

Université de Montréal

Utilisation d'analogues hétéroatomiques de la glutamine dans
l'étude mécanistique de la Transglutaminase

par

Christian Gravel

Département de chimie

Faculté des Arts et Sciences

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

Novembre 2005

© Christian Gravel, 2005



QD

3

U54

2006

V.009

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 :

Utilisation d'analogues hétéroatomiques de la glutamine dans
l'étude mécanistique de la Transglutaminase

Présentée par :
Christian Gravel

À été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Joelle Pelletier (Présidente du jury et représentante du doyen de la faculté)

Pr. Jeffrey W. Keillor (Directeur de recherche)

Pr. Robert Lortie

Pr. René Roy (Examineur Externe)

Thèse acceptée le :

1^o/03/06

Sommaire

La transglutaminase tissulaire est une enzyme dépendante de Ca^{2+} qui catalyse le transfert d'un groupement glutamyle d'un donneur d'acyle, la glutamine, à un accepteur d'acyle, généralement une lysine. Ce couplage forme un nouveau lien ϵ -(γ -glutamyl)lysine et constitue un mode de réticulation des protéines critique dans divers processus physiologiques. Devant l'implication de cette enzyme dans un éventail de maladies, on peut rester surpris du manque d'information concernant son mécanisme d'action. Le but visé par certains membres du groupe Keillor est donc de mieux comprendre le fonctionnement des différentes étapes mécanistiques de l'action de la transglutaminase (Chapitre 1).

Un besoin pressant d'établir certaines relations structure-réactivité a récemment poussé notre groupe à faire varier certains aspects du substrat synthétique généralement utilisé, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine. Ces modifications incluent une substitution du méthylène γ de la glutamine par des hétéroatomes (O et S) de même que l'ajout d'un groupe partant chromophore, le *p*-nitrophényl. Lors d'études de l'étape d'acylation (Chapitre 2) et de l'étape de désacylation (Chapitre 3), ces analogues ont démontré des effets inhibiteurs intéressants. De plus, la substitution du groupement amide de la glutamine par un équivalent chiral de cette dernière fonction, le sulfoxyde, a également montré une inhibition d'un nouveau genre pour la transglutaminase (Chapitre 4).

Finalement, le développement d'une méthode de suivi cinétique par calorimétrie (chapitre 5) et la cristallisation de l'enzyme ont été tentés. Bien qu'un cristal protéique n'ait pas encore été obtenu, les travaux préliminaires sont rapportés dans cet ouvrage (Chapitre 6).

Mots clés : Enzymes, Transglutaminase, Acylation, Désacylation, Sulfoxyde, Calorimétrie, Cristallisation, Mécanisme.

Summary

Tissue transglutaminase is a Ca^{2+} -dependent enzyme that catalyzes the glutamyl transfer from an acyl donor, glutamine, to an acyl acceptor, typically a lysine. This coupling creates a new ϵ -(γ -glutamyl)lysine bond that crosslinks proteins and is critical to many physiological processes. Because of the wide array of diseases implicating transglutaminase, it is surprising to see the lack of fundamental knowledge regarding its mechanism of action. The goal of the Keillor group is to improve the understanding of the various steps of this mechanism (Chapter 1).

A pressing need for better structure-reactivity relationships recently incited us to modify various aspects of the typically used synthetic substrate for transglutaminase, N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine. These modifications include the substitution of the glutamine γ methylene by heteroatoms (O and S) as well as the incorporation of a colored leaving group, *p*-nitrophenol. During acylation and deacylation studies (Chapter 2 and 3), these analogues demonstrated interesting inhibitory effects. In addition, the substitution of the amide moiety of glutamine by a chiral equivalent of that function, the sulfoxide group, also showed a brand new type of inhibition for transglutaminase (Chapter 4).

Finally, the development of a kinetic method using calorimetry (chapter 5) as well as a protein crystallization project were attempted. Even though protein crystals have not been obtained yet, preliminary results are shown in this work (Chapter 6).

Key words : Enzymes, Transglutaminase, Acylation, Deacylation, Sulfoxide, Calorimetry, Crystallization, Mechanism.

Table des matières

	Page
Sommaire	iii
Summary	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	xiv
Remerciements	xv
Chapitre 1 - Introduction	1
L'histoire de l'enzymologie	1
L'étude des Transglutaminases	2
Les transglutaminases en tant que famille	3
TGase kératinocyte	3
TGase tissulaire	3
TGase épidermale	3
TGase plasmatique	4
TGase prostatique	4
EP4.2	4
La transglutaminase tissulaire	4
Structure	5
Rôles physiologiques	6
Implications pathologiques	7
Mécanisme	9
Substrats	12
La transglutaminase du foie de cobaye	13
Pertinence	13
Objectif et méthode	14
Sources de TGase : Expression et purification	14
Cristallisation	16
Études mécanistiques	17
Développement d'une méthode cinétique par ITC	19
Chimie biomédicale	21
Bibliographie	26
Chapitre 2 - Études d'acylation	30
Introduction	30
Structure des agents acylants et substrats analogues	33
Synthèse des substrats analogues	35
Principes de fonctionnement de l'appareil « Stopped-Flow »	39
Résultats des études de cinétique chimique	41
Résultats des études de cinétique enzymatique	43
Cinétique d'hydrolyse enzymatique de la N-Cbz-O-(<i>p</i> NP)-L-glutamylglycine	44
Cinétique d'hydrolyse enzymatique de la N-Cbz-O-(<i>p</i> NP)-L-sérinylglycine	47
Cinétique d'hydrolyse enzymatique de la N-Cbz-S-(<i>p</i> NP)-L-cystéinylglycine	51
Mode d'inactivation	55

Spectrométrie de masse	57
Travaux futurs	60
Partie expérimentale	61
Synthèse du carbonate d'éthyle et de <i>p</i> -nitrophényle	61
Synthèse du N-éthylcarbamate de <i>p</i> -nitrophényle	62
Synthèse du S-éthylcarbamate de <i>p</i> -nitrophényle	63
Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-L-sérine	64
Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-sérinylglycinate de <i>tert</i> -butyle	65
Synthèse du N-Cbz-O-(<i>p</i> -nitrophényl)-L-sérinylglycinate de <i>tert</i> -butyle	66
Synthèse de la N-Cbz-O-(<i>p</i> -nitrophényl)-L-sérinylglycine	67
Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-L-cystine	68
Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-cystinylglycinate de <i>tert</i> -butyle	69
Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-cystéinylglycinate de <i>tert</i> -butyle	70
Synthèse du N-Cbz-S-(<i>p</i> -nitrophényl)-L-cystéinylglycinate de <i>tert</i> -butyle	71
Synthèse de la N-Cbz-S-(<i>p</i> -nitrophényl)-L-cystéinylglycine	72
Synthèse de l'acide N-benzyloxycarbonyl-L-glutamique	73
Synthèse de l'anhydride N-benzyloxycarbonyl-L-glutamique	74
Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-glutamylglycinate de <i>tert</i> -butyle	75
Synthèse du N-Cbz-O-(<i>p</i> -nitrophényl)-L-glutamylglycinate de <i>tert</i> -butyle	76
Synthèse du N-Cbz-O-(<i>p</i> -nitrophényl)-L-glutamylglycine	77
 Bibliographie	 78
 Chapitre 3 - Étude de désacylation	 80
Introduction	80
La désacylation comme étape limitante	80
Hypothèses	82
Résultats	84
Effet isotopique	93
Conclusion	94
Bibliographie	95
 Chapitre 4 - Sulfoxides et Sulfone	 97
Introduction	97
Nouveaux inhibiteurs envisagés	99
La sulfone de méthionine	99
Les sulfoxydes de méthionine	100
Type d'inhibition	102
Détermination du K_i	107
Détermination du $k_{inactivation}$	108
Effets distincts des deux diastéréoisomères	112
Mécanisme d'inactivation	114
Conclusion et travaux futurs	117
Partie expérimentale	118
Synthèse du sulfoxyde de L-méthionine	118
Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine	119
Séparation des diastéréoisomères	120
Synthèse de la (RS _S)-N-benzyloxycarbonyl-S-oxo-L-méthionine (voie 1)	121
Synthèse de la (RS _S)-N-benzyloxycarbonyl-S-oxo-L-méthionine (voie 2)	122
Synthèse de la sulfone de N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine	123

Bibliographie	124
Chapitre 5 - Titration calorimétrique isotherme (ITC)	125
Introduction	125
Principes	129
Limitations	131
Allure attendue de la courbe	133
Réaction contrôlée	134
Essais avec la transglutaminase	139
Conclusion et applications futures	145
Bibliographie	148
Chapitre 6 – Cristallisation de la TGase	149
Introduction	149
Historique	149
Théorie, principes et méthode.....	154
Étapes suivies et résultats	160
Conclusion et travaux futurs	166
Matériel	166
Bibliographie	167
Chapitre 7 - Alignement de séquences	168
Introduction	168
Résultats	173
Bibliographie	180
Chapitre 8 – Conclusions générales	181
Annexe 1 : Conditions de cristallisation	184

Liste des tableaux

	Page
Tableau 2.1 : Constantes de vitesse de thiolyse	42
Tableau 2.2 : Constantes de cinétique enzymatique d'acylation	54
Tableau 3.1 : Paramètres cinétiques de désacylation (aminolyse) à pH 7,0	87
Tableau 3.2 : Paramètres cinétiques de désacylation (aminolyse) à pH 6,0	92
Tableau 3.3 : Comparaison des paramètres cinétiques de désacylation (aminolyse) dans l'eau et le D ₂ O	93
Tableau 4.1 : Données cinétiques de quelques inhibiteurs	97
Tableau 4.2 : Comparaison des efficacités inhibitrices	110
Tableau 4.3 : Variations structurelles de l'inhibiteur sulfoxyde	111
Tableau 5.1 : Données cinétiques de l'hydrolyse du BAEE par la papaïne	138
Tableau 7.1 : Séquences utilisées pour l'alignement de séquences	169
Tableau 7.2: Légende du code de couleur utilisé dans l'alignement de séquences	169

Liste des figures

	Page
Figure 1.1 : Réaction catalysée par la transglutaminase	2
Figure 1.2 : Structure de la transglutaminase	5
Figure 1.3 : Cycle catalytique de la transglutaminase	9
Figure 1.4 : Proposition de mécanisme détaillé de la transglutaminase	11
Figure 1.5 : Libération d'un produit facile à suivre par colorimétrie	17
Figure 1.6 : Méthode de détection au GDH	18
Figure 1.7 : Méthode de détection au DMPDA	19
Figure 1.8 : Structures des inhibiteurs tirés de la littérature	21
Figure 1.9 : Structures des inhibiteurs synthétisés dans notre groupe	22
Figure 1.10 : Modifications structurales entreprises	23
Figure 1.11 : Structures de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ - <i>p</i> -nitrophényl ester)glycine, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine et la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ - <i>p</i> -nitroanilide)glycine.	24
Figure 2.1: Choix des nucléophiles utilisés lors des études d'acylation.	31
Figure 2.2: Choix des agents acylants et substrats analogues.	33
Figure 2.3: Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-O-(<i>p</i> -nitrophényl)-L-glutaminylglycine.	36
Figure 2.4: Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-O-(<i>p</i> -nitrophényloxy)carbonyl-L-sérinylglycine.	37
Figure 2.5: Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-S-(<i>p</i> -nitrophényloxy)carbonyl-L-cystéinylglycine.	38
Figure 2.6: Schéma conceptuel de l'appareil « Stopped flow ».	39
Figure 2.7: Détermination des constantes de deuxième ordre de la thiolysé des dérivés ester, thiocarbonate et carbonate par la cystéamine.	41

Figure 4.2 : Illustration de l'intermédiaire tétraédrique proposé	100
Figure 4.3 : Voies synthétiques	101
Figure 4.4 : Méthode spectrophotométrique de suivi cinétique.	102
Figure 4.5 : Hydrolyse de N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-O-(p-nitrophényl)glycine par la transglutaminase tissulaire, en présence (RS_S)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde.	103
Figure 4.6 : Types d'inhibition enzymatique et équation hyperbolique s'y rattachant.	105
Figure 4.7 : Courbe de saturation de l'hydrolyse de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-O-(p-nitrophényl)glycine par la transglutaminase tissulaire, en présence de quantités variables de (RS_S)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde.	106
Figure 4.8 : Détermination de la valeur de la constante d'affinité (K_I) de l'inhibiteur (RS_S)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde.	107
Figure 4.9 : Détermination de la valeur de la constante d'affinité (K_I) et la vitesse d'inactivation (k_{inact}) de l'inhibiteur (RS_S)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde.	109
Figure 4.10 : Structure cristalline du diastéréoisomère de sulfoxyde de L-méthionine purifié par cristallisation.	112
Figure 4.11 : Mécanisme d'action de la méthionine réductase A	114
Figure 4.12 : Proposition d'un mécanisme d'inactivation de la transglutaminase par le sulfoxyde de méthionine.	115
Figure 4.13 : Inactivation de la transglutaminase par la N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde et réactivation par le DTT.	116
Figure 5.1 : Structure de deux composés	125
Figure 5.2 : Constante de Michaelis-Menten	126
Figure 5.3 : Méthode de détection au GDH	128
Figure 5.4 : Réaction d'hydrolyse du BAEE par la papaïne	134
Figure 5.5 : Titration calorimétrique isotherme de l'hydrolyse du BAEE par la papaïne	135

Figure 5.6 : Forme intégrée de la variation calorimétrique de l'hydrolyse du BAEE par la papaïne	136
Figure 5.7 : Courbe de saturation de l'hydrolyse du BAEE par la papaïne	137
Figure 5.8 : Titration calorimétrique de l'hydrolyse de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine par la transglutaminase	140
Figure 5.9 : Titration calorimétrique de la transamidation de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine par la transglutaminase	142
Figure 5.10 : Courbe de saturation de la transamidation de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine par la transglutaminase	143
Figure 5.11 : Simulation des effets de l'inhibition par le produit et du vieillissement de l'enzyme.	144
Figure 5.12 : Réaction de transpeptidation du glutathion catalysée par la GGT	145
Figure 5.13 : Titration calorimétrique isotherme de la réaction de transpeptidation du glutathion catalysée par la GGT	146
Figure 5.14 : Courbe de saturation de la réaction de transpeptidation du glutathion catalysée par la GGT	147
Figure 6.1 : Sites de liaison proposé de divers cations	151
Figure 6.2 : Sites de liaison proposé du GMP et du calcium	152
Figure 6.3 : Stéréogramme du site actif proposé par Nogushi <i>et al.</i>	153
Figure 6.4 : La technique de la goutte suspendue.	155
Figure 6.5 : Phénomène de diffraction des rayons X.	158
Figure 6.6 : Exemples de codification qualitative des cristaux	159
Figure 6.7 : Monocristaux obtenus lors du criblage initial	160
Figure 6.8 : Cristaux obtenus suite aux premiers raffinements	161
Figure 6.9 : La technique d'ensemencement	162
Figure 6.10 : Exemple de traînée de microcristaux obtenus par ensemencement	162

Figure 6.11 : Meilleurs cristaux obtenus	163
Figure 6.12 : Inhibition irréversible de la transglutaminase	164
Figure 6.13 : Meilleurs cristaux obtenus en présence d'inhibiteur irréversible	165
Figure 7.1 : Alignement de séquences	170
Figure 7.2 : Aperçu global des séquences	173
Figure 7.3 : Nécessité du positionnement adéquat du site de liaison du deuxième substrat pour permettre la dissociation du complexe produit-enzyme	175
Figure 7.4 : Représentation tridimensionnelle de la transglutaminase	178

Liste des sigles et abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ATP	Adénosine tri-phosphate
BAEE	Benzoylarginate d'éthyle
DIEA	Diisopropyléthylamine
DMPDA	N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine
DP	Différence d'énergie potentielle (unité utilisée par le calorimètre)
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
GDH	Glutamate déshydrogénase
GTP	Guanosine tri-phosphate
IR	Infrarouge
ITC	« Isothermal titration calorimetry »
k_{cat}	Constante de vitesse catalytique
kDa	kiloDalton = 1000 g/mol
K_I	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis-Menten
mCPBA	Acide <i>mé</i> ta-chloroperoxybenzoïque
MOPS	Morpholinopropylsulfonate
NADH	Nicotinamide adénosyl dinucléotide phosphate
pf	Point de fusion
pNP	groupement <i>p</i> -nitrophényle
Rf	« Rate of flow », vitesse d'élution, en chromatographie
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate
TFA	Acide trifluoroacétique
TGase	Transglutaminase
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Xaa, Yaa	Acide aminé quelconque
Z, Cbz	Groupement benzyloxycarbonyl

Remerciements

Il est facile de rapporter des résultats, et passablement aisé de discuter de ceux-ci, mais lorsque vient le temps de parler de sentiments humains, les choses se compliquent. Mon doctorat, c'est le mien mais c'est aussi celui de ceux qui m'ont entouré, aidé, encouragé, stimulé, aimé... Je ne peux donc pas me permettre d'en oublier un seul et c'est la peur de commettre une telle bévue qui rend difficile l'écriture de ces lignes.

Tout d'abord, je me dois de remercier Jeff, un gars super et un directeur à la fois patient, flexible et compétent. Je n'aurais pu demander un style de direction plus approprié à mon style d'étude et c'est grâce à lui si le groupe de recherche est demeuré professionnel et courtois tout au long de mon passage à l'UdeM.

Merci aussi à tous les membres du groupe, passé et présent, incluant stagiaires et post-doc. Se sont les gens qui nous entourent qui rendent les journées intéressantes et se sont les discussions avec des collègues intéressés qui permettent aux idées neuves de surgir, faisant ainsi avancer la science.

Merci à ma famille pour le système de valeurs qu'ils m'ont inculqué et qui m'a permis de prendre les décisions m'ayant amené là où je suis.

Merci aux amis, passé et présents, pour leur soutien et leur camaraderie. Merci surtout à Eric, que j'en suis presque à considérer comme un frère.

Merci finalement à Julie, mon amour, pour être celle qui comble tous les aspects non professionnels de ma vie.



Chapitre 1: Introduction

L'histoire de l'enzymologie

Depuis Darwin, l'humanité s'est montrée fascinée par l'évolution et la génétique. Récemment, un large consortium de groupes de recherches a complété la cartographie de tout le génome humain et ceci a contribué à ranimer l'engouement du public pour la génétique. Voilà donc l'humanité, son génome décodé en main, regardant vers l'avenir et se demandant : et puis quoi ensuite?

Une multitude de gènes codent pour une multitude de protéines. Certaines sont structurales, d'autres, plus complexes, ont une activité catalytique et des rôles physiologiques distincts. Ces protéines, les enzymes, méritent d'être étudiées en profondeur, que ce soit simplement par souci académique, pour améliorer la connaissance avec un grand C ou par intérêt économique face aux applications médicales que de telles recherches pourraient engendrer. Notons d'ailleurs que sans les enzymes, il n'y aurait pas de vie.

Alors que les sophistes touchaient à tous les domaines du savoir de leur époque, il est maintenant nécessaire de faire les choses différemment. L'essor des sciences modernes au 18^e siècle a vu se créer une partition des domaines d'études (physique, chimie, biologique, etc.) et jusqu'à récemment, les chercheurs avaient leur place au sein d'une des divisions « classiques » de l'arbre des sciences. Aujourd'hui, les champs d'intérêt se raffinent, les sujets d'études sont de plus en plus pointus et requièrent une approche pluridisciplinaire. Une nouvelle branche des sciences, située à l'interface de la chimie physico organique et de la biochimie, a vu le jour : la chimie bio organique.

L'étude des transglutaminases

Les transglutaminases (TGase, EC 2.3.2.13) sont une famille d'enzymes dont l'action est dépendante du Ca^{2+} . Elles catalysent le transfert d'un groupement glutamyle d'un donneur d'acyle, généralement une glutamine appartenant à une protéine, à un accepteur d'acyle, généralement une lysine¹. Ce couplage formant un nouveau lien ϵ -(γ -glutamyl)lysine constitue un mode de réticulation des protéines critique dans divers processus physiologiques. Par exemple, le facteur XIIIa, une transglutaminase bien connue, permet la coagulation du sang suite à une blessure en catalysant la réticulation des molécules de fibrines, évitant ainsi l'hémorragie par formation d'un caillot sanguin.

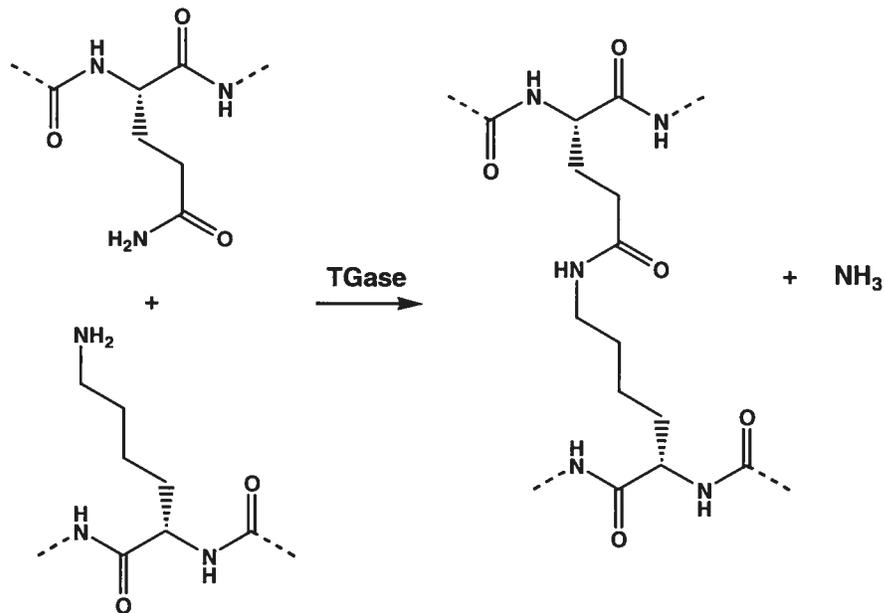


Figure 1.1: Réaction catalysée par la TGase.

Les transglutaminases en tant que famille

On retrouve dans la famille des transglutaminases quelques types différents possédant une grande homologie de séquence et une structure tertiaire très similaire. Celle-ci sera décrite plus loin. Les six TGases dont il sera discuté ici sont la TGase kératinocyte (Type I), la TGase tissulaire (Type II), la TGase épidermale (Type III), la TGase plasmatique (Facteur XIII), la TGase prostatique et la bande protéique 4,2 des érythrocytes.

TGase kératinocyte (Type I)

La TGase kératinocyte est la principale enzyme responsable de la cornification de enveloppes cellulaires des tissus des cheveux et ongles⁶. Il s'agit d'une protéine monomérique et liée à la membrane cellulaire par une ancre à base d'ester palmitique et myristique.

TGase tissulaire (Type II)

Aussi appelé TGase cytosolique, la TGase de type II est un membre unique de la famille car elle a une activité hydrolase de GTP et ATP en plus de son activité transglutaminase^{3,4}. Elle est exprimée dans tous les tissus, notamment par les cellules endothéliales et par les cellules de muscles lisses dans les veines et les artères⁵. C'est de cette enzyme qu'il sera discuté plus en détail dans cet ouvrage.

TGase épidermale (Type III)

La TGase épidermale est une enzyme monomérique responsable de la cornification des enveloppes cellulaires de l'épiderme². Elle requiert une activation par protéolyse pour pouvoir être active, tout comme la TGase plasmatique.

TGase plasmatique (Facteur XIII chez l'humain)

Le facteur XIII est de loin la mieux connue des TGases. Il s'agit d'une enzyme dimérique extracellulaire jouant un rôle important dans la cascade catalytique de coagulation sanguine, activée par la thrombine et catalysant la polymérisation des fibrinogènes¹.

TGase prostatique (Type IV)

La TGase de prostate est une autre enzyme dimérique jouant un rôle important. Elle est impliquée dans la formation du caillot post-coïtal chez le rat⁷ et est également sécrétée chez l'homme.

EP4.2

Finalement, la bande 4.2 est une protéine structurale des membranes d'érythrocyte⁸ dont la structure est très similaire aux transglutaminases mais à laquelle il manque la cystéine du site actif. La bande protéique EP4.2 n'a donc pas d'activité transglutaminase malgré une grande homologie de séquence.

La transglutaminase tissulaire

Une étude des séquences primaires des différents représentants de cette enzyme chez le cochon d'inde⁹, l'homme¹⁰, le bœuf¹¹ et le poulet¹² révèle que la TGase tissulaire est une protéine monomérique de 685 à 691 acides aminés ayant une masse moléculaire de 76 à 85 kDa. Le gène humain, composé de 13 exons et 12 introns, a été retrouvé sur le chromosome 20 (q12)^{13,14}.

Structure

Les transglutaminases ont une structure tertiaire composée d'un sandwich- β en N-terminal, d'un cœur- α/β et de deux barils- β en C-terminal¹⁵. L'activité catalytique se situe au sein du cœur- α/β . Malgré la présence de 17 cystéines et de six sites possibles de N-glycosylation, aucun pont disulfure et aucune glycosylation ne sont retrouvés dans la TGase tissulaire⁹.

