « Reference Handbook Mettler Toledo DL53 ».
- <sup>177</sup> Pozdnev, V.F. « Activation of Carboxylic Acids by Pyrocarbonates. Application of Di-tert-butyl Pyrocarbonate as Condensing Reagent in the Synthesis of Amides of Protected Amino Acids and Peptides » *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36 (39), 7115-7118.
- <sup>178</sup> Compagnie Reckitt & Colmann Prod. « Tetrapeptides and Pentapeptides » *Brevet numéro GB1513768*, **1978**.
- <sup>179</sup> Masahiko, N., Naoki, M., Hisashi, K., Toshihiro, A., Kiyoshi, K. et Masami, S. (compagnie Kowa) « Methylmethioninesulfonium Compounds, Process for their Preparation, and Pharmaceutical Compositions Containing Them » *Brevet numéro DE2821704*, **1978**.
- <sup>180</sup> Livre de référence de QIAGEN « Instructions for QIAEX II Gel Extraction Kit ».
- <sup>181</sup> Pamphlet de référence de Fermentas « Gene Ruler DNA Ladder Mix ».
- <sup>182</sup> [http://michnick.bcm.umontreal.ca/protocols/ligation\\_calculator\\_en.php](http://michnick.bcm.umontreal.ca/protocols/ligation_calculator_en.php)
- <sup>183</sup> Sadiev, S. et Taylor, A. « Alternative Method for Isolation of Double-Stranded Template for DNA Sequencing » *Biotechniques* **1996**, 21 (2), 233-235.
- <sup>184</sup> Livre de référence de BioRad « Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Instruction Manual ».