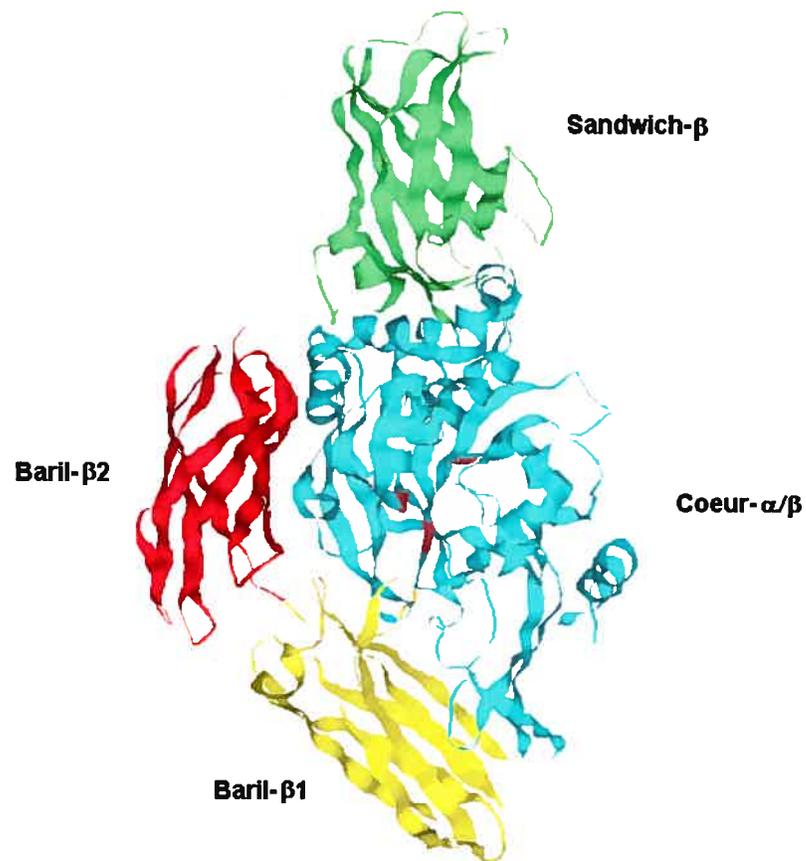


Figure 1.2: Structure de la TGase.¹⁶

Rôles physiologiques

La TGase tissulaire est impliquée dans la différenciation cellulaire¹⁷, l'endocytose médiée par des récepteurs, l'adhésion cellulaire et l'apoptose cellulaire^{18,19,20}. Dans ce dernier phénomène, la TGase tissulaire serait en partie responsable de la formation de l'enveloppe apoptotique, évitant la fuite du matériel intracellulaire, ce qui causerait une réponse inflammatoire²¹. Des études dans lesquelles le ADNc de la TGase (Type II) humaine a été introduit dans les fibroblastes Babl-C 3T3²² et L-929²³ et dans les neuroblastomes SK-N-BE(2) humain²⁴ ont montré que ces cellules avaient un taux d'apoptose spontanée accru et une plus grande susceptibilité à divers inducteurs de mort cellulaire. Ceci supporte la théorie voulant que l'expression et l'activation de la transglutaminase tissulaire soient des composantes essentielles de l'apoptose. Chez les patients atteints du VIH, une augmentation frappante de l'expression de la transglutaminase par les lymphocytes T CD4+ est accompagnée d'un taux d'apoptose proportionnel des cellules sanguines mononucléaires présentes en périphérie des cellules infectées²⁵. La transglutaminase, bien qu'exprimée dans tous les tissus, semble donc toxique puisqu'il semble y avoir une relation entre la concentration de TGase et la mort cellulaire.

La TGase tissulaire est principalement retrouvée dans le cytosol mais également dans le noyau, possiblement par transport nucléaire actif. Cette hypothèse est supportée par le fait que la TGase tissulaire interagit avec la protéine de transport importine- $\alpha 3$, impliquée dans le transport vers le noyau²⁶. L'expression de la TGase tissulaire est régulée par divers facteurs de transcription et son activité est régulée par des transformations post-traductionnelles et par des modifications de sa vitesse de catalyse²⁷. Cette dernière régulation semble s'effectuer par l'action positive de la liaison du calcium d'une part²⁸, et par la réduction de l'activité transglutaminase suite à la liaison compétitive de complexe Mg^{2+} -GTP et Mg^{2+} -ATP^{29,30,31}. Bien que la TGase tissulaire ne possède pas la séquence hydrophobe du peptide signal d'excrétion, il devient de plus en plus clair que l'enzyme existe sous une forme intracellulaire plutôt

inactive et que c'est une fois dans le milieu extracellulaire que l'activité catalytique est retrouvée³².

Un autre mode de régulation intracellulaire proposé est l'inactivation par S-nitrosylation^{33,34} de la cystéine catalytique. En effet, la présence de faibles quantités d'oxide nitrique bloque l'apoptose et favorise ainsi une mort cellulaire incontrôlée, la nécrose. Ce dernier type de mort cellulaire implique un manque de réticulation de la matrice cellulaire et indique un manque d'activité transglutaminase.

Ces modes de régulation, ainsi que l'inhibition par complexation au GTP dans le milieu intracellulaire pourraient expliquer la survie des cellules malgré un taux assez élevé de transglutaminase au niveau du cytosol.

Implications pathologiques

Lorsque la transglutaminase est trop active, on assiste parfois à l'apparition de certains désordres physiologiques tels que la thrombose et l'artériosclérose^{35,36}. En effet, un des phénomènes reliés à la formation de plaques athérosclérotiques dans l'espace extracellulaire des vaisseaux sanguins est l'apposition des lipoprotéines *a* (LPa) sur leur surfaces. Cette apposition s'effectue grâce à une grande affinité qu'ont les LPa pour les fibrinogènes et grâce à leur liaison covalente sur ces derniers, médiée par la transglutaminase. Puisque les sites de liaisons disponibles sur les fibrinogènes se retrouvent bloqués par les LPa, il y a défaillance de la fibrinolyse, ce qui crée un milieu pro-thrombogène.

La TGase semble de plus être impliquée dans la formation des cataractes dans le cristallin humain³⁷ par réticulation des β -cristallines^{38,39} ainsi que dans la formation de plaques amyloïdes au niveau du cerveau, une des causes de la maladie d'Alzheimer^{40,41}. Un des éléments supportant l'implication de la transglutaminase dans la maladie neurodégénérative qu'est la maladie d'Alzheimer est tout d'abord l'apparente

diminution de formation d'agglomérats amyloïdes en présence d'inhibiteur de transglutaminases⁴². De plus, des tests *in vitro* ont montré que la protéine tau, composante majeure des enchevêtrements neurofibrillaires présents chez les malades, semble très efficace comme substrat de la transglutaminase⁴³. Finalement, les tissus isolés dans le cortex préfrontal⁴⁴ des patients atteints et dans l'hippocampe de rats⁴⁵ atteints ont montré une forte concentration en transglutaminase tissulaire.

Une autre famille de maladies neurodégénératives dans laquelle la transglutaminase semble impliquée est celle de la maladie d'Huntington. Dans cette maladie, de même que dans l'atrophie musculaire bulbaire et dans l'atrophie dentatorubral-pallidolusienne, des répétitions de polyglutamines sont exprimées en terminus de protéines utiles. Ces répétitions confèrent à la cellule une susceptibilité accrue à l'apoptose^{46,47}. Ceci peut être dû à la formation d'agrégats suite à l'action de ces polyglutamines comme substrat donneur de la transglutaminase. En effet, l'inhibition sélective de la transglutaminase par la cystéamine et la monodansylcadaverine réduit la formation d'agrégats et d'apoptose dans des cellules exprimant ces répétitions de polyglutamine⁴⁸. Dans ces cas, la cystéamine et la monodansylcadaverine remplacent les amines qui seraient autrement incorporées, réduisant la formation d'agrégats.

Finalement, la maladie céliaque, aussi connue comme intolérance au gluten, semble être induite par l'activité de la transglutaminase chez les individus génétiquement prédisposés. Cette maladie consiste en une réaction immunitaire face à certains dérivés de protéines trouvées dans certaines céréales dont le blé. Ce sont certains fragments non-hydrolysables de certaines protéines végétales, les gliadines- α , qui causent l'inflammation. Ces protéines sont de bons substrats⁴⁹ de la transglutaminase et, en l'absence de substrat accepteur aminé, la transglutaminase utilise l'eau pour convertir les glutamines de ces protéines en acides glutamiques^{50,51}. Les fragments ainsi modifiés sont alors perçus par le système immunitaire de la victime comme étant étrangers et ceci cause une inflammation d'origine immunitaire^{52,53,54,55,56}. Un des symptômes typiques est le phénomène de la muqueuse intestinale aplatie, soit un

dérèglement causant la perte des villosités de la muqueuse proximale du petit intestin. Une méthode de diagnostic de la maladie céliaque actuellement utilisée est le dosage d'anti-transglutaminase par immunobuvardage^{57.58.59}.

Devant l'implication de cette enzyme dans un éventail de maladies, il est surprenant de constater un manque d'information concernant son mécanisme d'action. Le but visé par certains membres du groupe Keillor est donc de mieux comprendre le fonctionnement des différentes étapes mécanistiques de l'action de la TGase.

Mécanisme

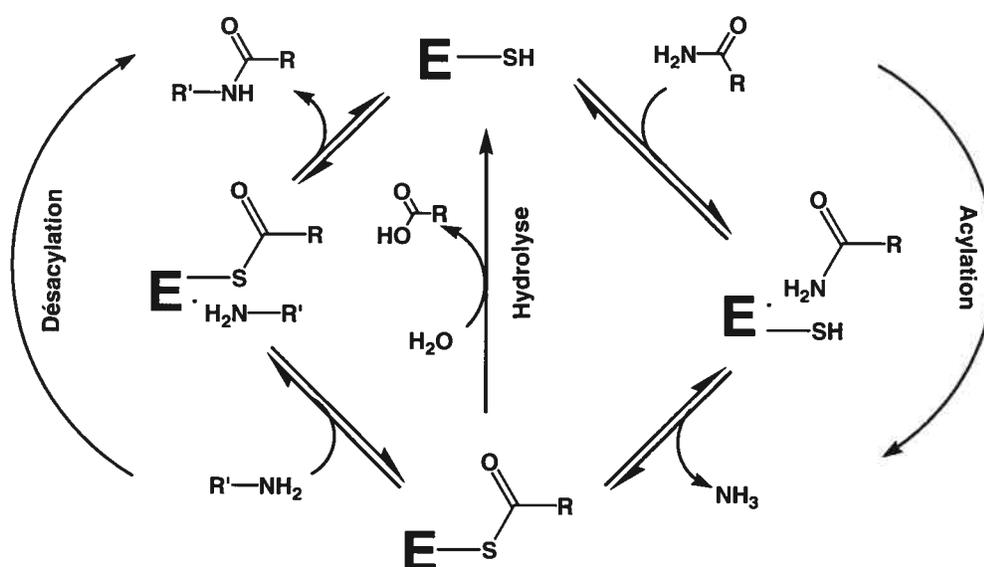


Figure1.3: Cycle catalytique de la transglutaminase

Le mécanisme d'action de la transglutaminase généralement proposé dans la littérature²⁸ et soutenu par notre groupe est un mécanisme de type ping-pong modifié. Dans ce mécanisme, un substrat donneur de groupement acyle (glutamine) se complexe d'abord réversiblement à l'enzyme pour ensuite former un intermédiaire de type acyl-enzyme. Celui-ci peut par la suite se complexer à un deuxième substrat accepteur de

groupement acyle (lysine) et réagir pour régénérer l'enzyme libre et former le nouveau lien ϵ -(γ -glutamyl)lysine. Il s'agit donc d'un mécanisme en deux étapes distinctes: l'acylation et la désacylation. L'appellation "modifié" vient du fait que la présence d'un substrat accepteur n'est pas nécessaire car l'eau présente dans le milieu peut servir à hydrolyser l'acyl-enzyme pour régénérer l'enzyme libre et former le dérivé acide du donneur d'acyle. La présence d'une histidine conservée à proximité de la cystéine catalytique laisse croire au rôle d'acide/base général de cette dernière. De même, la présence systématique d'une tyrosine à proximité de la cystéine catalytique peut être associée à une stabilisation par interactions ions-dipôles de la charge présente sur l'intermédiaire tétraédrique formé lors de l'acylation et de la désacylation. Il ne s'agit ici que d'une hypothèse développée dans notre groupe suite à des expériences de modélisation⁶⁰. Le rôle de cette tyrosine n'a en effet jamais été déterminé clairement. Finalement, l'affinité pour les substrats accepteurs en présence et en absence de substrat donneur permettent de croire en un mécanisme ordonné plutôt qu'aléatoire et il peut donc en être déduit qu'il doit y avoir un changement majeur de conformation, lors de l'acylation, permettant au deuxième substrat d'atteindre le site actif⁶¹. Toutes ces étapes et interactions, même les plus hypothétiques, sont schématisées à la figure 1.4.

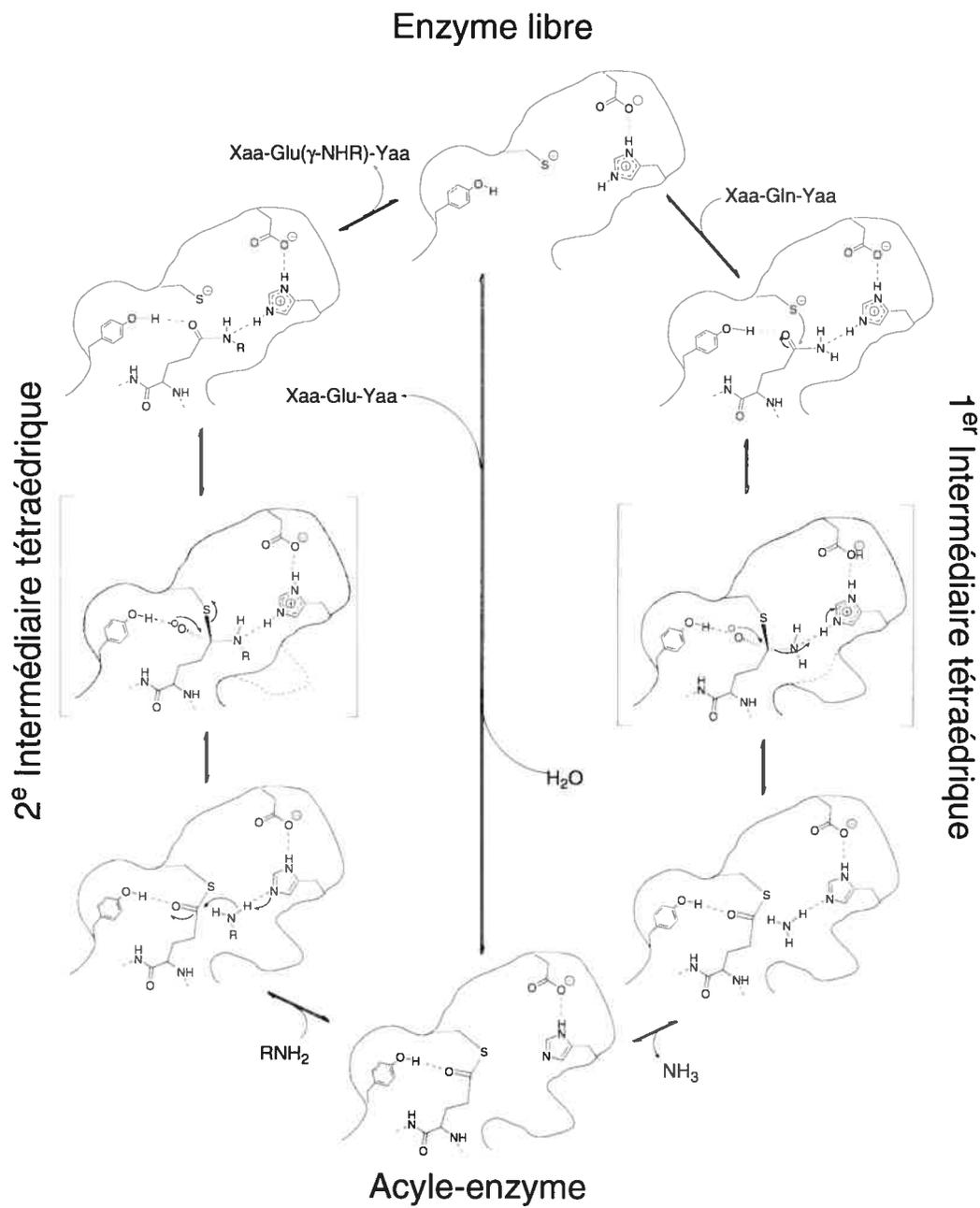


Figure 1.4: Proposition de mécanisme détaillé de la transglutaminase.

Substrats

Pour établir une meilleure compréhension de la transglutaminase, il faut dans un premier temps s'attarder aux substrats acceptés par celle-ci. D'abord, comme substrat donneur de glutamyle, les substrats naturels connus sont principalement des protéines cytosoliques, incluant les chaînes alpha et gamma de la fibrine⁶², l'actine⁶³ et la caséine⁶⁴. Ces protéines sont les substrats les mieux caractérisés mais comme la transglutaminase n'a pas une grande sélectivité, elle peut accepter une multitude d'autres protéines comme substrats donneur. Par exemple, les protéines de la famille S100, protéines responsables de la transmission de signaux de régulation cellulaire semblent être régulées par la modification de glutamines situées dans la région définissant la fonction de ces protéines S100⁶⁵. Ces modifications seraient effectuées par la transglutaminase.

Parmi les substrats donneur non naturels les plus fréquemment utilisés, on retrouve la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine⁶⁶. Des variations structurales sur ce squelette ont permis d'identifier certaines caractéristiques influant sur l'affinité de l'enzyme pour ses substrats⁶⁷. Par exemple, il semble extrêmement nuisible pour l'affinité d'avoir la fonction amine libre sur la glutamine et il est fortement préférable d'avoir un lien amide plutôt qu'un acide libre sur ce même acide aminé. Les charges à proximité du carbone α ne sont donc pas souhaitées. Notons ici que la protection de la fonction amine par un groupe protecteur non-aromatique résulte en une chute drastique de l'affinité. La planarité et/ou l'aromaticité du groupe protecteur choisi est d'une grande importance. L'isomère optique D n'est que très légèrement actif (4000 fois moins efficace)⁹³. Les amides ramifiés en α et β du carboxamide ne sont pas reconnus, supportant l'hypothèse d'un site actif en forme de tunnel étroit. Finalement, une élévation de la chaîne est tolérée mais l'asparagine n'est pas reconnue⁶⁸.

Une nouvelle série de substrats étudiés plus récemment inclue certains oligopeptides tels que EAQQIVM⁶⁹ et PQQQLPY⁷⁰. La première de ces deux séquences, correspondant à la séquence en N-terminal de la fibronectine, a permis à Sato et al. de

confirmer la forte affinité de la transglutaminase pour les répétitions de deux glutamines et, plus spécifiquement, pour la première de ces deux glutamines. Ces répétitions sont en effet retrouvées aux sites d'incorporation d'amine chez les principaux substrats naturels des transglutaminases tissulaires, tels que la fibronectine⁷¹, la chaîne γ du fibrinogène⁷², l'activateur-2 du plasminogène⁷³, la cystalline β A3⁷⁴ et l'osteonectine⁷⁵. Le deuxième oligopeptide, a été identifié par Khosla *et al.* comme étant le fragment protéique impliqué dans l'inflammation dont sont victimes les individus atteints de la maladie céliaque. Il s'agit d'un fragment de la protéine de glutène, une gliadine impliquée dans la maladie. Cette séquence ($K_M=30 \mu\text{M}$)⁷⁶ a été utilisée comme squelette de base pour la synthèse de quelques inhibiteurs irréversibles envers lesquels l'enzyme a montré une grande affinité.

En ce qui concerne son substrat accepteur, la transglutaminase est encore moins sélective qu'elle ne l'est pour le substrat donneur. Toutes les alkylamines primaires sont acceptées et plusieurs tests d'incorporation d'amine sur des protéines utilisent les diamines comme la putrescine, la spermidine et la cadavérine comme accepteur. Ces diamines sont souvent liées à une sonde fluorescente, comme c'est le cas par exemple dans le cas de la monodansylcadavérine^{77,78}.

La transglutaminase du foie de cobaye

Pertinence

Le choix de la transglutaminase du foie de cochon d'Inde comme transglutaminase tissulaire modèle repose sur sa grande homologie avec la TGase humaine (80%) et justifie ainsi son importance comme modèle en recherche biomédicale⁷⁹. L'homologie fait ici référence à la portion de la séquence composée d'acides aminés identiques ou de même type dans les deux protéines en question. Deux acides aminés sont de même type s'ils sont tous deux polaires, chargés, hydrophobes,

petits, gros, etc. En plus de sa grande homologie à la transglutaminase humaine, la transglutaminase de foie de cochon d'Inde est facilement disponible à partir des tissus animaux⁸⁰. En effet, le groupe du professeur Keillor a mis au point une méthode de purification⁸¹ à partir de tissus frais qui dépasse de 55% le rendement publié dans la méthode de purification classique de Folk et Chung⁸², tout en obtenant une enzyme dont l'activité spécifique est 28% plus grande que celle rapportée dans cette même publication. La transglutaminase du foie de cobaye est une enzyme monomérique de 79 kDa, non-glycosylée et ne comportant aucun pont disulfure. Ces caractéristiques sont similaires à l'enzyme humaine. En se basant sur les structures déjà connues (Facteur XIIIa et transglutaminase tissulaire de poisson) et sur la grande homologie de séquence, il peut être cru que la TGase du foie de cobaye est constituée des même quatre domaines distincts : baril- β 1, baril- β 2, sandwich- β et cœur- α/β . Le site actif responsable de l'activité transamidase se situerait au sein de ce dernier domaine et serait assuré par la triade Cys-314, His-334 et Asp-358.

Objectifs et méthode

Dans le but d'approfondir la compréhension du fonctionnement de la transglutaminase tissulaire et de développer diverses applications basées sur cette compréhension, le groupe de recherche du professeur Keillor effectue ses travaux sur quatre fronts : 1) l'expression et la purification d'une TGase tissulaire de qualité^{84.81}, 2) l'étude cinétique des différentes étapes mécanistiques de son fonctionnement⁹² et 3) le développement d'inhibiteurs potentiels pour des fins biomédicales ou pour des fins de marquage protéique^{109.111} et 4) la cristallisation de la protéine.

Sources de TGase : Expression et purification

La méthode traditionnelle d'obtention de la TGase du foie de cochon d'Inde consistait en l'extraction de l'enzyme des tissus frais⁸¹. La méthode permettait d'obtenir

environ 15 mg d'une enzyme pure à 95% à partir de 140g de foie frais. Les étapes classiques de purification utilisées dans cette méthode sont une homogénéisation des foies dans une solution de sucrose, suivie d'une filtration des résidus cellulaires, d'une chromatographie échangeuse d'ion, d'une précipitation au sulfate de protamine, d'une extraction au sulfate d'ammonium, d'une chromatographie d'exclusion de taille et d'une lyophilisation. Le tout nécessitant une semaine complète d'efforts pour n'obtenir qu'une quinzaine de milligrammes d'enzyme, une méthode encore plus efficace était souhaitable. En effet, pour parvenir à effectuer des études de cristallisation, une source plus abondante et moins fastidieuse d'enzyme était désirée.

Roberto Chica et Steve Gillet, respectivement étudiant au doctorat et chercheur post-doctoral en co-direction avec le groupe de la professeure Joelle Pelletier, ont donc entrepris de mettre au point un système d'expression dans *Escherichia coli*. En effet, la TGase tissulaire, ne nécessitant aucune modification post-transcriptionnelle, est une bonne candidate pour l'expression bactérienne. Après quelques problèmes d'agrégation, un système d'expression dans une souche de *E. coli* XL-1 Blue avec un vecteur pQE32 pour la TGase et pDnaKJ pour deux chaperonnes protéiques⁸³ (DnaK et DnaJ) a été mis au point. L'ajout d'une séquence hexa histidine en N-terminal de l'enzyme a permis une purification par chromatographie d'affinité sur résine de nickel hautement efficace⁸⁴. Notre groupe tente également d'exprimer la transglutaminase humaine selon des méthodes publiées par certains collègues⁸⁵. Dès que cette enzyme sera facilement disponible, les études faites au sein de notre groupe bifurqueront sans doute vers cette enzyme car, bien que l'enzyme de cochon d'Inde soit un bon modèle, des études sur l'enzyme humaine demeurent préférables.

La méthode d'obtention de la transglutaminase de cochon d'Inde recombinante maintenant utilisée dans le groupe est donc cette méthode n'impliquant que quelques étapes simples. Tout d'abord, la culture en bouillon LB (bouillon classique développé par Luria et Bertani) est effectuée jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,6 à une longueur d'onde de 600 nm. La production de TGase est ensuite induite en ajoutant de l'IPTG (isopropyl thiogalactoside). Les cellules entières sont ensuite isolées par

centrifugation, lysées par sonication et les parois cellulaires sont enlevées par centrifugation. Une simple chromatographie d'affinité sur une résine de nickel-NTA et une désalinisation par exclusion de taille permet finalement d'obtenir une TGase d'une pureté satisfaisante.

Une trentaine de milligrammes d'enzyme pure à 95% peuvent donc être obtenus à partir d'un litre de culture en une journée et demie de travail. Une comparaison des enzymes native et recombinante a permis de déterminer que bien qu'il y ait de légères variations d'affinité (K_M) et de constante de vitesse (k_{cat}) envers quelques substrats modèles, les deux formes étaient comparables. Les études cinétiques présentées dans cet ouvrage n'ont été effectuées qu'avec l'enzyme recombinante.

Cristallisation

La possibilité d'obtenir de grandes quantités d'une enzyme suffisamment pure a rendu possible le projet de cristallisation de l'enzyme. En effet, bien que le Facteur XIIIa ait été cristallisé à plusieurs reprises^{86,87,88,89,90,91}, une structure cristalline de transglutaminase tissulaire liée au calcium n'est toujours pas disponible. De même, aucune TGase n'a été co-cristallisée en présence d'un inhibiteur. Une co-cristallisation en présence d'inhibiteur réversible donnerait plus d'informations sur la liaison du substrat au site actif de l'enzyme, mimant le complexe de Michaelis (complexe entre l'enzyme et le substrat). Similairement, une cristallisation de l'enzyme inhibée par un inhibiteur irréversible donnerait peut-être de l'information sur les changements de conformation induits par la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme. Le projet de cristallisation s'effectue en collaboration avec le laboratoire de recherche du professeur et cristallographe Albert Berghuis, de l'Université McGill, à Montréal.

Études mécanistiques

La compréhension du fonctionnement d'une enzyme peut être à plusieurs niveaux. D'abord, il est possible de s'intéresser au type général du mécanisme, puis, d'identifier l'étape limitante du mécanisme. Ensuite, les études mécanistiques peuvent généralement être débutées avec cette étape limitante, à l'état stationnaire, par soucis de simplicité. Finalement, les détails du fonctionnement et les explications structurales reliées à l'efficacité catalytique observée sont identifiés. Dans le cas présent, le mécanisme général est de type ping-pong modifié et l'étape de désacylation est limitante. Elle fut donc étudiée en premier. Diverses études ont été faites en utilisant des substrats activés, des relations linéaires d'énergie libre ou d'autres combinaisons de réactifs dans des systèmes d'enzymes couplées, toujours dans le but d'acquérir plus d'informations sur les détails de l'étape de désacylation du mécanisme de fonctionnement de la transglutaminase tissulaire.

Tout d'abord, puisqu'une étude cinétique de l'étape de désacylation ne peut être faite que dans des conditions où cette étape est limitante, un substrat analogue de type ester activé, similaire au meilleur substrat dipeptide connu, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine, et libérant un chromophore lors de sa réaction enzymatique a donc été synthétisé.

Ce substrat, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitrophényl)glycine est couramment utilisé dans le groupe car il est très facile de suivre en continu la réaction par spectrophotométrie UV-Vis⁹² à 410 nm, longueur d'onde d'absorption du *p*-nitrophénol. De plus, la vitesse à laquelle il acyle l'enzyme devrait être supérieure à celle du substrat amide, assurant ainsi que l'étape de désacylation demeure limitante.

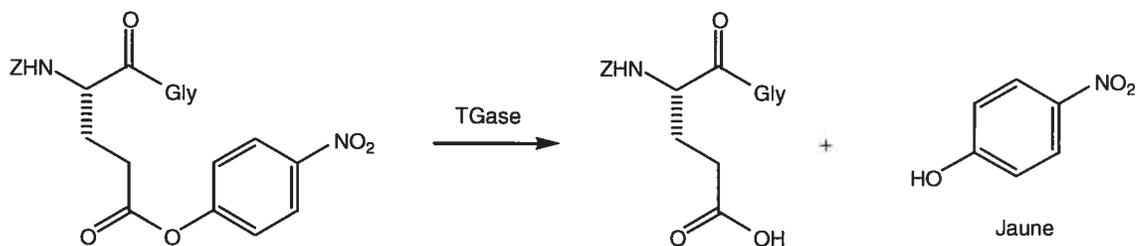


Figure 1.5: Libération d'un produit facile à suivre par colorimétrie

C'est en combinant ce substrat activé à une librairie d'amines primaires qu'il a été possible de prouver la présence d'une base générale, probablement une histidine, jouant un rôle essentiel de déprotonation de l'accepteur au cours de l'attaque nucléophile de celui-ci sur le carbonyle de l'acyl-enzyme⁹². Il faut noter ici que le substrat activé utilisé, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitrophényl)glycine, génère le même intermédiaire acyl-enzyme que la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamylglycine, composé modèle utilisé partout dans la littérature⁹³.

Outre l'utilisation d'un substrat libérant un groupe chromophore, d'autres méthodes de suivi cinétique ont été développées dans le groupe du professeur Keillor. D'abord, une méthode d'enzymes couplées profite de l'habileté de la TGase à désaminer la glutamine. L'ammoniac alors libéré agit comme substrat d'une deuxième enzyme, la glutamate déshydrogénase (GDH).

Lorsque cette enzyme effectue l'amination réductive de l' α -cétoglutarate, un équivalent d'hydruure de nicotinamide adénosyl dinucléotide (NADH) est oxydé et l'absorbance de la solution à 340 nm diminue alors. La vitesse d'oxydation du NADH étant limitée par la vitesse de libération d'ammoniac par la TGase, il est possible de suivre la réaction de celle-ci⁹⁴.

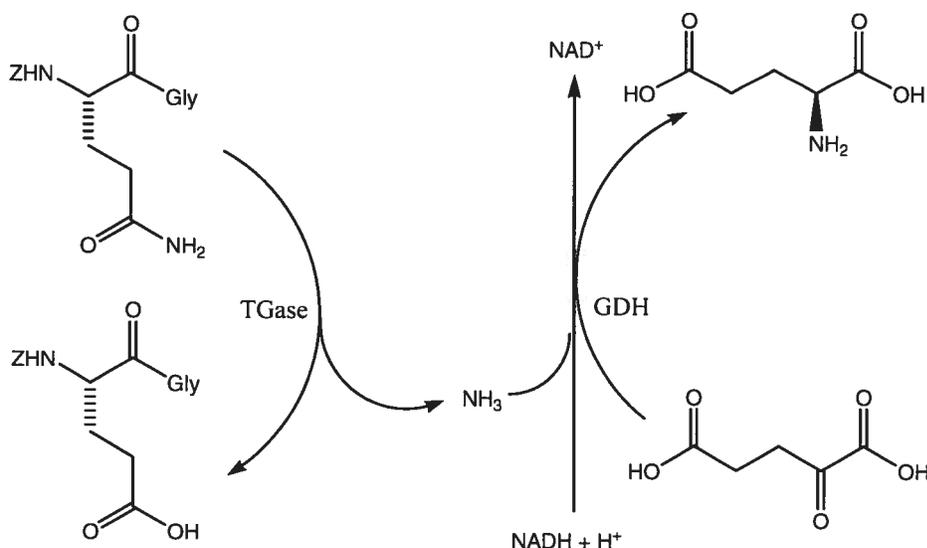


Figure 1.6: Méthode de détection au GDH

Une autre méthode de suivi cinétique développée dans le groupe du professeur Keillor est l'utilisation du N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine (DMPDA) comme substrat accepteur⁹⁵. La formation du produit coloré ainsi produit est facile à suivre à 278 nm. Cette méthode présente comme seul désavantage la nécessité d'avoir préalablement caractérisé un échantillon authentique du produit de la réaction pour en déterminer avec certitude le coefficient d'extinction molaire. Cette méthode est donc réservée aux applications sur des substrats donneurs standard dont le produit de transamination au DMPDA a été caractérisé.

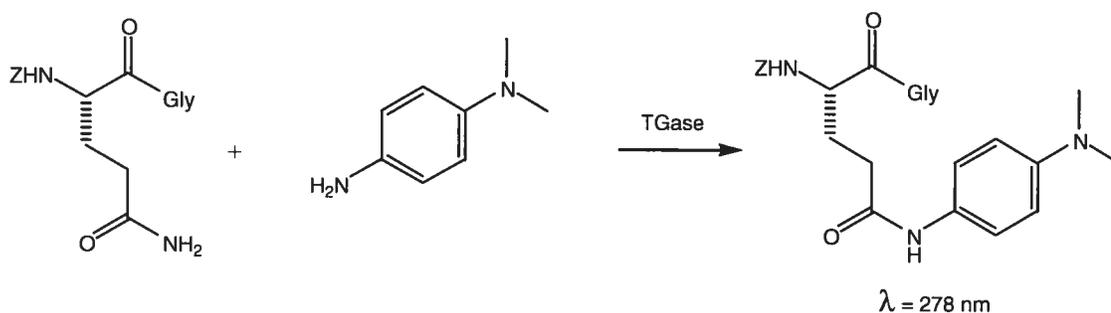


Figure 1.7: Méthode de détection par DMPDA

Développement d'une méthode cinétique par ITC

Puisque les méthodes jusqu'alors développées ont plusieurs limitations, et puisque les réactions d'amidation sont généralement difficiles à suivre par des méthodes spectroscopiques simples (UV, IR, etc.) ou par titration, une méthode générale et applicable à toutes les combinaisons de substrat donneur et accepteur était souhaitable. Se basant sur le fait que toute réaction est accompagnée d'une variation d'enthalpie, un suivi en continu par titration calorimétrique isotherme (ITC) a été envisagé.

Des contraintes physiques liées à l'appareil ont limité l'applicabilité de cette méthode à la transglutaminase. Des résultats effectués sur une autre transamidase, la γ -glutamyl transpeptidase se sont cependant avérés prometteurs et seront présentés dans cet ouvrage.

Chimie biomédicale

On retrouve dans la littérature plusieurs groupements fonctionnels inactivateurs de la transglutaminase. Notamment, des sulfonamides^{96,97}, iodoacétates^{98,99,100,101}, isocyanates¹⁰², thiourées¹⁰³, isoxazole^{104,105}, sulfonium méthyl cétones¹⁰⁶, thioacétonyl¹⁰⁷ et analogues électrophiles de la glutamine¹⁰⁸. Tous ces inhibiteurs, d'une efficacité variable, présentent pour la plupart un problème de sélectivité, inactivant une foule d'enzymes à cystéine catalytique en plus de la transglutaminase. Ceci limite grandement leur utilité thérapeutique.

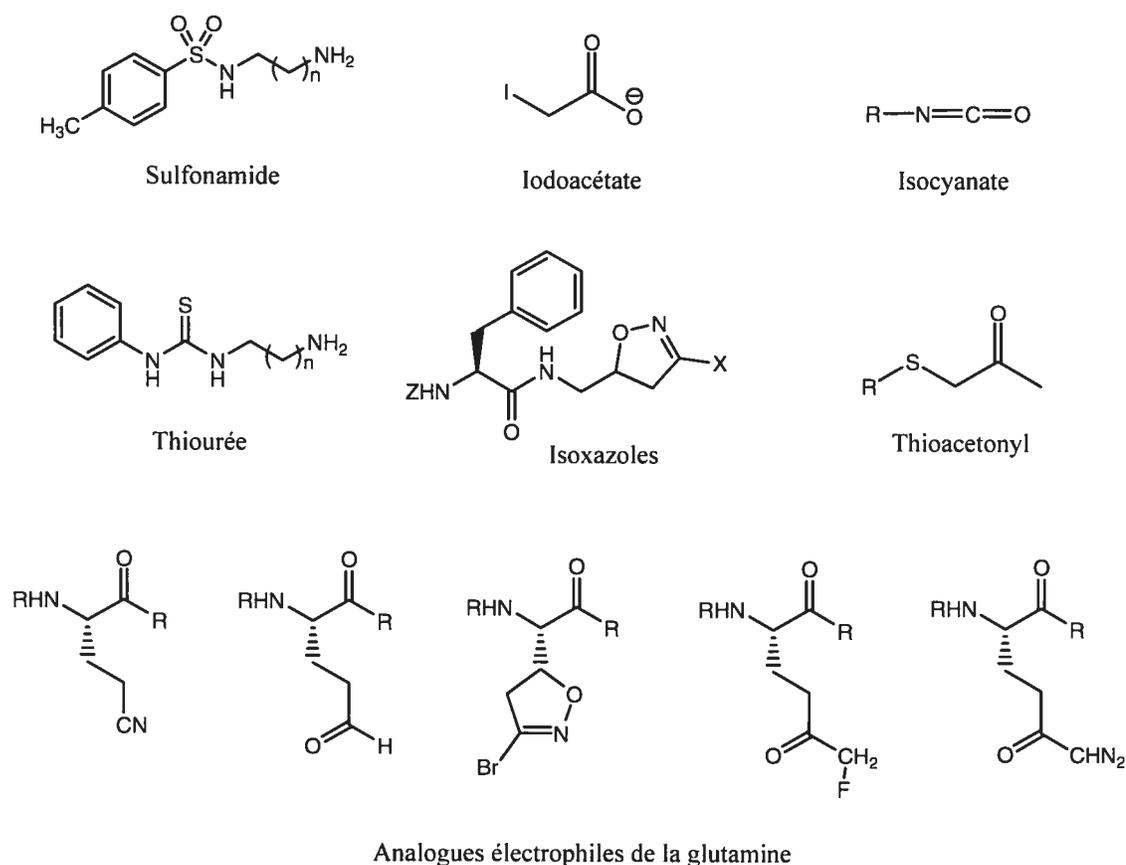


Figure 1.8: Structures des inhibiteurs tirés de la littérature.

Quelques inhibiteurs irréversibles un peu plus sélectifs de la transglutaminase ont été synthétisés et caractérisés par le groupe du professeur Keillor. Ceux-ci comportaient l'une de trois fonctions connues pour inhiber les enzymes à cystéines : les 1,2,4-thiadiazoles^{109,110}, les accepteurs de Michael^{110,111} et les époxydes¹¹¹. Tous ces inhibiteurs possédaient le même squelette mimant la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine et assurant une plus grande sélectivité envers la transglutaminase^{101,112}. Cette stratégie a d'ailleurs été employée par C. Khosla lors du design d'inhibiteurs irréversibles similaires⁷⁶.

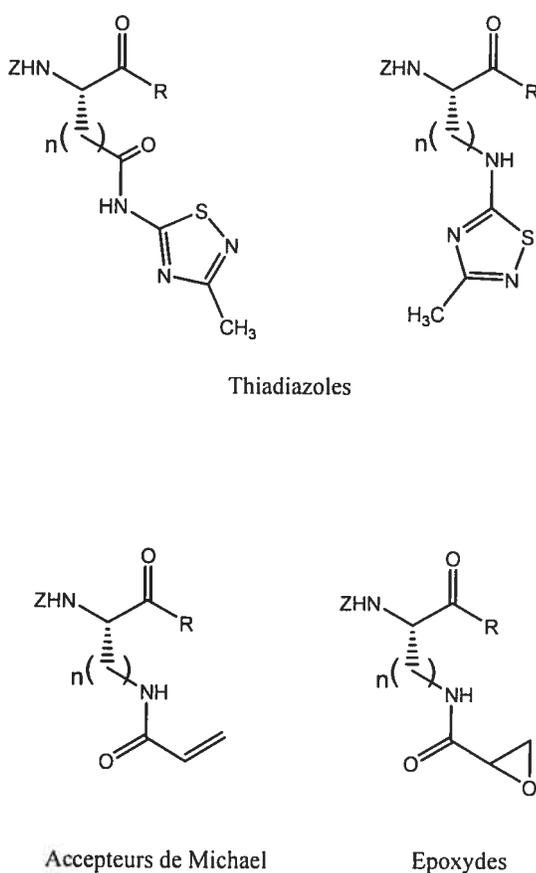


Figure 1.9: Structure des inhibiteurs synthétisés dans notre groupe de recherche.

Plus récemment, un besoin pressant d'établir certaines relations structure-activité a poussé les membres du groupe à faire varier certains aspects du squelette N-

benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine. Ces modifications incluent une rigidification de la chaîne latérale de la glutamine¹¹³, une substitution du méthylène γ par des hétéroatomes (N, O, S) et la substitution du groupement amide par un analogue chiral de cette dernière fonction. Ces deux dernières idées sont celles dont il sera discuté plus en détail aux chapitres 2 et 4.

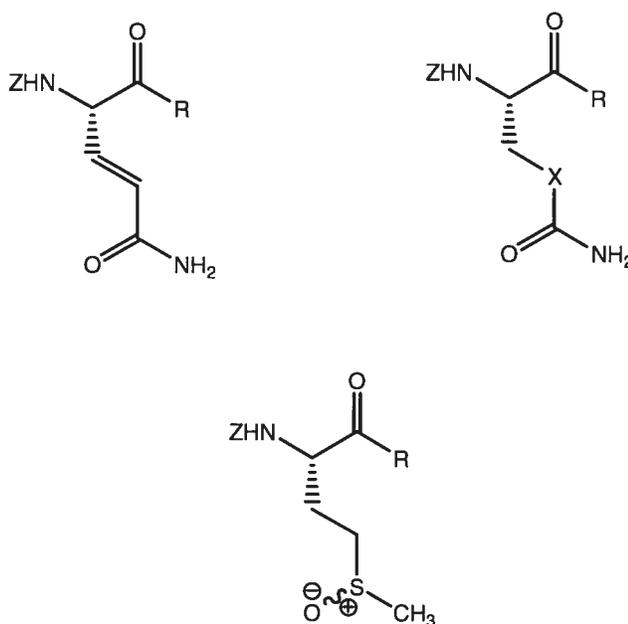


Figure 1.10: Modifications structurales entreprises.

La synthèse d'inhibiteurs basés sur la structure de l'état de transition fait souvent appel à des molécules mimant l'intermédiaire chiral tétraédrique résultant de l'attaque nucléophile sur l'acyle-enzyme. Il devient donc essentiel de mieux définir l'arrangement spatial des résidus du site actif et des interactions stabilisant l'intermédiaire tétraédrique. Une distinction entre les deux faces chirales d'une fonction sulfoxyde pourrait apporter de nouvelles informations à ce sujet.

Une autre raison poussant notre groupe à entreprendre la synthèse d'équivalents diastéréomériques de la L-glutamine provient de tests cinétiques particuliers. En effet, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitroanilide)glycine s'est avérée n'avoir aucune affinité et/ou réactivité pour l'enzyme. Ceci est étonnant considérant dans un premier temps que cette molécule, tout comme le substrat standard, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine, est un amide et dans un deuxième temps, que ce *p*-nitroanilide est une molécule isoélectronique et isostérique au N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitrophénylester)glycine, substrat couramment utilisé dans le laboratoire. De telles similitudes fonctionnelles et électroniques devraient résulter en une réactivité comparable. Ce n'est pas le cas (voir figure 1.11).

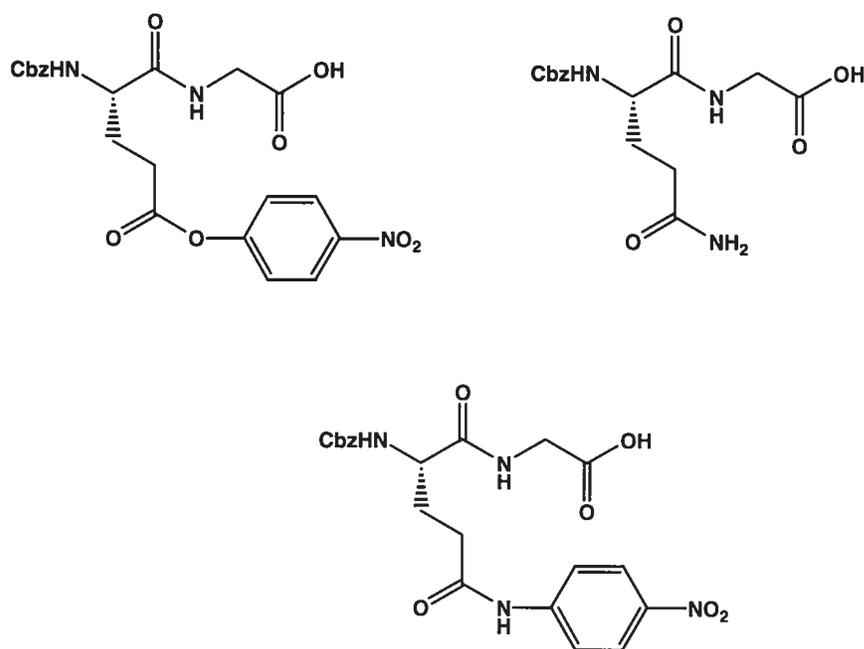


Figure 1.11: Structures de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitrophényl ester)glycine (gauche), la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine (droite) et la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitroanilide)glycine (bas).

Notre hypothèse concernant ces résultats propose l'idée que la protonation de l'amine qui sert de groupe partant pourrait s'effectuer dans une sous-cavité encombrée,

près de l'histidine-334. Il peut d'ailleurs être confirmé en regardant la structure cristalline de la transglutaminase tissulaire de poisson que l'histidine en question est située au fond d'une poche encombrée. Cet encombrement stérique rendrait la transglutaminase sélective aux amides primaires. La présence d'un substituant volumineux sur l'azote de l'amide rendrait donc le complexe non réactif, faute de pouvoir protonner l'amine pour la rendre suffisamment bon groupe partant. En fait, Nicholas Day, un ancien membre du groupe a montré que l'ajout d'un groupement méthyle au groupe carboxamide de la glutamine la transforme en un inhibiteur compétitif¹⁴. L'ester activé *p*-nitrophényl ne nécessitant pas cette protonation pour être un bon groupe partant, la réaction peut avoir lieu.

L'introduction d'une fonction sulfoxyde ajoute une contrainte chirale sur la position relative de l'oxygène et du groupe partant et pourrait apporter un peu plus d'informations sur l'orientation de la sous-cavité permettant la protonation de celui-ci. Un tel composé dont la structure ressemble beaucoup à celle d'un substrat déjà relativement bien reconnu par l'enzyme pourrait avoir des propriétés inhibitrices intéressantes.

Les résultats préliminaires de la synthèse et de l'étude cinétique de dérivés sulfoxydes et sulfones seront présentés au chapitre 4.

Bibliographie

- ¹ Aeschlimann, D. and Paulsson, M. *Thrombosis and Haemostasis*, **1994**, *71*, 402-415.
- ² Greenberg, C.S.; Birckbichler, P.J. et Rice, R.H. *FASEB J.*, **1991**, *5*, 3071-3077.
- ³ Griffin, M. et Wilson, J. *Molec. Cell. Biol.*, **1984**, *58*, 37-49.
- ⁴ Lee, K.N.; Arnold, S.A.; Birckbichler, P.J.; Patterson Jr, M.K.; Fraij, B.M.; Takeuchi, Y. et Carter, H.A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, *1202*, 1-6.
- ⁵ Thomazy, V. et Fesus, L. *Cell. Tissue Res.*, **1989**, *255*, 215-224.
- ⁶ Philips, M.A.; Stewart, B.E.; Qin, Q.; Chakravarty, R.; Floyd, E.E.; Jetten, A.M. et Rice, R.H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 9333-9337.
- ⁷ Ho, K.C.; Quarmby, F.E.; French, F.S. et Wilson, E.M. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 12660-12667.
- ⁸ Sung, L.A.; Chien, S.; Fan, Y.S.; Lin, C.C.; Lambert, K.; Zhu, L.; Lam, J.S. et Chang, L.S. *Blood*, **1992**, *79*, 2763-2770.
- ⁹ Ikura, K.; Nasu, T.; Yokota, H.; Tsuchiya, Y.; Sasaki, R. et Chiba, H. *Biochemistry*, **1988**, *27*, 2898-2905.
- ¹⁰ Gentile, V.; Saydak, M.; Chiocca, E.A.; Akande, O.; Birckbichler, P.J.; Lee, K.N.; Stein, J.P. et Davies, P.J.A. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 478-483.
- ¹¹ Nakanishi, K.; Nara, K.; Hagiwara, H.; Aoyama, Y.; Ueno, H. et Hirose, S. *Eur. J. Biochem./FEBS*, **1989**, *264*, 19308-19312.
- ¹² Weraarchakul-Boonmark, K.; Jeong, J.M.; Murthy, S.N.P.; Engel, J.D. et Lorand, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 9804-9808.
- ¹³ Gentile, V.; Davies, P.J.A. et Baldini, A. *Genomics*, **1994**, *20*, 295-297.
- ¹⁴ Fraij, B.M. et Gonzalez, R.A. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1997**, *1354*, 65-71.
- ¹⁵ Yee, V.C.; Pedersen, L.C.; Le Trong, I.; Bishop, P.D.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 7296-7300.
- ¹⁶ Nogushi, K.; Ishikawa, K.; Yokoyama, K.-I.; Ohtsuka, T.; Nio, N. et Suzuki, E.-I. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276 (15)*, 12055-12059.
- ¹⁷ Greenberg, C.S.; Birckbichler, P.J. et Rice, R.H. *FASEB J.*, **1991**, *5*, 3071-3077.
- ¹⁸ Piacentini, M.; Fesus, L.; Farrace, M.G.; Ghibelli, L.; Piredda, L. et Melino, G., *Eur. J. Cell. Biol.*, **1991**, *54*, 246-254.
- ¹⁹ Fesus, L.; Thomazy, V. et Falus, A., *FEBS Lett.*, **1987**, *224*, 104-108.
- ²⁰ Knight, C.R.L.; Hand, D.; Piacentini, M. et Griffin, M., *Eur. J. Cell. Biol.*, **1993**, *60*, 210-216.
- ²¹ Melino, G. et Piacentini, M., *FEBS Lett.*, **1998**, *430*, 59-63.
- ²² Gentile, V.; Thomazy, V.; Piacentini, M.; Fesus, L. et Davies, P.J.A., *J. Cell. Biol.*, **1992**, *119*, 463-474.
- ²³ Piredda, L.; Amendola, A.; Colizzi, V.; Davies, P.J.A.; Farrace, M.G.; Fraziano, M.; Gentile, V.; Uray, I.; Piacentini, M. et Fesus, L., *Cell Death Diff.*, **1997**, *4*, 463-472.
- ²⁴ Melino, G.; Annicchiarico-Petruzelli, M.; Piredda, L.; Candi, E.; Gentile, V.; Davies, P.J.A. et Piacentini, M., *Molec. Cell. Biol.*, **1994**, *14*, 6584-6596.
- ²⁵ Amendola, A.; Gougeon, M.L.; Poccia, F.; Bondurand, A.; Fesus, L. et Piacentini, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 11057-11062.
- ²⁶ Peng, X.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Graner, S.; Williams, J.F.; Levitt, M.L. et Loxsin, A., *FEBS Lett.*, **1999**, *446*, 35-39.
- ²⁷ Chen, J.S.K. et Mehta, K., *Int. J. Biochem & Cell Biol.*, **1999**, *31*, 817-836.
- ²⁸ Folk, J.E.; Mullooly, J.P. et Cole, P.W., *J. Biol. Chem.*, **1967**, *242*, 1838-1844.
- ²⁹ Kanaji, T.; Ozaki, H.; Takao, T.; Hawajiri, H.; Ide, H.; Motoki, M. et Shimonishi, Y., *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 11565-11572.
- ³⁰ Lee, K.N.; Arnold, S.A.; Birckbichler, P.J.; Patterson Jr, M.K.; Fraij, B.M.; Takeuchi, Y. et Carter, H.A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, *1202*, 1-6.
- ³¹ Lai, T.-S.; Slaughter, T.F.; Peoples, K.A.; Hettash, J.M. et Greenberg, C.S., *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 1776-1781.
- ³² Verderio, E.; Nicholas, B.; Gross, S. et Griffin, M., *Exp. Cell. Res.*, **1998**, *239*, 119-138.
- ³³ Melino, G. et Bernassola, F., *Nature*, **1997**, *388*, 433-434.
- ³⁴ Lai, T.-S.; Hausladen, A.; Slaughter, T.F.; Eu, J.P., Stamler, J.S. et Greenberg, C.S., *Biochemistry*, **2001**, *40*, 4904-4910.
- ³⁵ Borth, W.; Chang, V.; Bishop, P. et Harpel, P. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *268*, 18149-18153.

- ³⁶ Wiebe, R.I.; Tarr, A.H. et Bowness, J.M., *Cell. Biol. Biochem.*, **1991**, *69*, 821-827.
- ³⁷ Groenen, P. J. T. A.; Grootjans, J. J.; Lubsen, N. H.; Bloemendal, H. et de Jong, W. W. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 831-833.
- ³⁸ Lorand, L.; Velasco, P.T., Murthy, S.N.P.; Wilson, j. et Parameswaran, K.N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *89*, 11161-11163.
- ³⁹ Groenen, P.J.T.A.; Bloemendal, H. et De Jong, W.W., *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *205*, 671-674.
- ⁴⁰ Ho, G.J.; Gregory, E.J.; Smirnova, I.V.; Zoubine, M.N. et Festoff, B.W., *FEBS Letter*, **1994**, *349*, 151-154.
- ⁴¹ Jensen, P. H.; Sorensen, E. S.; Petersen, T. E.; Gliemann, J. et Rasmussen, L. K. *Biochem. J.*, **1995**, *310*, 91-94.
- ⁴² Zhang, W.; Johnson, B.R. et Bjornsson, T.D., *Life Sci.*, **1997**, *60*, 2323-2332.
- ⁴³ Appelt, D.M. et Balin, B.J., *Brain Res.*, **1997**, *745*, 21-31.
- ⁴⁴ Johnson, G.V.; Cox, T.M., Lockhart, J.P., Zinnerman, M.D., Miller, M.L. et Powers, R.E., *Brain Res.*, **1997**, *751*, 323-329.
- ⁴⁵ Appelt, D.M.; Kopen, G.C., Boyne, L.J. et Balin, B.J., *J. Histochem. Cytochem.*, **1996**, *44*, 1421-1427.
- ⁴⁶ Burroughs, E.N.; Clark, H.B.; Servadio, A.; Matilla, T.; Reddersen, R.M.; Yunis, W.S.; Duvick, L.A.; Zoghbi, H. et Orr, H.T., *Cell*, **1995**, *82*, 937-948.
- ⁴⁷ Perutz, M.F., *Trends in Biochem. Sci.*, **1999**, *24*, 58-63.
- ⁴⁸ Igarashi, S.; Koide, R.; Shimohata, T.; Yamada, M.; Hayashi, Y.; Takano, H.; Date, H.; Oyake, M.; Sato, T.; Sato, A.; Egawa, S.; Ikeuchi, T.; Tanaka, H.; Nakano, R.; Tanaka, K.; Hozumi, I.; Inuzuka, I.; Takahashi, H. et Tsuji, S., *Nature Genet.*, **1998**, *18*, 111-117.
- ⁴⁹ Szabolcs, M.; Sipka, S. et Csorba, S., *Acta Paediatr. Hung.*, **1987**, *28*, 215-227.
- ⁵⁰ Folk, J.E., *Annu. Rev. Biochem.*, **1980**, *49*, 517-531.
- ⁵¹ Reif, S. et Lerner, A. *Autoimmunity Reviews*, **2004**, *3*, 40-45
- ⁵² Schuppan, D.; Hahn, E.G. *Science*, **2002**, *297*, 2218-2220.
- ⁵³ Fasano, A., *J. Pediatr.*, **1999**, *134*, 134-135.
- ⁵⁴ Dieterich, W.; Ehnis, T.; Bauer, M.; Donner, P.; Volta, U.; Rieken, E.O. et Schuppan, D., *Nature Med.*, **1997**, *3*, 797-801.
- ⁵⁵ 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., *Nature Med.*, **1998**, *4*, 713-717.
- ⁵⁶ Van de Wal, Y.; Kooy, Y.; van Veelen, P.; Pena, S.; Mearin, L.; Papadopoulos, G. et Koning F., *J. Immunol.*, **1998**, *161*, 1585-1588.
- ⁵⁷ Dieterich, W.; Laag, E.; Schopper, E.; Volta, U.; Ferguson, A.; Gillet, H. et al. *Gastroenterology* **1998**, *115*, 1317-1321.
- ⁵⁸ Troncone, R.; Maurano, F.; Rossi, M.; Micillo, M.; Greco, L.; Auricchio, R. et al. *J. Pediatr.* **1999**, *134*, 166-171.
- ⁵⁹ Sblattero, D.; Berti, I.; Trevisol, C.; Marzari, R.; Tommasini, A.; Bradbury A. et al. *Am. J. Gastroenterol* **2000**, *95*, 1253-1257.
- ⁶⁰ Chica, R.A.; Gagnon, P.; Keillor, J.W. et Pelletier, J.N., *Prot. Science.*, **2004**, *13*, 979-991.
- ⁶¹ Folk, J.E., *J. Biol. Chem.*, **1969**, *244*, 3707-3713.
- ⁶² Ichinose, A.; Bottenus, R.E. et Davie, E.W., *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13411-13414.
- ⁶³ Puzkin, E.G. et Raghuraman, V., *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 16012-16020.
- ⁶⁴ Ikura, K.I Tsuchiya, Y.; Sasaki, R. et Chiba, H., *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *187*, 705-711.
- ⁶⁵ Ruse, M.; Lambert, A.; Robinson, N.; Ryan, D.; Shon, K.J. et Eckert, R.L, *Biochemistry*, **2001**, *40*, 3167-3173.
- ⁶⁶ Folk, J.E. et Chung, S.I., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **1973**, *38*, 109-191.
- ⁶⁷ Folk, J.E., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **1983**, *54*, 1-56.
- ⁶⁸ Ohtsuka, T.; Ota, M.; Nio, N. et Motoki, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2002**, *64*(12), 2608-2613.
- ⁶⁹ Sato, H.; Yamada, N.; Shimba, N. et Takahara, Y., *Anal. Biochem.*, **2000**, *281*, 68-76.
- ⁷⁰ Shan, L.; Molberg, O.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G.M.; Sollid, L.M. et Khosla, C., *Science*, **2002**, *297*, 2275-2279.
- ⁷¹ McDonagh, R.P.; McDonagh, J.; Petersen, T.E.; Thorgensen, H.G.; Skorstengaard, K.; Sottrup-Jensen, L.; Magnusson, S.; Dell, A. et Morris, H.R., *FEBS Lett.*, **1981**, *127*, 174-178.
- ⁷² Chen, R. et Doolittle, R.F., *Biochemistry*, **1971**, *10*, 4487-491.

- ⁷³ Jensen, P.H.; Schuler, E.; Woodrow, G.; Richardson, M.; Goss, N.; Hojrup, P.; Petersen, T.E. et Rasmussen, L.K., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 15394-15398.
- ⁷⁴ Berbers, G.A.; Feenstra, R.W.; Van den Bos, R.; Hoekman, W.A.; Bloemendal, H. et de Jong, W.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1984**, *81*, 7017-7020.
- ⁷⁵ Hohenadl, C.; Mann, K.; Mayer, U.; Timpl, R.; Paulsson, M. et Aeschlimann, D., *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 23415-23420.
- ⁷⁶ Hausch, F.; Halttunen, T.; Maki, M. Et Khosla, C., *Chem. Biol.*, **2003**, *10*, 225-231.
- ⁷⁷ Lorand, L.; Lockridge, O.M.; Campbell, L.K.; Myhrman, R.; Hoekman, W.A.; Bloemendal, H. et de Jng, W.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1984**, *81*, 7017-7020.
- ⁷⁸ Fink, M.L.; Shao, Y.Y. et Kersh, G.J., *Anal. Biochem.* **1992**, *201*, 270-276.
- ⁷⁹ Dieterich, W.; Ehnis, T.; Bauer, m.; Donner, P.; Volta, U.; Riecken, E.O. et Schuppan, D., *Nat. Med.* **1997**, *3*, 797-801.
- ⁸⁰ Abe, T.; Chung, S.I.; DiAugustie, R.P. et Folk, J.E. *Biochemistry*, **1977**, *16*, 5495-5501.
- ⁸¹ Leblanc, A.; Day, N.; Ménard, A. et Keillor, J.W. *Prot. Exp. Purif.* **1999**, *17*, 89-95.
- ⁸² Folk, J.E. et Chung, S.I. *Methods Enzymol.*, **1985**, *113*, 358-375.
- ⁸³ Yokoyama, K-L.; Kikuchi, Y.; Yasueda, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1205-1210.
- ⁸⁴ Gillet, S.M.F.G.; Chica, R.A.; Keillor, J.W. et Pelletier, J.N. *Prot. Exp. Purif.* **2004**, *33*, 256-264.
- ⁸⁵ Shi, Q.; Kim, S.-Y.; Blass, J.P. et Cooper, A.J.L., *Prot. Expres. Purif.*, **2002**, *24*, 366-373.
- ⁸⁶ Bishop, P.D.; Teller, D.C.; Smith, R.A.; Lasser, G.W.; Gilbert, T. et Seale, R.L., *Biochemistry*, **1990**, *29*, 1861-1869.
- ⁸⁷ Bishop, P.D.; Lasser, G.W.; Le Trong, I.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265* (23), 13888-13889.
- ⁸⁸ Yee, V.C.; Pedersen, L.C.; Le Trong, I.; Bishop, P.D.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 7296-7300.
- ⁸⁹ Hilgenfeld, R.; Liesum, A.; Storm, R.; Metzner, H.J. et Karges, H.E. *FEBS*, **1990**, *265*, 110-112.
- ⁹⁰ Weiss, M.S. et Hilgenfeld, R. *Acta Cryst. Section D*, **1999**, *D55*, 1858-1862.
- ⁹¹ Fox, B.A.; Yee, V.C.; Pedersen, L.C.; Le Trong, I.; Bishop, P.D.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274* (8), 4917-4923.
- ⁹² Leblanc, A.; Gravel, C.; Labelle, J. et Keillor, J.W. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 8335-8342.
- ⁹³ Chung, S.I.; Shrager, R.I. et Folk, J.E. *J. Biol. Chem.*, **1970**, *245*, 6424-6435.
- ⁹⁴ Day, N.; Keillor, J.W. *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 141-144.
- ⁹⁵ de Macedo, P.; Marrano, C. et Keillor, J.W. *Anal. Biochem.* **2000**, *285*, 16-20.
- ⁹⁶ Lorand, L.; Rule, N.G.; Ong, H.H.; Furlanetto, R.; Jacobsen, A.; Downey, J.; Oner, N.; Bruner-Lorand, J. *Biochemistry*, **1968**, *7*, 1214.
- ⁹⁷ Stenberg, P.; Nilsson, L.; Erickson, O.; Lunden, R. *Acta Pharm. Suec.* **1971**, *8*, 415.
- ⁹⁸ Holbrook, J.J.; Cooke, R.D.; Kingston, I.B. *Biochem. J.* **1973**, *135*, 901.
- ⁹⁹ Chung, S.I.; Lewis, M.S.; Folk, J.E. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 940.
- ¹⁰⁰ Curtis, C.G.; Brown, K.L.; Credo, R.B.; Domanik, R.A.; Gray, A.; Stenbreg, P.; Lorand, I. *Biochemistry*, **1974**, *13*, 3774.
- ¹⁰¹ Folk, J.E.; Finlayson, J.S. *Adv. Prot. Chem.* **1977**, *31*, 1.
- ¹⁰² Gross, M.; Whetzel, N.K.; Folk, J.E. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 7693.
- ¹⁰³ Lee, K. N.; Fesus, L.; Yancey, S.T.; Girard, J.E.; Chung, S.I. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14689.
- ¹⁰⁴ Castelhana, A.L.; Billedeau, R.; Pliura, D.H.; Bonaventura, B.J.; Krantz, A. *Bioorg. Chem.* **1988**, *16*, 335.
- ¹⁰⁵ Auger, M.; McDermott, A.E.; Robinson, V.; Castlhamo, A.L.; Billebeau, R.J.; Pliura, D.H.; Krantz, A.; Griffin, R.G. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 3930.
- ¹⁰⁶ Pliura, D.H.; Bonaventura, B.J.; Pauls, H.W.; Killackey, J.F.; Krantz, A.J. *Enzyme Inhib.* **1992**, *6*, 181.
- ¹⁰⁷ Freund, K.F.; Doshi, K.P.; Gaul, S.L.; Claremont, D.A.; Remy, D.C.; Baldwin, J.J.; Pitzenger, S.M.; Stern, A.M. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 10109.
- ¹⁰⁸ Doyle, P.M.; Harris, C.J.; Carter, K.R.; Simpkin, D.S.A.; Bailey-Smith, O.; Stone, D.; Russel, L.; Blackwell, G. *J. Biochem. Soc. Trans.* **1990**, *18*, 1318.
- ¹⁰⁹ Marrano, C.; de Macedo, P.; Gagnon, P.; Lapierre, D.; Gravel, C. et Keillor, J.W., *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 3231-3241.
- ¹¹⁰ Marrano, C.; de Macedo, P. et Keillor, J.W. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1923.
- ¹¹¹ de Macédo, P. ; Marrano, C. et Keillor, J.W. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 355-360.

¹¹² Folk, J.E.; Chung, S.I. *Met. Enzymol.* **1985**, *113*, 358.

¹¹³ Labelle, J., Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal, **2002**

¹¹⁴ Day, N., Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal, **2000**



Chapitre 2 : Études d'acylation

Introduction

En comparant les structures cristallines des quelques transglutaminases actuellement disponibles, notamment celle de la transglutaminase tissulaire de poisson¹ et celle du facteur de coagulation XIIIa humain², on peut noter que lors de la réaction catalysée par la transglutaminase, le groupement nucléophile est un thiol, une cystéine, dont la nucléophilie est augmentée par la présence d'une l'histidine et d'un acide aspartique. La présence de cette triade ne surprend pas, étant similaire à la triade catalytique de plusieurs protéases à cystéine, telles que la papaïne³.

L'attaque nucléophile ayant lieu lors de l'étape d'acylation du cycle catalytique de la transglutaminase est probablement celle d'un thiolate sur l'amide primaire de la glutamine et résulte en la formation d'un intermédiaire tétraédrique se décomposant, avec libération de l'ammoniac, pour former un thioester aussi appelé acyle enzyme.

Lorsqu'une attention particulière est portée aux études concernant l'acylation de thiols simples par divers agents acylants (ester, carbonate, carbamates, thiocarbonate, etc.) peu d'information est trouvée. En effet, mises à part la décomposition thermique⁴ de ces agents acylants et leur électrophilie face aux phénoxydes, amines secondaires acycliques et pyridines^{5,6,7,8}, peu de faits sont rapportés dans la littérature. C'est en partie pour combler cette lacune académique que des études d'acylation simple ont été initiées par Danielle Lapierre⁹ et dont l'achèvement est présenté dans cet ouvrage.

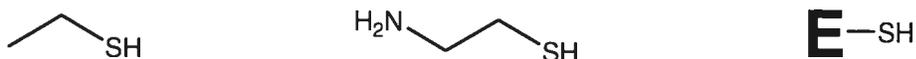


Figure 2.1: Choix des nucléophiles utilisés lors des études d'acylation : éthanethiol, cystéamine et transglutaminase

D'abord, trois nucléophiles ont été ciblés : l'éthanethiol, la cystéamine et la transglutaminase tissulaire de foie de cochon d'Inde. La réactivité de ces thiols a été mesurée lors de leur réaction avec divers composés carbonyles activés par un groupement *p*-nitrophényle.

La réaction des deux thiols simples avec les dérivés *p*-nitrophénylés illustrés à la figure 2.2 permet le relâchement du *p*-nitrophénolate, et peut être suivie spectrophotométriquement par l'absorbance de ce composé à 410 nm. Une variation des concentrations en thiol a permis d'obtenir des constantes de vitesse de pseudo premier ordre. Celles-ci ont ensuite été mises en relation avec les concentrations variables d'agents acylants utilisés pour finalement obtenir les constantes de vitesse de deuxième ordre de ces systèmes.

Pour ce qui est de la réaction des agents acylants avec l'enzyme, l'utilisation d'une méthode d'analyse appelée « stopped-flow » a permis la détermination des valeurs de K_M et de k_{cat} pour les divers agents acylants. Il est possible de calculer le ratio k_{cat}/K_M , qui correspond à une constante de deuxième ordre et peut être comparé à la constante de deuxième ordre des systèmes non-enzymatiques. Cette comparaison permettra d'en savoir plus sur l'efficacité relative du thiol de la cystéine du site actif par

comparaison aux thiols simples. Il peut aussi être intéressant de comparer les comportements cinétiques des divers agents acylants lors de la réaction enzymatique pour en apprendre plus sur l'étape rapide d'acylation du cycle catalytique.

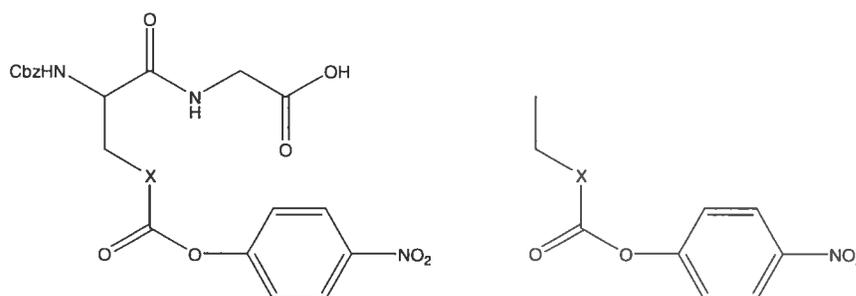
Comme pour les études de désacylation qui seront présentées plus loin, l'information mécanistique provient des constantes de vitesse obtenues lors de la réaction d'une quantité connue d'enzyme avec une quantité connue de substrat. La vitesse observée suit alors le modèle hyperbolique proposé en 1913 par Michaelis et Menten :

$$V_{\text{observée}} = \frac{V_{\text{max}} \times [\text{S}]}{K_{\text{M}} + [\text{S}]}$$

Dans cette équation, la vitesse observée ($V_{\text{observée}}$) dépend de la concentration de substrat ($[\text{S}]$) selon une relation hyperbolique. Le K_{M} correspond mathématiquement à la concentration de substrat résultant en une vitesse observée égale à la moitié de la vitesse maximale et dépend de la facilité avec laquelle l'enzyme se lie efficacement avec le substrat. V_{max} représente la vitesse maximale de libération de produit que peut engendrer la quantité d'enzyme présente en solution et est donc une mesure de la rapidité de la réaction ayant lieu entre l'enzyme et le substrat lié. Pour comparer des vitesses obtenues avec des quantités différentes d'enzyme, il faut diviser la valeur de V_{max} obtenue par la concentration d'enzyme utilisée et ainsi obtenir le k_{cat} , la constante de vitesse de catalyse. On peut alors comparer, pour tous les substrats étudiés, les valeurs de K_{M} , k_{cat} ou même les ratios $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$. Ces derniers représentent réellement l'efficacité catalytique de l'enzyme pour ce substrat.

Structure des agents acylants et substrats analogues

Deux types d'agents acylants ont été choisis (voir figure 2.2). D'abord, par simplicité, divers dérivés (**4**, **5** et **6**) ne possédant qu'une chaîne alkyle courte ont été achetés ou synthétisés (voir plus loin pour les détails de la synthèse) pour être utilisés lors des essais cinétiques chimiques. Leur étude a permis de rapidement réaliser que les dérivés carbamates n'allaient pas être suffisamment stables pour être utilisés. En effet, le N-éthyl-O-*p*-nitrophényl carbamate se réarrange rapidement en solution aqueuse pour éliminer le *p*-nitrophénolate et donner l'isocyanate correspondant. Ce phénomène était déjà connu^{10.11.12.13}.



X=CH ₂	1	4
X=O	2	5
X=S	3	6

Figure 2.2: Choix des agents acylants et substrats analogues utilisés lors des études d'acylation.

Une deuxième série de composés (**1**, **2** et **3**), légèrement plus difficiles à obtenir a été développée simultanément aux études de cinétique chimique de la première série. Cette deuxième série de composés a été élaborée pour contenir certains éléments de structure essentiels à leur bonne reconnaissance par l'enzyme. Tel que discuté précédemment (voir chapitre 1 : introduction), les éléments typiquement reconnus

comme contribuant à la bonne liaison du substrat dans la cavité du site actif de la transglutaminase sont les suivants :

- Une portion hydrophobe planaire en N-terminal de la glutamine (ou de l'analogue de glutamine), ici un groupement N-benzyloxycarbone.

- Une configuration L de l'acide aminé central.

- Une chaîne latérale non ramifiée et contenant au moins deux atomes lourds avant le carbone.

- Finalement, l'ajout d'une glycine n'est pas nécessaire mais l'éloignement de la charge négative du carboxylate augmente typiquement l'affinité du substrat par un facteur d'environ dix¹⁴. Une glycine a donc été ajoutée aux agents acylants synthétisés pour en faire des dipeptides.

Synthèse des substrats analogues

La synthèse des analogues *p*-nitrophénylés (**1**, **2** et **3**) de la glutamine a eu lieu selon des voies de synthèse très similaires. Tous les produits et solvants utilisés provenaient des compagnies Sigma-Aldrich et Fluka et ont été utilisés sans purification additionnelle.

La première étape de la synthèse de l'ester activé de l'acide glutamique (**1**) est la protection de la fonction amine de l'acide aminé par un groupement *N*-benzyloxycarbonyle, groupe faisant partie du motif de reconnaissance désiré et donc maintenu tout au long de la synthèse. Cette protection classique se déroule avec un rendement acceptable et a l'avantage de donner un produit suffisamment propre pour passer directement à l'étape suivante sans qu'il ne soit nécessaire d'effectuer une purification plus rigoureuse.

Pour la formation du lien amide entre l'acide glutamique et la glycine, l'utilisation de la forme anhydride de l'acide glutamique comme espèce activée avait l'avantage d'être peu coûteuse et le désavantage de résulter en un mélange d'amide α et γ dans un ratio de 1 :1. Il est bon de mentionner ici que l'identification des deux isomères par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire nécessite une concentration fixe d'analyte (3 mg/mL) à laquelle seul les signaux des hydrogènes des fonctions amide et carbamate différent d'un isomère à l'autre (5,8 ppm et 7,0 ppm pour l'isomère α , 6,0 ppm et 6,5 ppm pour l'isomère γ).

Une fois l'isomère α isolé et purifié par chromatographie sur gel de silice, la formation de l'ester de *p*-nitrophényle à partir du chloroformate de *p*-nitrophényle a eu lieu suivant une procédure déjà rapportée dans la littérature par notre groupe de recherche¹⁵.

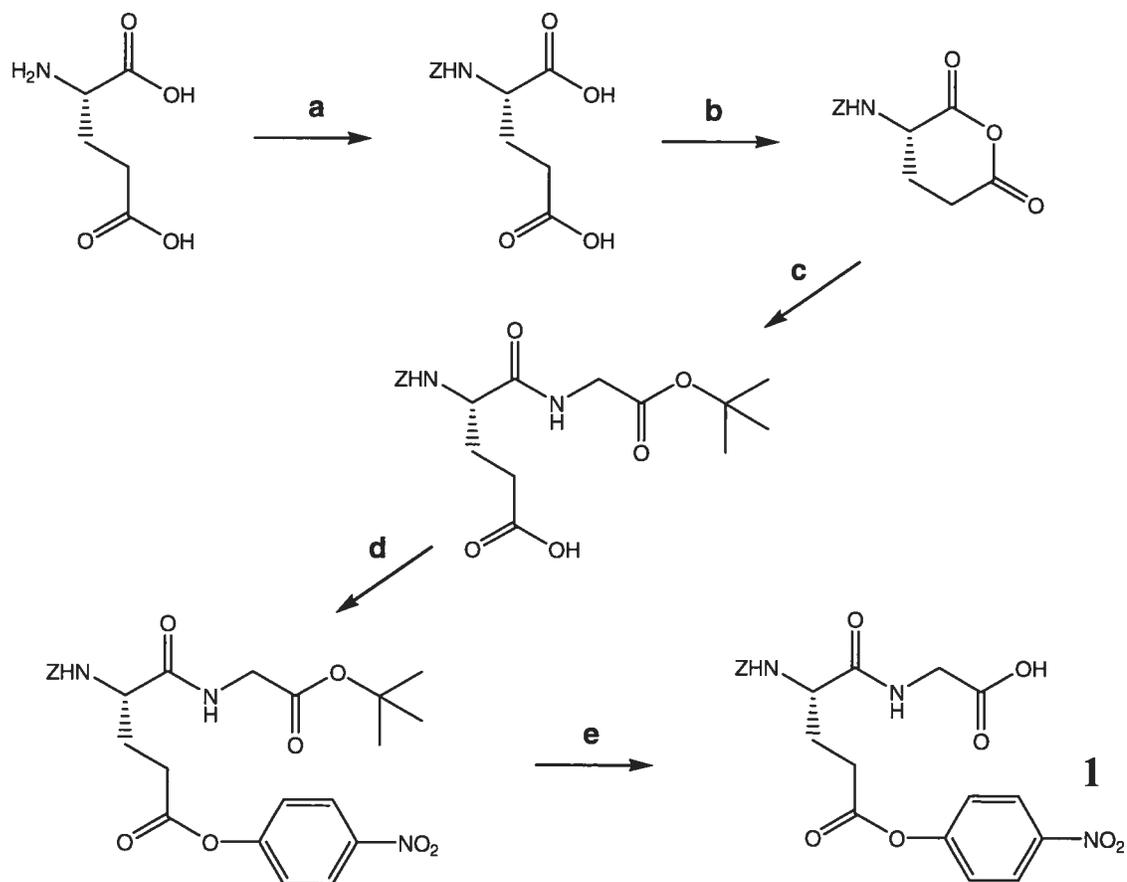


Figure 2.3: Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényl)-L-glutaminylglycine (**1**). **a**) CbzCl, NaHCO₃; **b**) Ac₂O, Δ; **c**) GlyOtBu, Et₃N; **d**) pNPCOCl, Et₃N; **e**) TFA

Finalement, la déprotection quantitative de l'ester de *tert*-butyle par l'acide trifluoroacétique a eu l'avantage de ne dégager que des produits secondaires volatiles, ne nécessitant donc pas d'étape de purification supplémentaire en fin de synthèse autre qu'un séchage complet et une longue séance *in vacuo*. Cet objectif d'effectuer un minimum de manipulations est souhaitable lorsqu'on travaille avec un ester *p*-nitrophénylique, fonction relativement sensible à l'hydrolyse et à la décomposition thermique. Le rendement global de cette synthèse est de 21%.

Pour la synthèse du carbonate activé isostère de l'acide glutamique (**2**), la première étape a également été la protection de la fonction amine par un groupement N-

benzyloxycarbonyle, groupe faisant partie du motif de reconnaissance désiré. Le produit était encore une fois suffisamment propre (~90%) pour passer directement à l'étape suivante sans purifier plus. Pour la formation du lien amide entre la sérine et la glycine, l'utilisation d'un agent de couplage classique, le O-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tétraméthyluronium tétrafluoroborate (TBTU) s'est avérée efficace bien que plus coûteuse que la formation d'un anhydride comme dans la synthèse décrite plus haut.

Une fois le dipeptide isolé par chromatographie sur gel de silice, la formation du carbonate de *p*-nitrophényl à partir du chloroformate de *p*-nitrophényle a eu lieu sans difficulté, mise à part la sensibilité du carbonate à la chaleur, à la lumière et à l'humidité. Finalement, la déprotection quantitative de l'ester de tert-butyle par l'acide trifluoroacétique a permis d'obtenir le produit final désiré avec un rendement global de 32%.

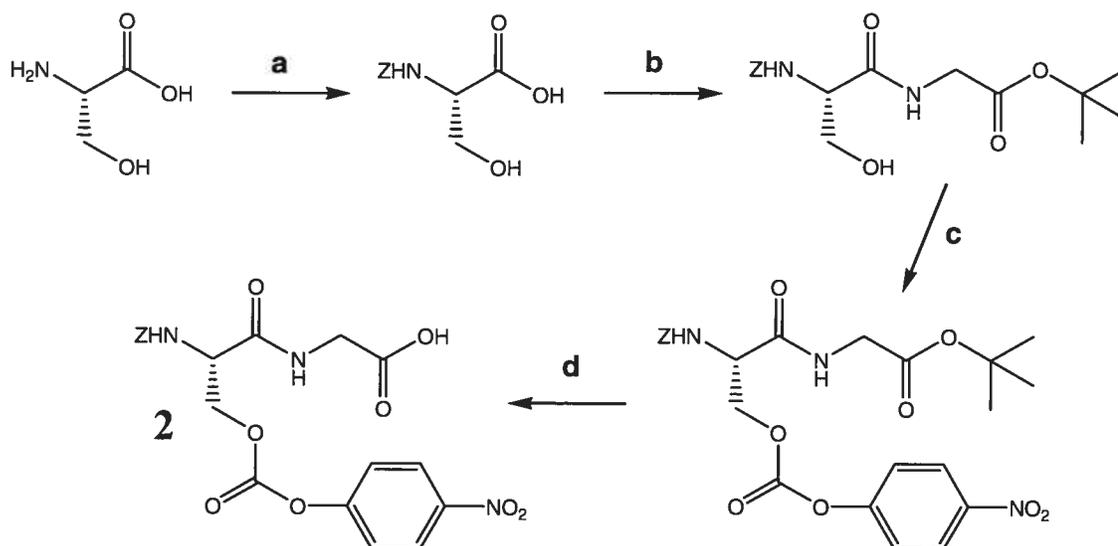


Figure 2.4: Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényloxycarbonyl)-L-sérinyglycine (2). **a**) CbzCl, NaHCO₃; **b**) GlyOtBu, TBTU, DIEA; **c**) pNPCOCl, Et₃N; **d**) TFA

Finalement, pour la synthèse du thiocarbonate activé (3), la première étape a également été la protection des fonctions amines de la cystine, le dimère de la cystéine,

par des groupements N-benzoyloxycarbonyle, suivie du couplage peptidique avec deux glycines. Pour effectuer cette étape, l'utilisation du TBTU comme agent de couplage s'est avéré efficace.

Une fois le dipeptide isolé par chromatographie sur gel de silice, plusieurs méthodes de réduction ont été tentées pour obtenir le N-carbobenzoyloxy-cystéinyglycinate de tert-butyle. Bien que la plupart aient permis de réduire au moins partiellement le pont disulfure, c'est l'utilisation de borohydrure de sodium suivit de lavages acides qui s'est avérée être la méthode la plus propre et s'est également avérée être quantitative. La formation de la fonction thiocarbonate à partir du chloroformate de *p*-nitrophényle a eu lieu sans difficulté et la déprotection quantitative de l'ester de *tert*-butyle par l'acide trifluoroacétique a permis d'obtenir le produit final désiré avec un rendement global de 40%.

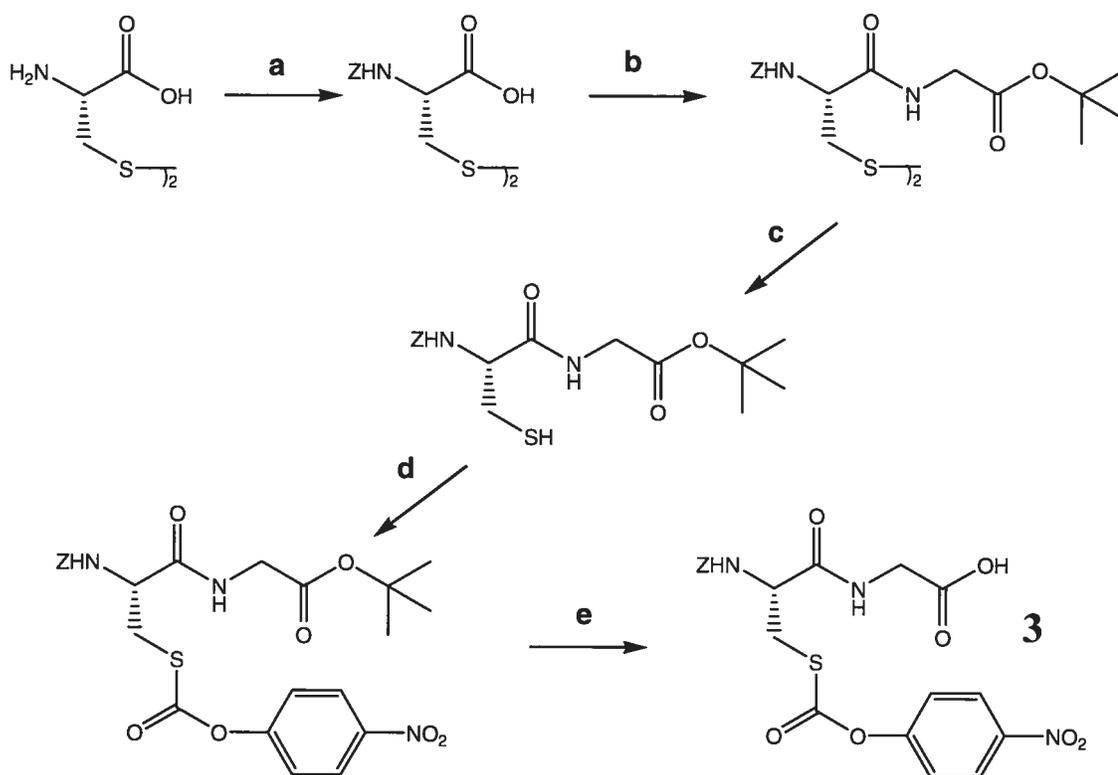


Figure 2.5: Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-cystéinyglycine (**3**).

a) CbzCl, NaHCO₃; **b)** GlyOtBu, TBTU, DIEA; **c)** NaBH₄; **d)** pNPCOCl, DIEA; **e)** TFA

Principes de fonctionnement de l'appareil « Stopped-Flow »

La réaction d'acylation étant une réaction très rapide et n'étant pas l'étape limitante du cycle catalytique de la réaction enzymatique, il faut, pour pouvoir l'observer adéquatement, utiliser un appareil permettant de mesurer des absorbances sur une échelle de temps plus courte que le temps nécessaire à l'établissement de l'état stationnaire limité par la désacylation.

L'appareil utilisé ici est un spectrophotomètre de type « Stopped-flow » SX18MV, de marque «Applied Photophysics Ltd. ».

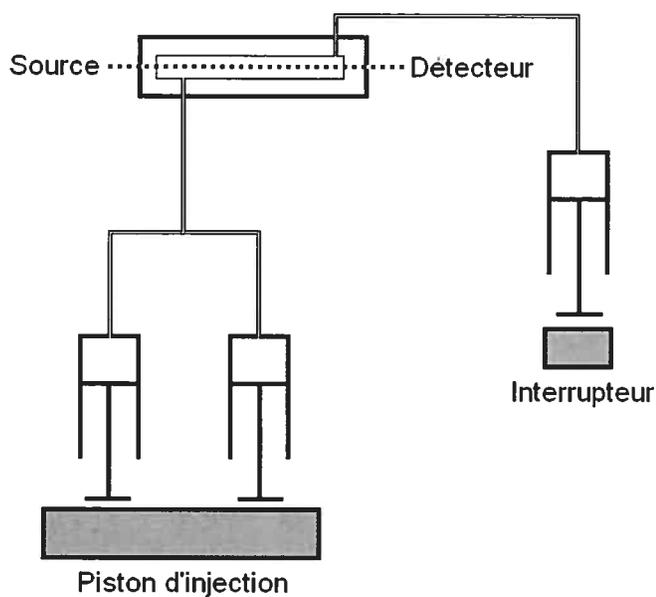


Figure 2.6: Schéma conceptuel de l'appareil « Stopped flow ».

Cet appareil permet de mesurer des variations d'absorbance, d'intensité de fluorescence ou de dichroïsme circulaire. Son principal avantage demeure la vitesse d'homogénéisation des liquides injectés et la rapidité de déclenchement de l'acquisition suite au début de la réaction. Le temps mort rapporté par le fabricant est de 3 ms. Dans les faits, avec le système à deux solvants et à deux volumes d'injection asymétriques

utilisé, il est plutôt de 10-30 ms. Cette valeur est une estimation empirique basée sur l'aspect apparemment aléatoire des absorbances mesurées dans cet intervalle de temps, d'une injection à l'autre. Ces points de données ont été systématiquement négligés lors de la détermination des vitesses initiales d'acylation étudiées.

L'injection des solutions contenues dans les deux seringues d'injection se fait par compression des seringues sous l'effet d'une pression de 32 psi d'azote sur le piston d'injection. Les deux solutions sont alors injectées et mélangées dans un ratio ne dépendant que du ratio du carré des rayons des seringues d'injection. On dit du mélange qu'il est symétrique si les deux seringues sont identiques. Ici, le ratio des volumes injectés est de dix pour un, les aires des sections des seringues ayant ce ratio.

Suite au mélange des deux solutions, le nouveau mélange pousse de la cellule le liquide de l'injection précédente, envoyant celui-ci dans la seringue d'arrêt. Lorsqu'une quantité prédéterminée de liquide a circulé dans la cellule et a rempli la seringue d'arrêt, le piston de celle-ci fait contact avec un interrupteur coupant immédiatement l'apport en azote du piston d'injection et déclenchant le début de l'acquisition de données. Il est essentiel que le volume accepté par la seringue d'arrêt soit supérieur au volume de la cellule pour s'assurer que tout le liquide de l'injection précédente soit remplacé par le nouveau mélange, sans qu'il n'y ait de contamination d'une injection à l'autre. Le volume de la cellule est de 100 μL avec un trajet optique de 10 mm.

Résultats des études de cinétiques chimiques (effectuées par Danielle Lapierre)

Les constantes de vitesses de pseudo-premier ordre de l'acylation de l'éthanethiol et de la cystéamine ont été mesurées en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis de marque Cary Varian 100 Bio. Les réactions ont été suivies à 400 nm pour mesurer les constantes de vitesse de relâchement de *p*-nitrophénolate à diverses concentrations. Ces constantes de vitesse sont rapportées à la figure 2.7 et servent à déterminer les constantes de vitesse de deuxième ordre des réactions d'hydrolyse des trois composés initialement étudiés (4, 5 et 6).

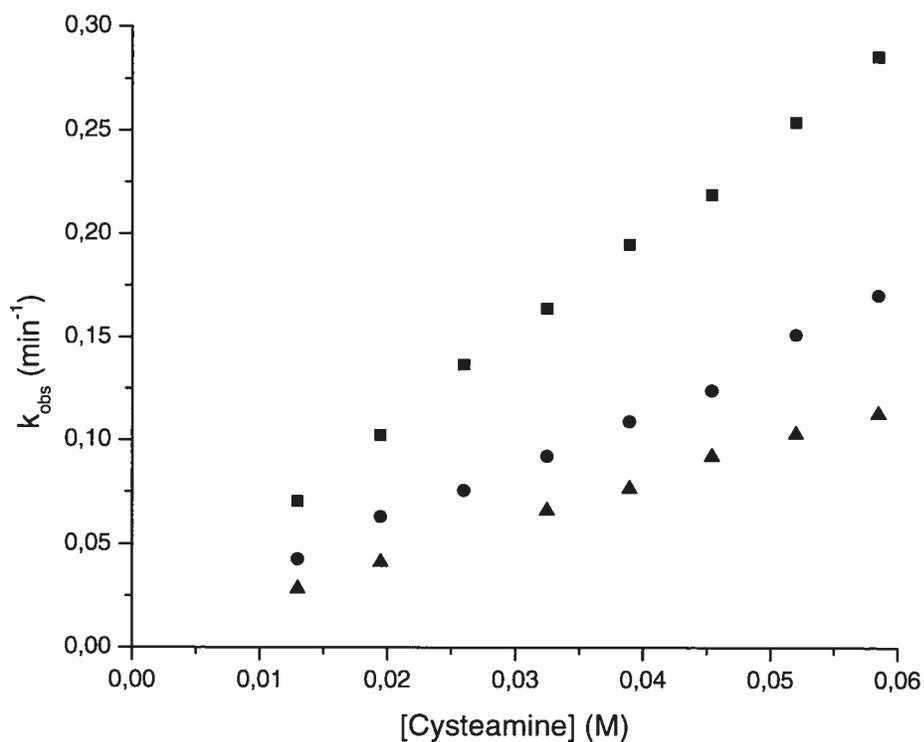


Figure 2.7: Détermination des constantes de deuxième ordre de la thiolysse des dérivés ester 4 (■), carbonate 5 (▲) et thiocarbonate 6 (●) par la cystéamine.

Une bonne corrélation des constantes de vitesse de pseudo premier ordre a été observée pour toutes les réactions étudiées et seul l'exemple de la figure 2.7 est présenté dans ce document. Pour plus de détails, voir les travaux de maîtrise de Danielle Lapierre⁹. Les mesures ont été effectuées aux pH de 7 et 8, avec deux nucléophiles, la cystéamine et l'éthanethiol. Toutes les constantes de vitesse ainsi mesurées sont rapportées au tableau 2.1.

Substrat	Nu = cystéamine pK _a =8,35 et 10,49				Nu = éthanethiol pK _a =10,35			
	pH=7,00±0,01 <i>f</i> _{RS} =0,0428		pH=8,00±0,01 <i>f</i> _{RS} =0,309		pH=7,00±0,01 <i>f</i> _{RS} =0,000446		pH=8,00±0,01 <i>f</i> _{RS} =0,00447	
Ester 4	4,65 ± 0,07	109 ± 2	30,4 ± 0,9	98 ± 3	0,056 ± 0,004	126 ± 9	0,66 ± 0,06	148 ± 13
Carbonate 5	1,89 ± 0,03	44,2 ± 0,7	11,1 ± 0,4	36 ± 2	0,0092 ± 0,001	21 ± 2	0,155 ± 0,002	34,9 ± 0,4
Thiocarbonate 6	2,7 ± 0,1	63 ± 2	17,9 ± 0,6	58 ± 2	0,038 ± 0,009	85 ± 20	0,191 ± 0,006	43 ± 1

Tableau 2.1: Constantes de vitesse de deuxième ordre (k_2) pour la thiolysse à 25 °C, exprimées en $M^{-1}min^{-1}$.

Les valeurs en caractères gras sont les valeurs normalisées pour la fraction de thiolate présente au pH donné (f_{RS}).

Dans le but éventuel de comparer les divers nucléophiles entre eux, la fraction de ces derniers sous forme de thiolate a été calculée en utilisant l'équation de Henderson-Hasselbalch et les valeurs de pK_a présentées dans le tableau 2.1. Les vitesses observées ont été normalisées en les divisant par ces fractions pour obtenir des constantes de deuxième ordre tenant compte de la dissociation des paires thiols/thiolates.

Il peut être constaté dans un premier temps que la correction des vitesses en fonction de la fraction de thiolate présent aide à rendre concordantes les mesures prises à un pH de 7,00 et un pH de 8,00. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle l'espèce effectuant l'attaque nucléophile est bel et bien le thiolate en non pas le thiol.

Dans un deuxième temps, il est visible qu'une tendance peut être établie entre les divers agents acylants. En effet, et de façon attendue, l'ester 4 semble être un meilleur électrophile, suivi du thiocarbonate 6 et du carbonate 5, respectivement. Cette tendance

concorde avec l'idée voulant que les formes de résonance du carbonate accentuent la densité électronique moyenne de son carbonyle par rapport au thiocarbonate et à l'ester, l'oxygène étant un meilleur donneur de doublet que ne l'est le soufre. Le carbone, lui, n'a tout simplement pas de doublet à donner. Cette tendance est aussi visible au niveau du déplacement chimique des carbones des fonctions carbonyles, en RMN du ^{13}C . On observe en effet un plus grand blindage pour le carbonate ($\delta = 156,2$ ppm) que pour le thiocarbonate ($\delta = 170,0$ ppm) et l'ester ($\delta = 170,9$ ppm).

Finalement, la comparaison des constantes de vitesses corrigées obtenues pour l'éthanethiol et la cystéamine montre qu'aux pH étudiés, la présence d'une fonction amine ne semble pas influencer clairement la nucléophilie des thiols, si ce n'est qu'en affectant leur pK_a s et donc, la fraction de ceux-ci existant sous la forme nucléophile de thiolate.

Résultats des études de cinétiques enzymatiques

Pour mesurer les valeurs cinétiques des vitesses d'acylation de la transglutaminase par les agents acylants de la deuxième série (**1**, **2** et **3**, voir figure 2.2), la méthode de « stopped flow » a été utilisée. Dans tous les cas, une solution contenant des concentrations variables en substrat activé, préparées dans l'acétonitrile anhydre étaient placées dans la plus petite seringue. La plus grande seringue d'injection contenait quant à elle 110 mM de tampon MOPS (pH=7,0), 3,3 mM de CaCl_2 , pour activer l'enzyme, 55 μM d'EDTA pour trapper les ions divalents pouvant interférer avec l'enzyme et environ 2-3 μM de transglutaminase. Les réactions étaient suivies sur une période de temps de 10 à 100 secondes, selon les cas, avec une échelle de temps d'acquisition de type logarithmique, permettant ainsi d'obtenir un plus grand nombre de points de données en début de réaction. La température était fixée à 25°C par un bain thermostaté de marque *Isotemp 1016P*, de Fisher Scientific©. Le parcours optique était de 10 mm et le monochromateur était fixé à 400 nm avec une fente de 2,50 nm.

Cinétique d'hydrolyse enzymatique de la N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényl)-L-glutaminyglycine (1)

La réaction d'hydrolyse de l'ester activé (1) a présenté un profil cinétique tel qu'attendu. En effet, une courbe biphasique de la croissance du signal d'absorbance en fonction du temps a montré la présence d'une phase pré stationnaire rapide dont l'amplitude (1,5 μM de *p*-nitrophénol) correspond assez bien à la quantité d'enzyme utilisée lors du test (2,2 μM de transglutaminase). En effet, la pente rapide observée au début d'une réaction de ce type doit avoir une amplitude stoechiométrique avec la quantité du réactif limitant, étant dans ce cas-ci l'enzyme. La légère différence entre l'amplitude attendue et observée peut être attribuée à la présence d'impureté dans l'échantillon de protéine utilisé. Il est en effet utopique de croire qu'il est possible d'obtenir un échantillon parfaitement pur d'une enzyme parfaitement active. Des impuretés sont toujours présentes, causant une surestimation de la quantité réelle d'enzyme présente. Un écart de 30% entre les valeurs obtenues et attendues est donc ici très acceptable.

Suite à l'augmentation rapide de l'absorbance lors de la phase pré-stationnaire, une deuxième phase, plus lente et d'une vitesse constante jusqu'à la fin de l'intervalle de temps étudié a été observée. Cette vitesse étant plus grande que la vitesse d'hydrolyse chimique observée pour le contrôle non-enzymatique, on peut raisonnablement croire qu'il s'agit de la vitesse d'hydrolyse enzymatique de l'ester par la transglutaminase. Un exemple de profil cinétique obtenu est présenté à la figure 2.8.

Chaque séquence de sept injections a été analysée de la même façon. D'abord, les premières et deuxièmes injections sont généralement à rejeter car elles sont souvent incohérentes avec les cinq injections subséquentes. Parmi les injections montrant un profil acceptable, la valeur d'absorbance du blanc est soustraite et une régression linéaire de la première phase est calculée. Les valeurs obtenues pour toutes les injections faites avec une même concentration de substrat sont ensuite moyennées. Les valeurs

ainsi obtenues sont finalement représentées en fonction de la concentration en substrat utilisée pour donner une courbe de saturation comme celle de la figure 2.9.

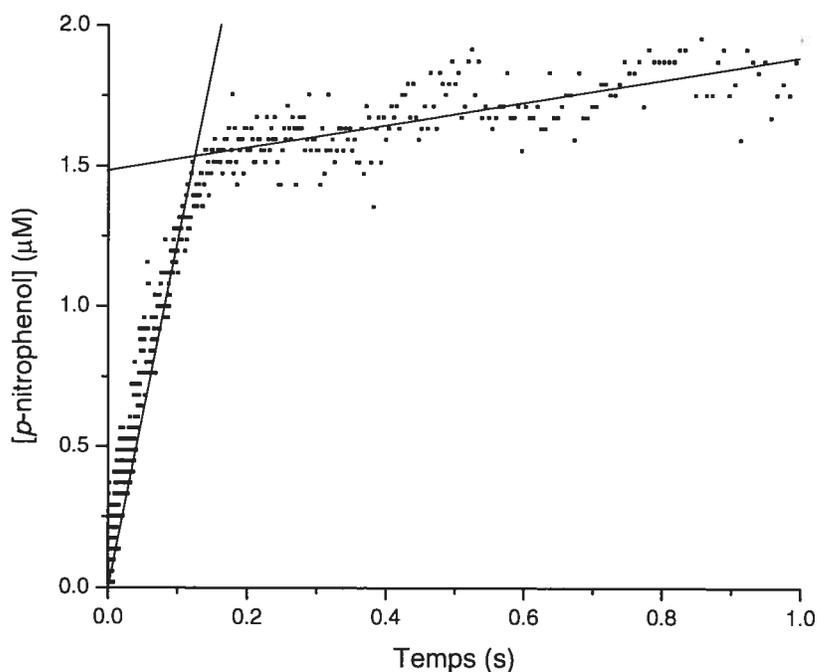


Figure 2.8: Courbe d'acylation de 2,2 μM de transglutaminase tissulaire par 198 μM de N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényl)-L-glutaminyglycine (1). Les valeurs sont corrigées pour l'absorbance du blanc non enzymatique.

La courbe obtenue semble bien présenter l'allure d'une cinétique de saturation et la régression non-linéaire effectuée avec un modèle hyperbolique donne des paramètres cinétiques de $1,5 \pm 0,8 \text{ mM}$ pour le K_M et de $85 \pm 15 \text{ s}^{-1}$ pour la constante de vitesse d'acylation. Ces valeurs sont rapportées au tableau 2.2, un peu plus loin. Les vitesses rapportées dans la figure 2.9 ont été obtenues en convertissant chacune des vitesses de libération du *p*-nitrophénolate observées en utilisant la loi de Beer-Lambert, avec un coefficient d'extinction molaire du *p*-nitrophénolate de $8040 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ et un parcours optique de 1 cm.

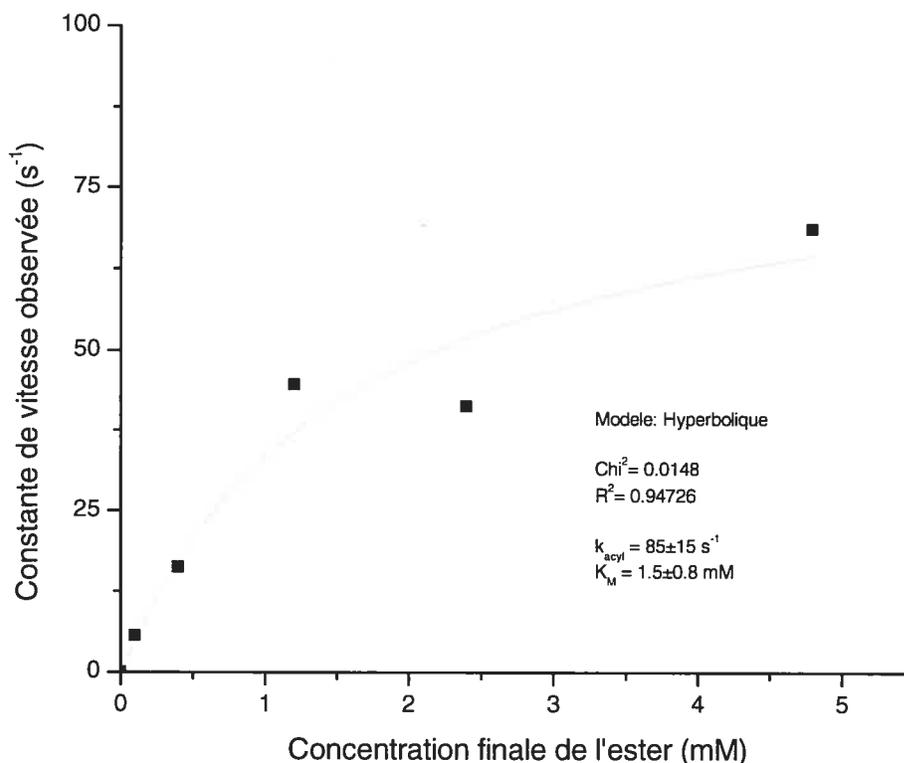


Figure 2.9: Courbe de saturation de la réaction d'acylation de la TGase par la N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophenyl)-L-glutaminyglycine (1). Chaque point est la moyenne de 2 à 5 points de données.

L'incertitude sur les concentrations et les vitesses est respectivement d'environ 5% et 10%.

La valeur du coefficient d'extinction molaire a été calculée préalablement en injectant des solutions de *p*-nitrophénol de concentration connue dans les mêmes conditions expérimentales que pour les tests enzymatiques. Les vitesses obtenues ont ensuite été converties en constante de vitesse d'acylation (k_{acyl}) en les divisant par la concentration d'enzyme utilisée, soit 2,2 μM . Finalement, les constantes de vitesse ainsi obtenues ont été normalisées pour tenir compte de l'activité spécifique de l'enzyme utilisée ce jour là, en ramenant les valeurs à celles qui correspondraient à l'utilisation d'une transglutaminase d'une activité spécifique de 20 U/mg.

Cinétique d'hydrolyse enzymatique de la N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-sérinyglycine (2)

La réaction d'hydrolyse du carbonate (2) a également donné un profil cinétique biphasique dans lequel la phase pré stationnaire peut être clairement observée. (Voir la figure 2.10). De plus, l'amplitude de la montée rapide d'absorbance ($2,7 \mu\text{M}$), lors de la phase pré stationnaire est comparable à l'amplitude attendue pour une réaction ayant un rapport stœchiométrique de un pour un avec l'enzyme ($2,0 \mu\text{M}$).

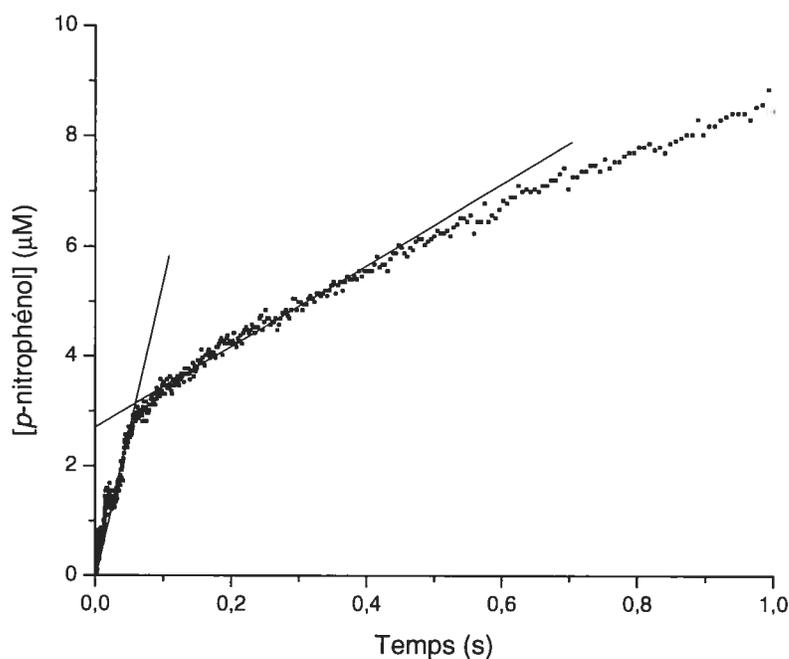


Figure 2.10: Courbe d'acylation de $2,0 \mu\text{M}$ de TGase par $3,1 \text{ mM}$ de N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-sérinyglycine (2). Corrigée pour le blanc non enzymatique.

En plus de ce comportement attendu, une troisième phase a été observée après quelques dizaines de secondes. En effet, la vitesse de relâchement du *p*-nitrophénol tend vers une vitesse semblable à la vitesse d'hydrolyse chimique du composé carbonate

(voir figure 2.11). Cette troisième phase ne peut pas correspondre à un épuisement du substrat car l'hydrolyse complète de celui-ci devrait donner un signal beaucoup plus grand que celui observé après un trentaine de secondes. Il semble donc que la réaction enzymatique observée dans la phase stationnaire, de 0,1 à 1 seconde, soit inhibée en fonction du temps. Le substrat carbonate aurait donc un double rôle : substrat dans un premier temps et inhibiteur dans un deuxième temps.

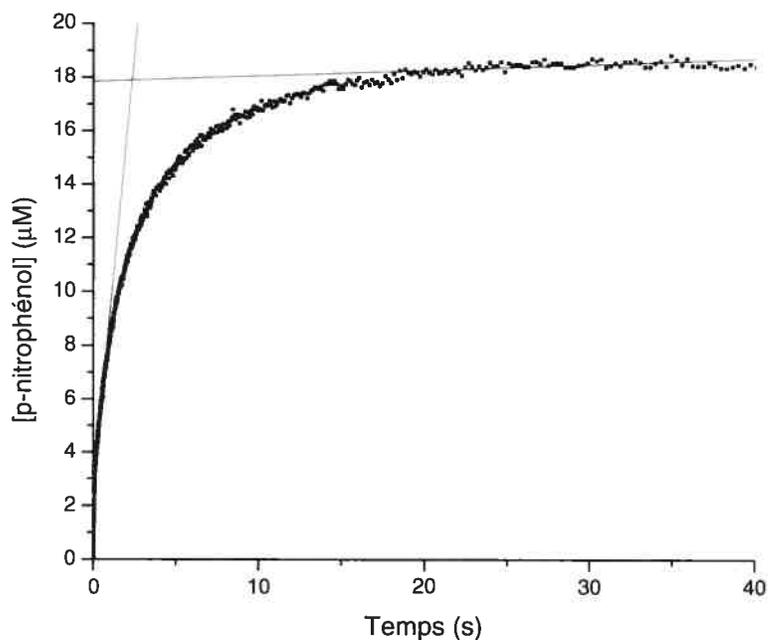


Figure 2.11: Courbe d'acylation de 2,0 µM de transglutaminase tissulaire par 3,1 mM de N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényloxycarbonyl)-L-sérinyglycine (2). Corrigée pour le blanc non enzymatique.

S'il est supposé que la réaction de l'enzyme avec le substrat ne peut avoir que deux dénouements, soient la régénération de l'enzyme libre ou l'inactivation irréversible de l'enzyme, il est possible d'estimer la proportion des réactions entre l'enzyme et le carbonate qui résultent en une formation de produit par rapport aux réactions menant à une telle inhibition. En effet, l'extrapolation jusqu'à l'axe *y* de la deuxième phase de la courbe permet d'estimer que la quantité de produit correspondant à un équivalent

stœchiométrique d'enzyme est de $2,7 \mu\text{M}$. De la même façon, l'extrapolation jusqu'à l'axe y de la troisième phase de la courbe, lorsque la vitesse d'hydrolyse enzymatique est réduite à zéro, nous indique la quantité totale de produit formé par cette réaction enzymatique avant l'inhibition totale de l'enzyme. Dans le cas illustré à la figure 2.11, il s'agit d'environ $17,8 \mu\text{M}$. Le ratio entre ces deux valeurs indique le nombre moyen de cycles catalytiques complets effectués par l'enzyme. Il peut donc être approximé que la transglutaminase effectue, en moyenne, sept cycles catalytiques avant d'être inactivée. La nature de cette inactivation n'est pas encore identifiée mais quelques hypothèses seront discutées plus loin.

Ce phénomène d'inhibition mis à part, le comportement cinétique observé lors de la première seconde permet de déterminer les paramètres cinétiques d'affinité et de vitesse d'acylation de la phase initiale (pré stationnaire). Le traitement des données est le même que pour l'ester. La figure 2.12 montre la courbe de saturation obtenue.

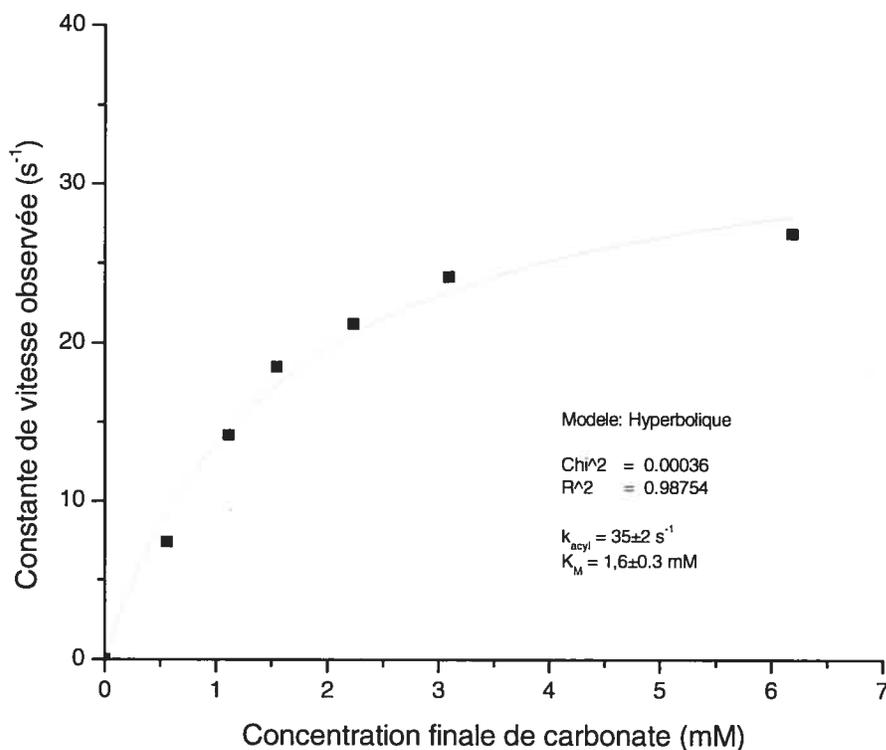


Figure 2.12: Courbe de saturation de la réaction d'acylation de la TGase par la N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-sérinylglycine (2). Chaque point est la moyenne de 2 à 5 points de données. L'incertitude sur les concentrations et les vitesses est respectivement d'environ 5% et 10%.

La courbe obtenue semble bien présenter l'allure d'une cinétique de saturation et la régression non linéaire avec un modèle hyperbolique donne des paramètres cinétiques de $1,6 \pm 0,3$ mM pour le K_M et de 35 ± 2 s⁻¹ pour la constante de vitesse d'acylation. Ces valeurs sont rapportées au tableau 2.2. Ces valeurs sont obtenues par le même traitement mathématique que pour l'ester, la vitesse d'apparition de la coloration jaune (en Abs/s) étant d'abord convertie en une vitesse exprimée en M/s. Ensuite, cette valeur est convertie en constante de vitesse d'acylation (k_{acyl}) en la divisant par la concentration d'enzyme utilisée, soit $2,00E-6$ M, pour donner des constantes de vitesse qui sont finalement normalisées pour tenir compte de l'activité spécifique du lot d'enzyme utilisé ce jour là.

Cinétique d'hydrolyse enzymatique de la N-benzyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophenyloxycarbonyl)-L-cystéinyglycine (3).

La réaction d'hydrolyse du thiocarbonate (3) a, tout comme l'ester et le carbonate, donné un profil cinétique dans lequel la phase pré stationnaire peut être clairement observée. L'amplitude de la montée rapide d'absorbance ($1,2 \mu\text{M}$), lors de la phase pré stationnaire est à peu près comparable à l'amplitude attendue pour une réaction stœchiométrique avec l'enzyme ($1,3 \mu\text{M}$) (voir la figure 2.13).

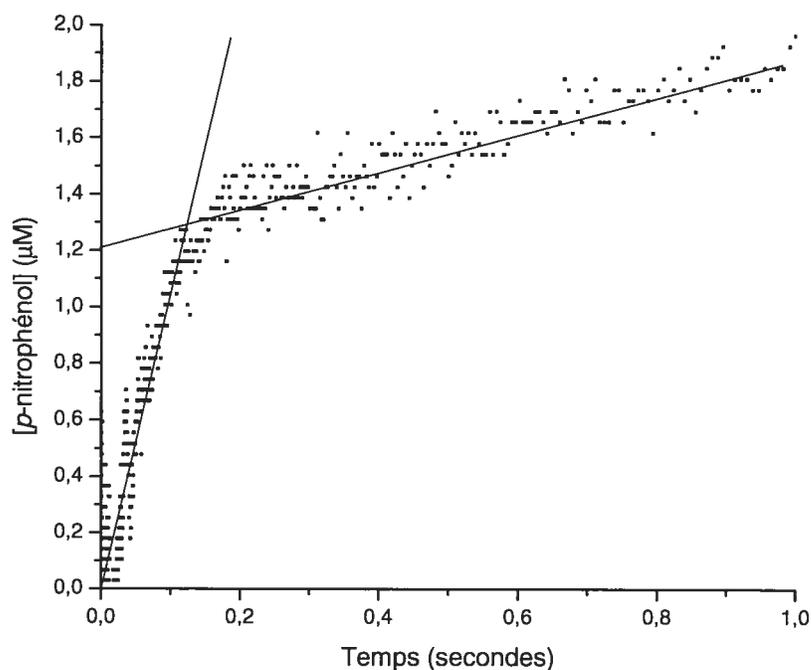


Figure 2.13: Courbe d'acylation de $1,3 \mu\text{M}$ de TGase par $0,1 \text{ mM}$ de N-benzyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophenyloxycarbonyl)-L-cystéinyglycine (3). Corrigée pour le blanc non enzymatique.

En plus de ce comportement attendu, une troisième phase est observée après quelques dizaines de secondes. En effet, la vitesse de relâchement du *p*-nitrophénol tend vers une vitesse semblable à la vitesse d'hydrolyse chimique du composé thiocarbonate

(voir figure 2.14). Le substrat thiocarbonate aurait donc lui aussi un double rôle : substrat dans un premier temps et inactivateur dans un deuxième temps.

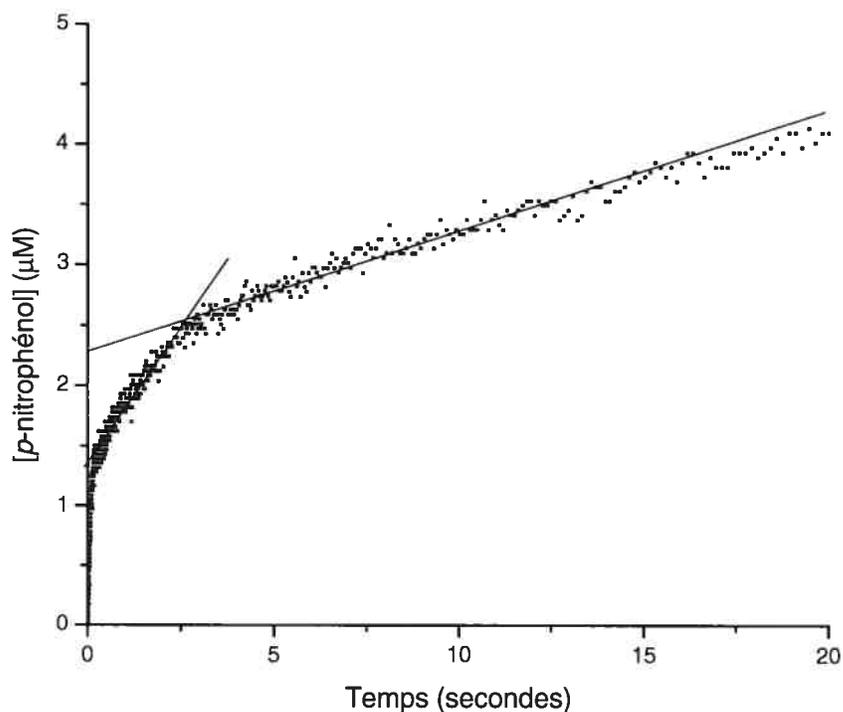


Figure 2.14: Courbe d'acylation de $1,3 \mu\text{M}$ de TGase par $0,1 \text{ mM}$ de N-benzyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-cystéinyglycine (3). Corrigée pour le blanc non enzymatique.

Il est encore possible d'estimer la portion des réactions entre l'enzyme et le thiocarbonate qui résultent en une formation de produit par rapport aux réactions menant à l'inhibition irréversible de l'enzyme. L'extrapolation jusqu'à l'axe des y de la deuxième phase de la courbe permet d'estimer que la quantité de produit correspondant à un équivalent stœchiométrique d'enzyme est d'environ $1,2 \mu\text{M}$. De la même façon, l'extrapolation jusqu'à l'axe des y de la troisième phase de la courbe, lorsque la vitesse d'hydrolyse enzymatique est réduite à zéro, nous indique que la quantité totale de produit formé par cette réaction enzymatique avant l'inhibition totale de l'enzyme, dans le cas illustré à la figure 2.14, est d'environ $2,3 \mu\text{M}$. Le ratio entre ces deux valeurs

indique le nombre moyen de cycles catalytiques complets effectués par l'enzyme, incluant la quantité de *p*-nitrophénol libérée lors de la première phase pré stationnaire. Il peut donc être approximé que la transglutaminase effectue, en moyenne, 2 cycles catalytiques avant d'être inactivée. Les hypothèses concernant cette inactivation seront présentées plus loin.

Les vitesses initiales observées pour la phase initiale d'acylation, avant que l'inhibition ne se manifeste trop, permettent de déterminer les constantes cinétiques d'affinité (K_M) et de vitesse d'acylation (k_{acyl}) (voir la figure 2.15).

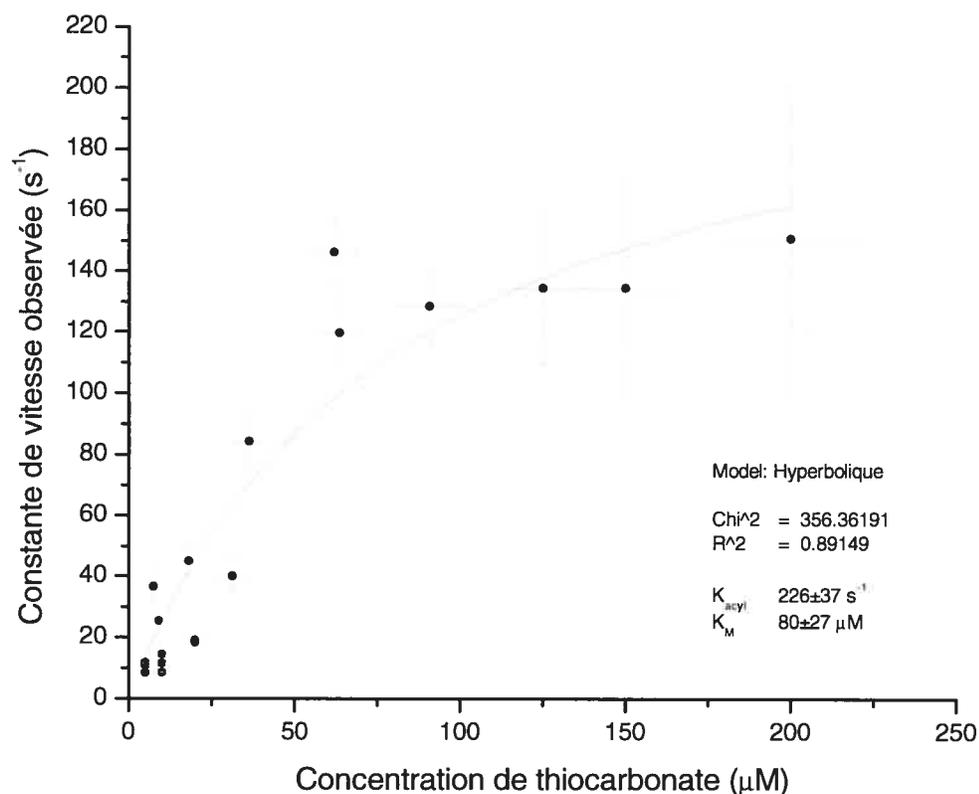


Figure 2.15: Courbe de saturation de la réaction d'acylation de la transglutaminase tissulaire par la N-benzyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-cystéinylglycine (3). Chaque point est la moyenne de 2 à 5 points de données. L'incertitude sur les concentrations et les vitesses est représentée graphiquement.

La courbe obtenue semble bien présenter l'allure d'une cinétique de saturation et la régression non linéaire avec un modèle hyperbolique donne des paramètres cinétiques de $80 \pm 27 \mu\text{M}$ pour le K_M et de $230 \pm 40 \text{ s}^{-1}$ pour la constante de vitesse maximale d'acylation. Ces valeurs, de même que les valeurs obtenues pour le carbonate et l'ester sont rapportées au tableau 2.2. Il faut noter ici la plus grande incertitude observée sur les points de plus haute concentration. Ceci est principalement dû au fait qu'une trop grande vitesse de l'étape pré stationnaire ne permet pas d'obtenir beaucoup de points lors de l'acquisition des données. Les expériences à de hautes concentrations sont donc moins reproductibles et les points rapportés à la figure 2.15 sont donc les moyennes d'un plus petit nombre de d'essais.

Composés	K_M (mM)	k_{acyl} (s^{-1})	k_{acyl}/K_M ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
Ester 1	$1,5 \pm 0,8$	85 ± 15	57 ± 40
Carbonate 2	$1,6 \pm 0,3$	35 ± 2	22 ± 5
Thiocarbonate 3	$0,080 \pm 0,027$	230 ± 40	2800 ± 1400

Tableau 2.2 : Données cinétiques enzymatiques pour l'étape d'acylation des divers agents acylants

L'observation initiale des valeurs cinétiques obtenues montre que l'un des substrats se distingue des autres par sa plus grande affinité et par la rapidité de son acylation. En effet, le thiocarbonate semble être reconnu avec une constante de Michaelis-Menten environ vingt fois plus faible que l'ester et le carbonate et semble subir l'acylation avec une vitesse maximale trois à cinq fois plus grande.

La meilleur affinité peut être rationalisée par le fait qu'il est déjà connu que le site actif est situé au fond d'un canal dont les parois sont hydrophobes et aromatiques (deux tryptophanes et une histidine). La présence d'un soufre, un atome plutôt gros et facilement polarisable est sans doute préférable à celle d'un oxygène. De plus, la liaison

carbone-soufre étant légèrement plus longue que la liaison carbone-carbone ou carbone-oxygène, il est raisonnable de penser que la chaîne latérale, plus longue, pourrait s'insérer mieux et plus profondément dans le tunnel menant au site actif. Si la chaîne latérale est un peu plus longue, il se peut que cela aide au positionnement du carbonyle à proximité du nucléophile du site actif, améliorant ainsi la constante de vitesse d'acylation observée. Il sera intéressant d'étudier l'effet de l'allongement de la chaîne latérale plus en détail, dès que la synthèse du dérivé homoglutamine sera complétée par un autre membre du groupe¹⁶. Par ailleurs, le soufre étant plus polarisable que l'oxygène, il peut avoir de meilleures interactions hydrophobes avec les résidus aromatique formant les parois du tunnel menant au site actif.

L'absence de corrélation entre les vitesses d'acylation enzymatique (tableau 2.2) et les vitesses de deuxième ordre des réactions chimiques correspondantes (tableau 2.1) ne permet que de dire que l'arrangement spatial très stricte du site actif de la transglutaminase dicte la spécificité de la réaction d'acylation et que l'électrophilie du carbonyle utilisée n'influence pas visiblement les paramètres cinétiques de cette réaction, ou qu'il nous est impossible de voir comment l'électrophilie influence la réactivité d'une façon systématique. En effet, une torsion même légère de la géométrie planaire du carbonyle nuira grandement à l'effet de résonance qui rend normalement le carbonate et le thiocarbonate moins électrophiles que l'ester. Ceci peut en partie expliquer la plus grande vitesse de réaction observée pour le thiocarbonate.

Mode d'inactivation

L'origine de l'inactivation de l'enzyme observée lors de la réaction d'hydrolyse du carbonate et du thiocarbonate n'est pas encore expliquée mais quelques hypothèses méritent d'être mentionnées. Le carbonate et le thiocarbonate, contrairement à l'ester, possèdent deux groupements pouvant potentiellement être libérés lors de la dégradation des intermédiaires tétraédriques résultant des attaques nucléophiles de la cystéine sur leurs carbonyles. Il peut donc être supposé que pour un même mode de liaison du

substrat, deux réactions subséquentes puissent avoir lieu. L'une de ces réactions pourrait être celle où l'intermédiaire tétraédrique se décomposerait pour libérer le *p*-nitrophénol et l'autre réaction pourrait être celle où le groupement sérine (dans le cas du carbonate) ou cystéine (dans le cas du thiocarbonate) serait éliminé (figure 2.16 A). Ce deuxième acyle enzyme ainsi obtenu pourrait avoir de la difficulté à subir l'étape de désacylation, ce qui piègerait l'enzyme dans une forme inactive, ou, il pourrait réagir avec un deuxième nucléophile, ce qui piègerait l'enzyme sous une forme inactive. Les deux voies réactionnelles postulées auraient dans les cas présents des coefficients de partage d'environ 7 : 1 pour le carbonate et 2 : 1 pour le thiocarbonate, tel qu'expliqué aux pages 48 et 52.

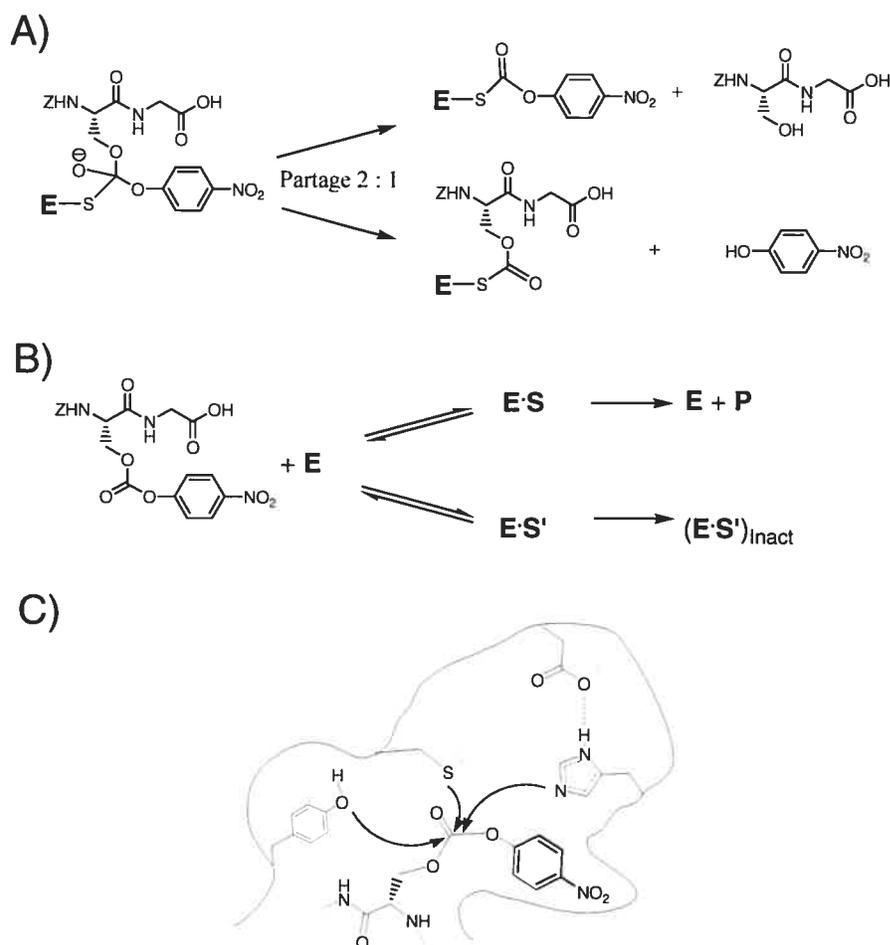


Figure 2.16: Hypothèses d'inactivation. A) Deux décompositions de l'intermédiaire tétraédrique différentes. B) Deux modes de liaisons différents. C) Diverses attaques nucléophiles différentes.

Une autre hypothèse envisageable est que le substrat peut en fait se lier de deux façons distinctes, chacune engendrant une espèce différente dont l'une serait piégée et l'autre fonctionnelle (figure 2.16 B). Finalement, une troisième hypothèse serait la possibilité qu'un nucléophile différent fasse l'attaque sur le carbonyle. En effet, quelques autres nucléophiles sont présents au site actif et il n'est pas impossible que la liaison du carbonate positionne le carbonyle pour accommoder un nucléophile différent, comme la tyrosine ou, plus probablement, l'histidine (figure 2.16 C).

Ces deux dernières hypothèses peuvent jusqu'ici sembler moins probables du fait que l'ester activé, un isostère du carbonate et du thiocarbonate ne présente pas le même comportement que ces molécules bien qu'il soit raisonnable de supposer qu'il emploie le même mode de liaison. De plus, les coefficients de partition entre le comportement normal et l'inhibition de l'enzyme concordent assez bien au modèle de la première hypothèse. En effet, le thiolate étant un meilleur groupe partant que l'alcoolate, un coefficient de partage favorisant d'avantage l'inhibition est attendu pour le thiocarbonate par rapport au carbonate. Ici, le coefficient de partage observé pour le thiocarbonate est d'environ 2 alors que le coefficient de partage pour le carbonate est de 7. Cela revient à dire que lors de la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique, le thiolate (cystéinyl) est un groupe partant à peu près aussi efficace que le *p*-nitrophénol alors que l'alcoolate (sérinyl) est un groupe partant six à sept fois moins efficace. Cela semble raisonnable, compte tenu des pK_a s des deux groupe partant impliqués. En effet, l'acidité de la sérine ($pK_a \cong 15$) et de la cystéine ($pK_a \cong 8$) montre que cette dernière devrait être un meilleur groupe partant, étant plus nucléofuge. Les expériences de spectrométrie de masse qui suivent montreront que les choses ne sont pas ainsi.

Spectrométrie de masse

Pour mieux comprendre ce qui peut s'être passé lors de l'inactivation, une expérience d'incubation simple a été effectuée. Une concentration d'environ 0,4 mg/mL (5 μ M) de TGase a été incubé en présence de 25 mM de l'inhibiteur N-

benzyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-cystéinyglycine (**3**), 3 mM CaCl₂, 50 µM EDTA, dans un tampon 0,1 M Tris pH=7,0, pendant 15 minutes. Des échantillons de cette solution, avant et après l'ajout de l'inhibiteur, ont été injectés sur un système HPLC-MS (1100 series – MSD TOF) de la compagnie Agilent. La colonne utilisée était une colonne Poroshell 300SP-C8 avec débit de 0,35 mL/min et le gradient d'acétonitrile suivant : (0 min, 20%), (6 min, 100%), 7 min, 100%), (7.2 min, 20%), 12 min, 20%). L'analyse par spectrométrie de masse des quelques pics obtenus suite à la chromatographie a permis d'identifier le pic majeur, situé à 4,74 min de temps de rétention comme étant celui de la protéine avant inhibition. La déconvolution des pics de *m/z* allant de 750 à 1500 Da a permis d'associer les signaux obtenus à une masse de 78890 Da. La masse calculée à partir de la séquence est de 78880 Da, ce qui concorde bien à la masse observée.

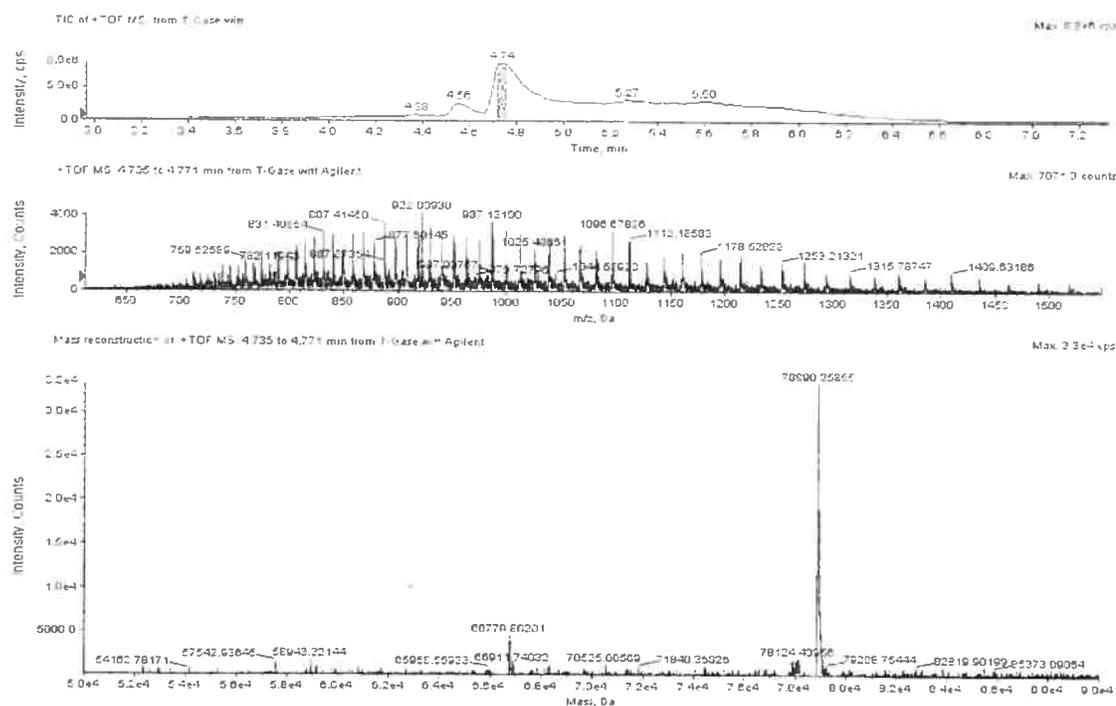


Figure 2.17: Spectre de masse de la TGase avant inhibition. Profil HPLC (haut), signaux intégrés pour la période de 4,735 à 4,771 minutes d'éluion (milieu) et déconvolution des signaux de *m/z* allant d'environ 700 à 1500 Da(bas)

Cette information vient apporter quelques nouvelles hypothèses. D'abord, les deux sites de liaisons sont-ils tout les deux des sites compétitifs? En effet, les liaisons de l'inhibiteur à chacun des deux sites ne nuisent peut-être pas à la liaison normale du substrat avec une même intensité. De plus, la présence de fragments ayant subi un gain de masse équivalent à la portion peptidique de l'inhibiteur vient invalider l'hypothèse de la partition entre les deux décompositions possibles de l'intermédiaire tétraédrique (hypothèse A de la figure 2.16). En effet, il semble n'y avoir aucune trace de l'enzyme sur laquelle serait liée la partie *p*-nitrophénylée de l'inhibiteur. Les deux autres hypothèses mentionnées précédemment, c'est-à-dire la possibilité d'avoir deux modes de liaison distincts et la possibilité que deux nucléophiles différents soient impliqués sont quant à elles de plus en plus probables.

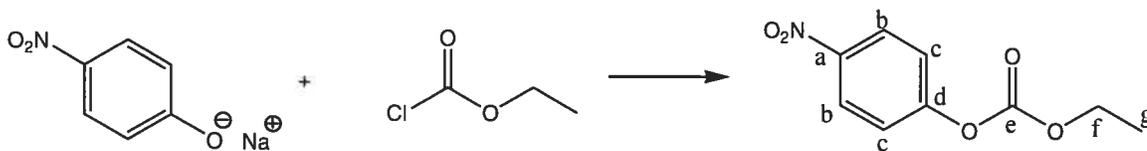
Travaux futurs et conclusion

Il reste un peu de travail à faire pour identifier avec certitude le mode exact d'inhibition ayant lieu lors de la réaction de la transglutaminase avec le carbonate et le thiocarbonate. Des expériences de digestion et d'analyse par spectrométrie de masse pourraient indiquer quelles portions de la chaîne peptidique contiennent les nucléophiles se fixant à l'inhibiteur et pourraient ainsi nous aider à mieux comprendre le mode d'inhibition de l'enzyme par ce composé. Néanmoins, une nouvelle famille d'inhibiteur irréversible de la réaction d'hydrolyse catalysée par la transglutaminase a été découverte et l'observation expérimentale de la phase pré stationnaire de cette hydrolyse a pour la première fois été faite.

La grande affinité du composé thiocarbonate par rapport aux autres composés carbonate et ester (80 μ M vs 1,5 mM) pourrait aussi constituer un élément de plus dans l'optimisation des diverses familles d'inhibiteur en cours de développement. Une meilleure affinité peut en effet garantir une meilleure sélectivité des inhibiteurs pour la TGase. Ceci serait hautement souhaitable pour d'éventuelles utilisations biologiques.

Partie expérimentale

Synthèse du carbonate d'éthyle et de *p*-nitrophényle⁹



À une suspension de *p*-nitrophénoxyde de sodium (20 mmol) dans 20 mL d'acétonitrile anhydre, à 0 °C, sous azote, est ajoutée goutte à goutte une solution de chloroformate d'éthyle (29 mmol) dans 10 mL d'acétonitrile. Le mélange est agité pendant 30 minutes à 0°C et ensuite pendant 3h à température de la pièce. Le solvant est ensuite évaporé *in vacuo* et le solide obtenu est lavé au dichlorométhane pour obtenir 3,2 g du produit final sous la forme d'une poudre blanche.

Rendement : 77%

Rf : 0,74 (100 % AcOEt)

pf 67-68 °C

RMN ¹H : (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 1,30 (3H(g), t, J = 7,1 Hz) ; 4,29 (2H(f), q, J = 7,1 Hz) ; 7,55 (2H(c), d, J = 9,2 Hz) ; 8,31 (2H(b), d, J = 9,2 Hz)

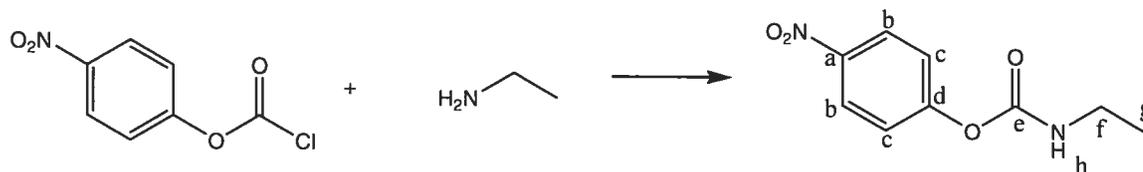
RMN ¹³C : (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 14,77(g) ; 66,11(f) ; 123,50(b) ; 126,25(c) ; 145,97(a) ; 152,86(d) ; 156,17(e)

IR : (KBr, cm⁻¹) 3119, 2918, 1756, 1617, 1597, 1518, 1351, 1304, 1281

Spectre de masse: Calc pour C₉H₉NO₅: 211,048073, Trouvé: 211,048034

Analyse élémentaire : Calc pour C₉H₉NO₅: C, 51,19; H, 4,30; N, 6,63, Trouvé: C, 51,21; H, 4,50; N, 6,37.

Synthèse du N-éthylcarbamate de *p*-nitrophényle⁹



À une solution de chloroformate de *p*-nitrophényl (2,4 mmol) dans 7 mL de benzène, à température pièce, sous azote, est ajouté goutte à goutte 1 mL d'éthylamine 2,0 M dans le THF. Le mélange est agité pendant la nuit à température pièce et est ensuite séché *in vacuo*. Le solide blanc est ensuite repris dans 10 mL d'éther, filtré, lavé avec 2 x 5 mL HCl 0,1 M et 2 x 5 mL NaHCO₃ 5%, séché avec MgSO₄ et concentré *in vacuo* pour donner un solide blanc. Celui-ci est finalement recristallisé dans THF/hexanes pour donner 0,157 g d'un produit sous la forme d'aiguilles blanches.

Rendement : 31%

Rf : 0,67 (Hexanes/AcOEt = 50/50)

pf: 134-135 °C

RMN ¹H : (DMSO-d₆) δ (ppm) 1,09 (3H(g), t, J = 7,2 Hz) ; 3,11 (2H(f), qd, J = 7,2 Hz et J = 5,7 Hz) ; 7,39 (2H(c), d, J = 9,2 Hz) ; 8,04 (1H(h), t, J = 5,2 Hz) ; 8,25 (2H(b), d, J = 9,2 Hz).

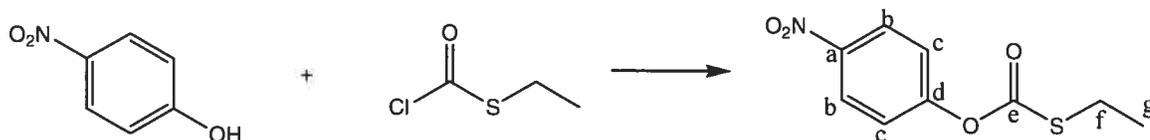
RMN ¹³C : (DMSO-d₆) δ (ppm) 15,59(g) ; 36,27(f) ; 123,34(b) ; 126,06(c) ; 144,92(a) ; 153,76(d) ; 157,11(e)

IR : (KBr, cm⁻¹) 3331, 3085, 2981, 1716, 1642, 1615, 1597, 1544, 1519, 1529, 1346, 1219

Spectre de masse: Calc pour C₉H₁₀N₂O₄: 210,064057, Trouvé: 210,063890

Analyse élémentaire : Calc pour C₉H₁₀N₂O₄: C, 51,43; H, 4,80; N, 13,33. Trouvé: C, 51,21; H, 4,88; N, 13,13.

Synthèse du S-éthylthiocarbonate de *p*-nitrophényle⁹



À une suspension de *p*-nitrophénol (9 mmol) et de pyridine (9 mmol) dans 15 mL de dichlorométhane anhydre, 0°C, sous azote, est ajoutée goutte à goutte une solution de thiochloroformate d'éthyle (9 mmol) dans 4 mL de dichlorométhane. Le mélange est agité pendant 15 min à 0°C et ensuite pendant la nuit, à température pièce. Le mélange est extrait avec 30 mL d'eau et la phase organique est lavée avec 30 mL de NaOH 0,5 M, 30 mL de NaCl saturé et 30 mL d'eau avant d'être séchée avec MgSO₄ et filtrée sur silice avec chloroforme comme éluant. 1,87 g d'une poudre blanche sont obtenus suite à l'évaporation.

Rendement : 93,5%

Rf : 0,58 (100 % CHCl₃)

pf 60-61 °C

RMN ¹H : (DMSO-d₆) δ (ppm) 1,30 (3H(g), t, J = 7,3 Hz) ; 2,97 (2H(f), q, J = 7,3 Hz) ; 7,53 (2H(c), d, J = 9,2 Hz) ; 8,30 (2H(b), d, J = 9,2 Hz).

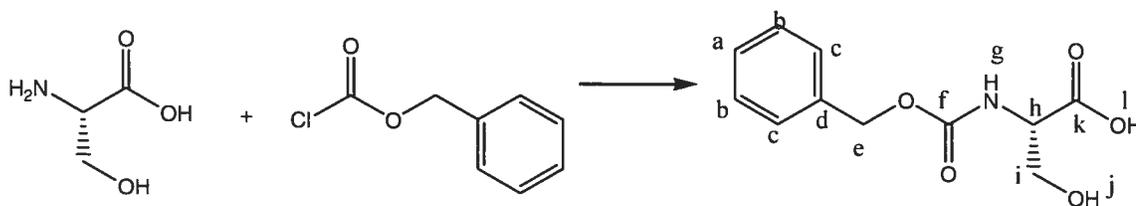
RMN ¹³C : (DMSO-d₆) δ (ppm) 15,54(g) ; 26,32(f) ; 123,72(c) ; 126,33(b) ; 146,14(d) ; 155,98(a) ; 170,01(e)

IR : (KBr, cm⁻¹) 3084, 2973, 2936, 1708, 1621, 1590, 1532, 1490, 1347, 1098.

Spectre de masse: Calc pour C₉H₉NO₄S: 227,025230. Trouvé: 227,024816

Analyse élémentaire : Calc pour C₉H₉NO₄S: C, 47,57; H, 3,99; N, 6,16 ; S, 14,11. Trouvé: C, 47,45; H, 3,86; N, 6,09 ; S, 13,64.

Synthèse de la *N*-benzyloxycarbonyl-L-sérine



0,95 mmol de L-sérine sont ajoutés à une solution de 6,3 mmol de bicarbonate de sodium dans 6 mL d'eau distillée. Une fois complètement dissout, à 0°C, 0,63 mmol de chloroformate de benzyle sont ajoutés goutte à goutte et le mélange est agité pendant 2 heures, à 0°C et ensuite pour la nuit à température pièce. La phase aqueuse est lavée avec 4 x 5 mL d'éther et est ensuite acidifiée jusqu'à un pH de 1 avec HCl concentré. Cette solution est extraite avec 4 x 10 mL d'acétate d'éthyle et ces phases organiques sont combinées, lavées à l'eau et séchées avec MgSO₄ pour être finalement concentrées *in vacuo* pour donner 88 mg d'un produit blanc poudreux.

Rendement : 58%

Rf 0,054 (Hexanes/AcOEt = 70/30)

pf 116-117 °C

[α]_D²⁰ : +5,52 ° (c 1,81 ; AcOH).

RMN ¹H : (CD₃OD) δ (ppm) 3,84 (1H(i), dd, J = 4,0 Hz et J = 11,3 Hz) ; 3,90 (1H(i), dd, J = 4,9 Hz et J = 11,4 Hz) ; 4,28 (1H(h), t, J = 4,4 Hz) ; 5,12 (2H(e), s) ; 7,29-7,39 (5H(a,b,c), m).

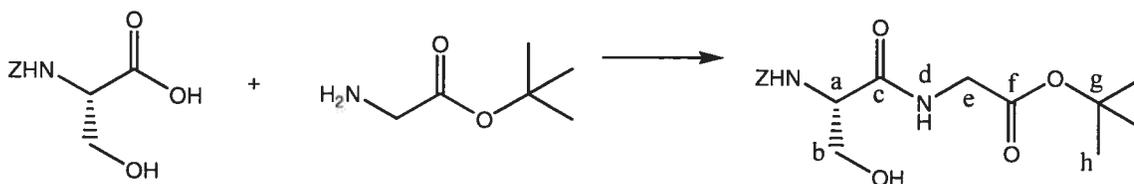
RMN ¹³C : (CD₃OD) δ (ppm) 56,71(h) ; 62,08(i) ; 66,71(e) ; 127,87(a,c) ; 128,46(b) ; 137,14(d) ; 157,60(f) ; 172,75(k).

IR : (KBr, cm⁻¹) 3443-2555, 3319, 3029, 2940, 1748, 1690, 1535, 1478, 1248, 1060,

Spectre de masse: Calc pour C₁₁H₁₃NO₅: 240,08720, Trouvé: 240,08853

Analyse élémentaire : Calc. pour C₁₁H₁₃NO₅: C, 55,23; H, 5,48; N, 5,86. Trouvé: C, 55,10; H, 5,90; N, 5,84.

Synthèse du *N*-benzyloxycarbonyl-L-sérinyglycinate de *tert*-butyle



À une solution de *N*-benzyloxycarbonyl-L-sérine (1,3 mmol) dans 13 mL d'acétonitrile anhydre, sous azote, à température pièce, sont ajoutés goutte à goutte 5,2 mmol de diisopropyléthylamine et la solution est laissée 5 minutes avant que 2,6 mmol de glycine *tert*-butyl ester ne soient ajoutées. Après la dissolution complète de la glycine, 2,6 mmol de TBTU sont ajoutés et le mélange est agité pendant la nuit. Un volume de 50 mL d'acétate d'éthyle est ensuite ajouté et la phase organique est lavée avec 2 x 15 mL NaCl saturé, 15 ml 0,1 M HCl, 15 mL NaHCO₃ 5 % et 15 mL NaCl sat avant d'être séchée avec MgSO₄, filtrée et concentrée *in vacuo* pour donner un produit blanchâtre. Ce produit est purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un éluant 60/39/1 AcOEt/Hexanes/AcOH. 0,66 g d'une poudre blanche sont obtenus.

Rendement : 94%

Rf : 0,33 (Hexanes/AcOEt = 30/70).

pf 67-70°C.

[α]_D²⁰ : -7,71 ° (c 1,75 ; CHCl₃).

RMN ¹H : (CDCl₃) δ (ppm) 1,47 (9H(h), s) ; 3,06 (1H(OH), s) ; 3,70 (1H(a), dd, J = 11 Hz et J = 5,4 Hz) ; 3,95 (2H(b), d, J = 5,5 Hz) ; 4,13 (1H(e), m) ; 4,28 (1H(e), m) ; 5,15 (2H(Cbz), s) ; 7,30-7,42 (5H(Cbz), m).

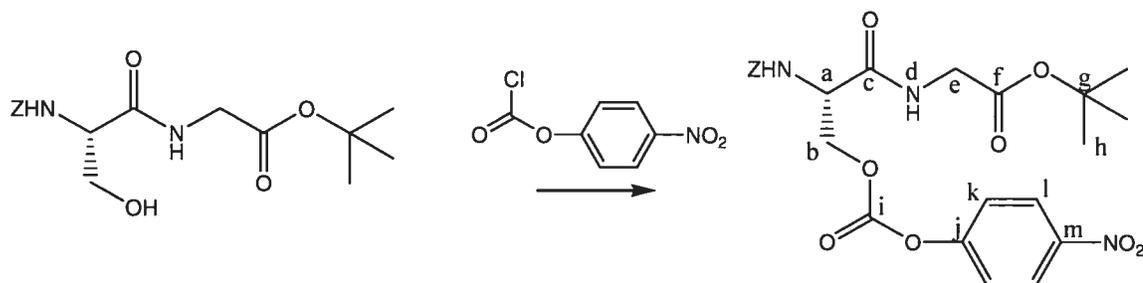
RMN ¹³C : (CDCl₃) δ (ppm) 28,37(h) ; 42,50(e) ; 63,26(a) ; 67,47(Cbz+b?) ; 82,79(g) ; 128,41(Cbz) ; 128,52(Cbz) ; 128,89(Cbz) ; 136,57(Cbz) ; 156,99(Cbz) ; 169,58(f) ; 171,69(c).

IR : (KBr, cm⁻¹) 3379, 3094, 2982, 2894, 1737, 1690, 1659, 1554, 1520, 1466, 1456, 1339, 1062

Spectre de masse: Calc pour C₁₇H₂₄N₂O₆: 353,17126, Trouvé : 353,17230

Analyse élémentaire : Calc pour C₁₇H₂₄N₂O₆: C, 57,94; H, 6,86; N, 7,95. Trouvé: C, 57,78; H, 7,33; N, 8,00.

Synthèse du *N*-Cbz-*O*-*p*-nitrophénoxy-carbonyl-L-sérinyglycinate de *tert*-butyle



À une solution de 1,6 mmol de *N*-Cbz-L-SerGly-*O**t*Bu ester dans 5 mL d'acétonitrile anhydre, sous azote, sont ajoutées goutte à goutte 7,9 mmol de pyridine. La solution est agitée quelques minutes et placée dans un bain de glace. À 0°C, 1,6 mmol de chloroformate de *p*-nitrophényle sont ajoutées et le mélange est agité pour 3 heures. 20 mL d'acétate d'éthyle sont ajoutés et la phase organique est lavée avec 3 x 10 mL HCl 3 mM, séchée sur MgSO₄, filtrée et concentrée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice, avec 30/70 AcOEt/Hexanes comme éluant. 0,51 g d'une poudre blanche sont obtenus. On peut recristalliser dans CH₂Cl₂/ Hexanes.

Rendement : 63%

pf: 52-54°C, **Rf** : 0,37 (Hexanes/AcOEt = 60/40)

$[\alpha]_d^{20}$: +6,87 ° (c 1,50 ; CHCl₃).

RMN ¹H : (CDCl₃) δ (ppm) 1,47 (9H(h), s) ; 3,96 (2H(e), s) ; 4,51 (1H(b), dd, J = 11,1 Hz et J = 4,7 Hz) ; 4,65 (1H(b), dd, J = 11,0 Hz et J = 5,3 Hz) ; 4,72 (1H(a), m) ; 5,17 (2H(Cbz), d, J = 12,0 Hz) ; 5,79 (1H(d), s) ; 6,83 (ppm) (1H(CBzNH), s) ; 7,27-7,37 (7H(Cbz+k), m) ; 8,25 (2H(l), d, J = 9,1 Hz).

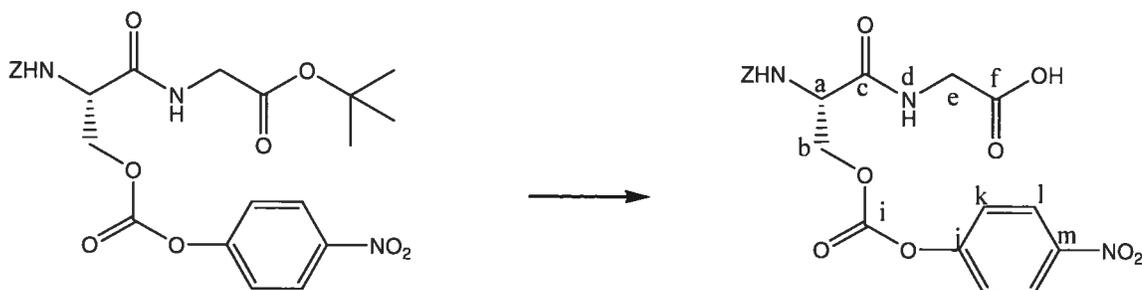
RMN ¹³C : (CDCl₃) δ 28,45(h) ; 42,59(e) ; 53,90(a) ; 68,07(b) ; 68,66(Cbz) ; 83,25(g) ; 122,26(l) ; 125,76(k) ; 128,65(Cbz) ; 128,89(Cbz) ; 129,08(Cbz) ; 145,94(Cbz) ; 152,60(m) ; 155,71(j?) ; 156,55(i?) ; 156,67(Cbz?) ; 168,55(f) ; 168,90(c)

IR : (KBr, cm⁻¹) 3317, 3085, 2980, 2939, 1773, 1737, 1729, 1670, 1594, 1349, 1554, 1520, 1493, 1455, 1214, 1049

Spectre de masse: Calc pour C₂₄H₂₇N₃O₁₀: 518,17749, Trouvé : 518,17630.

Analyse élémentaire : Calc pour C₂₄H₂₇N₃O₁₀ : C, 55,70; H, 5,26; N, 8,12. Trouvé: C, 55,03; H, 5,33; N, 8,04.

Synthèse de la *N*-benzyloxycarbonyl-*O*-*p*-nitrophénoxy-carbonyl-L-sérinyglycine



À une solution de 0,4 mmol de *N*-Cbz-*O*-*p*-nitrophénoxy-carbonyl-L-sérinyglycine *tert*-butyl ester dans 2,5 mL de dichlorométhane anhydre, sous azote, à 0°C, sont ajoutés goutte à goutte 500 µL (6,5 mmol) d'acide trifluoroacétique. La solution est agitée à 0°C pour une heure. Un volume de 300 µL d'acide trifluoroacétique est ajouté et la solution est à nouveau agitée pour 3 heures tout en revenant à température ambiante. Une portion finale de 150 µL d'acide trifluoroacétique est ajoutée et la solution est agitée pour une heure. Tout le liquide est évaporé *in vacuo* pour donner 0,165 g d'un solide jaune.

Rendement : 92%, **Rf** : 0,28 (99/1 AcOEt/AcOH), **pf**: 59-61°C.

$[\alpha]_d^{20}$: +11,0 ° (c 0,96 ; CHCl₃), **RMN** ¹H : (CDCl₃) δ (ppm) 4,12 (2H(e), d, J ≈ 17 Hz) ; 4,50 (1H(b), dd, J = 4,5 (3,8) Hz et J = 10,7 Hz) ; 4,60 (1H(b), dd, J = 6,5 (5,8) Hz et J = 10,9 Hz) ; 4,82 (1H(a), m) ; 5,15 (2H(Cbz), d, J = 11,8 Hz) ; 5,84 (1H(d), s) ; 7,10 (1H(CbzNH), s) ; 7,29-7,39 (7H(Cbz+k), m) ; 8,26 (2H(l), d, J = 9,2 Hz).

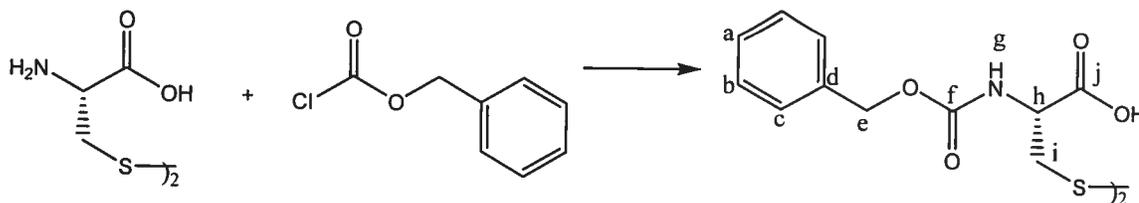
RMN ¹³C : (CDCl₃) δ (ppm) 41,81(e) ; 53,80(a) ; 68,17(b) ; 68,63(Cbz) ; 122,19(l) ; 125,72(k) ; 128,50(Cbz) ; 128,93(Cbz) ; 129,05(Cbz) ; 135,91(Cbz) ; 145,90(m?) ; 152,69(j?) ; 155,53(i ?) ; 157,07(Cbz) ; 169,74(f) ; 172,68(c)

IR : (KBr, cm⁻¹) 3747-2633, 3086, 2968, 1772, 1740, 1734, 1640, 1595, 1351, 1526, 1493, 1455, 1279, 1049.

Spectre de masse: Calc pour C₂₀H₁₉N₃O₁₀: 462,11487, Trouvé: 462,11650

Analyse élémentaire : Calc pour C₂₀H₁₉N₃O₁₀: C, 52,06; H, 4,15; N, 9,11. Trouvé: C, 50,33; H, 4,20; N, 8,41. (Note : La présence de solvant résiduel pourrait expliquer les écarts observés)

Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-cystine



À 1,44 g (5,94 mmol) de L-cystine dans 175 mL d'eau est ajouté 5g (10 éq.) de NaHCO_3 et le tout est amené à 0 °C. 1,70 mL de chloroformate de benzyl est ajouté goutte à goutte et la solution biphasique est agitée vigoureusement pendant la nuit. Le lendemain, on acidifie à pH 3 avec HCl 6N et on extrait avec 3x150 mL d'acétate d'éthyle. Après concentration *in vacuo*, on obtient 3,38 g d'une huile claire utilisée sans plus de purification.

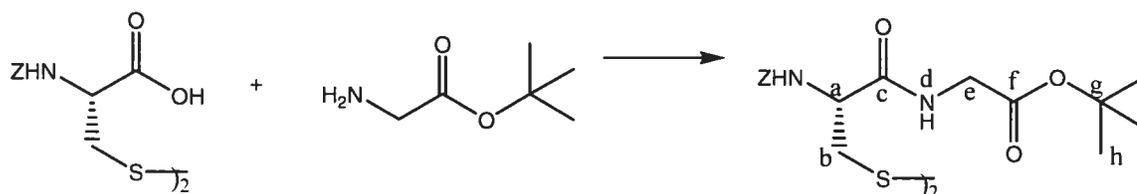
Rendement : 99%

Rf : 0,05 (50/50 AcOEt/Hexanes)

RMN ^1H : (CD_3OD) δ (ppm) 2,98 (1H(i), dd, $J = 9,1$ Hz et 13,9 Hz) ; 3,25 (1H(i), dd, $J = 4,3$ Hz et 13,9 Hz) ; 4,51 (1H(h), dd, $J = 4,3$ Hz et 9,1 Hz) ; 5,07 (2H(e), s) ; 7,27 (5H(a,b,c), m)

RMN ^{13}C : (CD_3OD) δ (ppm) 41,18(i) ; 54,71(h) ; 67,81(e) ; 128,84(c) ; 129,03(a) ; 129,51(b) ; 139,09(d) ; 158,54(f) ; 174,02(j).

Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-cystylglycinate de *tert*-butyle



Une masse de 3,38 g (6,6 mmol) de N-benzyloxycarbonyl-L-cystine et 5,76 mL (5 eq.) de DIEA sont dissouts dans 120 mL d'acétonitrile anhydre. A cette solution est ajouté 2,76 g (2,5 eq.) d'hydrochlorure de glycine *tert*-butyl et 6,36 g (3 eq.) de TBTU. On laisse agiter toute la nuit. Le lendemain, on ajoute 120 mL d'acétate d'éthyle et on lave avec 3 x 120 mL NaCl (sat.), 1 x 100 mL NaOH 1N et 1 x 100 mL H₂O. On concentre *in vacuo* et on purifie par chromatographie sur gel de silice : 15cm x 2,5 cm, 33% AcOEt/toluene.

Rendement : 60%

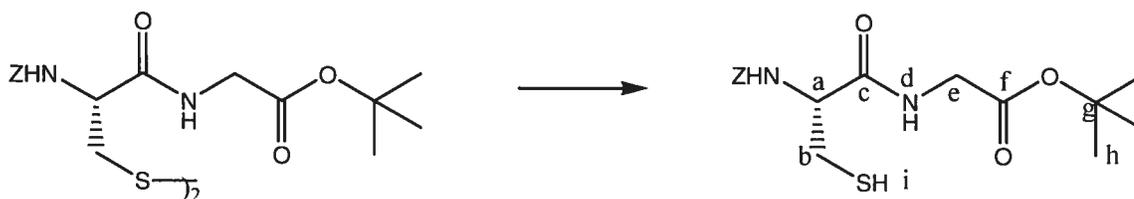
Rf : 0,43 (50/50 AcOEt/Hexanes)

RMN ¹H : (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 1,42 (9H(h), s) ; 2,87 (1H(b), dd, J = 11 Hz et 15Hz); 3,10 (1H(b), dd, J = 15 Hz et 4Hz); 3,77 (1H(e), dd, J = 18 Hz et 5 Hz); 4,00 (1H(e), dd, J = 18Hz et 5Hz); 5,10 (1H(a), m); 5,16 (2H(Cbz), s); 5,8 (1H(CbzNH), d, J = 9 Hz); 7,31 (5H(Cbz), m); 7,95 (1H(d), t, J = 5Hz).

RMN ¹³C : (CDCl₃, 300 MHz) δ (ppm) 27,90(h) ; 41,93(e) ; 46,04(b) ; 55,10(a) ; 67,15(Cbz) ; 81,98(g) ; 127,50(Cbz) ; 127,97(Cbz) ; 128,37(Cbz) ; 136,30(Cbz) ; 156,87(Cbz) ; 168,27(f) ; 170,02(c).

Spectre de masse: Calc pour C₃₄H₄₆N₄O₁₀S₂+H: 735,27281, Trouvé: 735,27207

Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-cystéinyglycinate de *tert*-butyle



100 mg de N-benzyloxycarbonyl-L-cystéinyglycinate de *tert*-butyle et 100 mg de borohydrure de sodium sont dissout dans 2 mL d'éthanol et 2 mL de CHCl_3 . Le mélange est agité 30min à température ambiante. Ensuite, 5 mL de CHCl_3 sont ajoutés et la phase organique est lavée avec 10 mL de HCl 1M avant d'être concentrée *in vacuo*. Si nécessaire, le produit peut être purifié d'avantage par chromatographie sur gel de silice en utilisant un mélange 30/70 AcOEt/hexanes comme éluant.

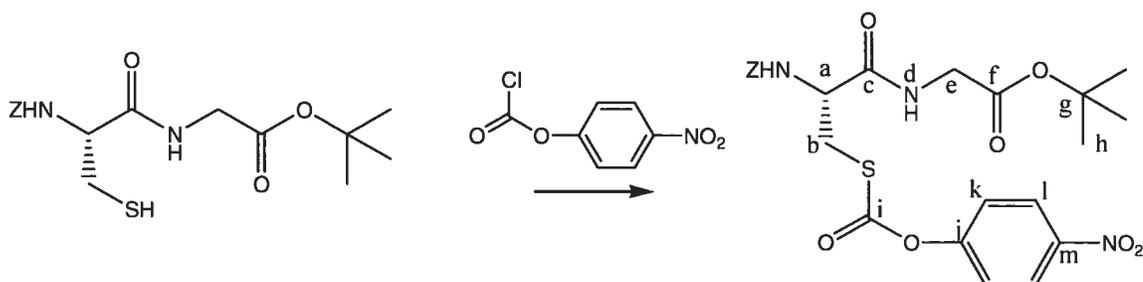
Rendement : Calculé à l'étape suivante

Rf : 0,50 (50/50 AcOEt/Hexanes) (Coloration saumon à la ninhydrine)

RMN ^1H : (CDCl_3) δ (ppm) 1,17 (9H(h), s) ; 1,42 (1H(s), dd, $J = 8,4$ Hz et 11,4 Hz) ; 2,58 (1H(b), ddd, $J = 15,2$ Hz, 11,4 Hz et 6,6 Hz) ; 2,97 (1H(b), ddd, $J = 15,2$ Hz, 8,4 Hz et 5,1 Hz) ; 3,87 (2H(e), d, $J = 6,2$ Hz) ; 4,50 (1H(a), m) ; 5,19 (2H(Cbz), s) ; 6,04 (1H(CbzNH), d, $J = 9,2$ Hz) ; 7,11 (1H(d), t, $J = 6,2$ Hz) ; 7,61 (5H(Cbz), m).

RMN ^{13}C : (CDCl_3 , 300 MHz) δ (ppm) 27,91(h) ; 41,92(e) ; 46,14(b) ; 55,12(a) ; 67,02(Cbz) ; 81,95(g) ; 127,80(Cbz) ; 127,92(Cbz) ; 128,74(Cbz) ; 136,25(Cbz) ; 156,92(Cbz) ; 168,32(f) ; 170,06(c).

Synthèse du N-benzoyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-L-cytéinylglycinate de *tert*-butyle



Une masse de 110 mg de N-carbobenzyloxy-L-cystéinylglycinate de *tert*-butyle et 104 μL de DIEA est dissoute dans 0,5 ml de CHCl_3 , à 0°C . On ajoute 60 mg de chloroformate de *p*-nitrophényle préalablement dissout dans 0,5 mL de CHCl_3 à 0°C et on agite 15 min. On envoie cette solution directement sur une colonne de gel de silice et on purifie par chromatographie en utilisant un mélange 1 :2 AcOEt/Hexanes. Une masse de 68 mg d'un solide jaune est obtenue.

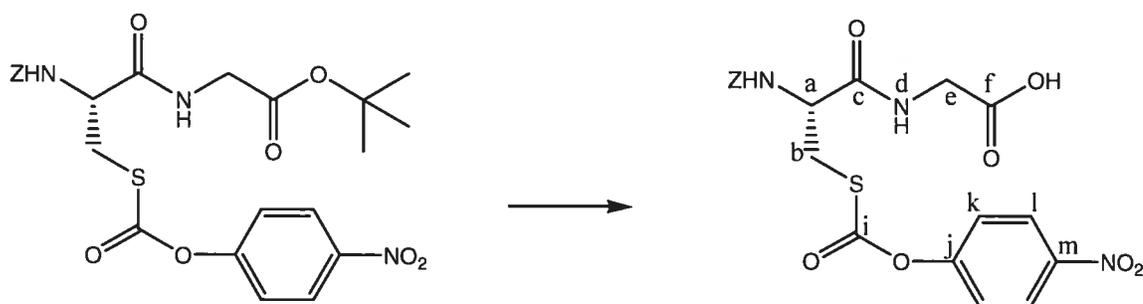
Rendement : 68%

Rf : 0,50 (1 :1 AcOEt/Hexanes)

RMN ^1H : (CHCl_3) δ (ppm) 1,18 (9H(h), s) ; 3,19 (1H(b), dd, $J = 6,4 \text{ Hz}$ et $13,5 \text{ Hz}$) ; 3,37 (1H(b), dd, $J = 4,1 \text{ Hz}$ et $13,5 \text{ Hz}$) ; 3,88 (2H(e), d, $J = 4,0 \text{ Hz}$) ; 4,70 (1H(a), dd, $J = 4,1 \text{ Hz}$ et $6,4 \text{ Hz}$) ; 5,23 (1H(Cbz), d, $J = 13,2 \text{ Hz}$) ; 5,27 (1H(Cbz), d, $J = 13,2 \text{ Hz}$) ; 5,80 (1H(CbzNH), d) ; 6,95 (1H(d), t) ; 7,56 (2H(k), d, $J = 10,5 \text{ Hz}$) ; 7,62 (5H(Cbz), m) ; 8,58 (2H(l), d, $J = 10,5$).

RMN ^{13}C : (CDCl_3): δ (ppm) = 28.2(h), 28.5(b), 43.3(e), 53.2(a), 65.2(Cbz), 122.2, 124.8, 127.2(Cbz), 127.3(Cbz), 127.8(Cbz), 136.6(Cbz), 145.1(m), 155.1(i), 155.4(Cbz), 167.3(j), 168.0(f), 169.9(c).

Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-cystéinyglycine



À une masse de 34 mg de N-benzyloxycarbonyl-S-(*p*-nitrophénoxy-carbonyl)-L-cytéinyglycinate de *tert*-butyle dissoute dans 2 mL de chloroforme sont ajoutés 500 μ L d'acide trifluoroacétique, à 0°C. La solution est agitée pendant 1 heure avant d'être concentrée *in vacuo*. Le produit est utilisé sans plus de purification.

Rendement : Quantitatif

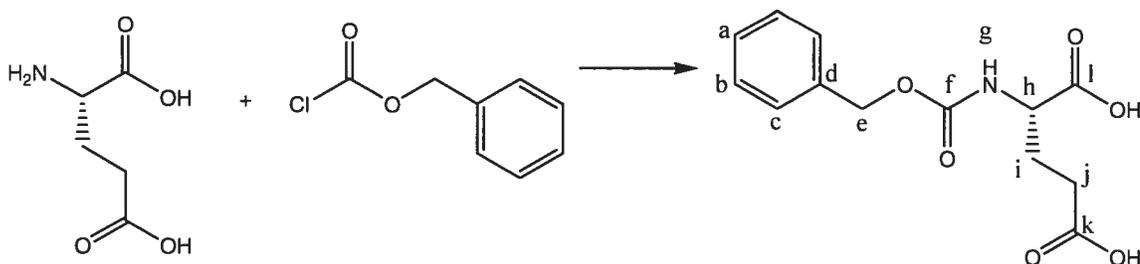
RF : 0,12 (50/50 AcOEt/Hexanes)

RMN ^1H : (CHCl_3) δ (ppm) 3,10 (1H(b), dd, $J = 6,3$ Hz et 13,6 Hz) ; 3,26 (1H(b), dd, $J = 4,1$ Hz et 13,6 Hz) ; 4,05 (2H(e), d, $J = 3,8$ Hz) ; 4,82 (1H(a), dd, $J = 4,1$ Hz et 6,3 Hz) ; 5,23 (1H(Cbz), d, $J = 13,1$ Hz) ; 5,27 (1H(Cbz), d, $J = 13,1$ Hz) ; 6,30 (1H(CbzNH), d, $J = 8,1$ Hz) ; 7,56 (2H(k), d, $J = 10,5$ Hz) ; 7,62 (5H(Cbz), m) ; 7,87 (1H(d), t) ; 8,58 (2H(l), d, $J = 10,5$).

Spectre de masse: Calc pour $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}+\text{H}$: 478,09148, Trouvé: 478,09251

RMN ^{13}C : (CDCl_3): δ (ppm) = 28.0(b), 43.3(e), 53.2(a), 65.1(Cbz), 122.2(l), 124.9(k), 127.2(Cbz), 127.3(Cbz), 127.8(Cbz), 136.4(Cbz), 145.0(m), 155.2(i), 155.4(Cbz), 167.3(j), 168.0(f), 171.7(c).

Synthèse de l'acide N-benzyloxycarbonyl-L-glutamique



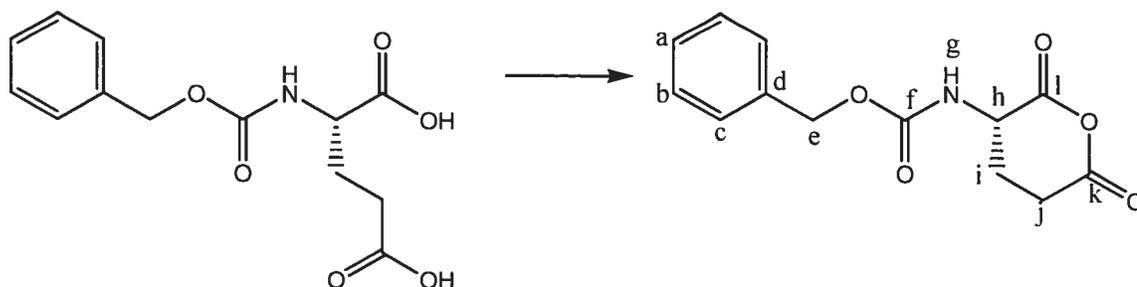
Une masse de 15,0 g (0,1 mol) d'acide L-glutamique et une masse de 57,8 g (0,68 mol) de bicarbonate de sodium sont dissoutes dans 600 ml d'eau distillée et agitées à 0°C jusqu'à dissolution complète ($\cong 10$ min.). On ajoute ensuite 9,63 mL de chloroformate de benzyle (6,7 mmol), goutte à goutte. On laisse agiter à 0°C pendant environ deux heures pour ensuite laisser revenir à température ambiante au cours de la nuit. On lave trois fois avec 10 mL d'éther diéthylique. La phase aqueuse est acidifiée à un pH d'environ 1 avec du HCl 1M et on extrait trois fois avec 10 mL d'acétate d'éthyle. On sèche sur sulfate de sodium et évapore *in vacuo* pour obtenir 17,8 g d'un solide amorphe blanc.

Rendement : 93%

pf : 119-120°C (lit 120-121 °C¹⁷).

RMN ¹H : (CD₃OD): δ 1.89-1.98 (1H(i), m); 2.15-2.24 (1H(i), m); 2.42 (2H(j), t, $J = 7.7$); 4.24 (1H(h), q, $J = 4.8$); 5.10 (2H(e), s); 7.27-7.38 (5H(a,b,c), m)

Synthèse de l'anhydride N-benzyloxycarbonyl-L-glutamique



1.054 g (3.75 mmol) de N-Cbz-L-Glu est ajouté à 8 mL d'anhydride acétique fraîchement distillé. Le mélange est chauffé lentement jusqu'à 55 °C, puis est laissé à cette température 10 minutes ou jusqu'à ce que le produit de départ soit complètement dissout. Une fois revenu à température ambiante, l'anhydride acétique et l'acide acétique formés sont évaporés *in vacuo* jusqu'à obtention d'une huile beige. Le produit est redissout dans un minimum d'éther diéthylique et la solution est mise à -20 °C pour la nuit. Le solide est filtré pour donner 0.811 g (3.08 mmol) de produit blanc amorphe.

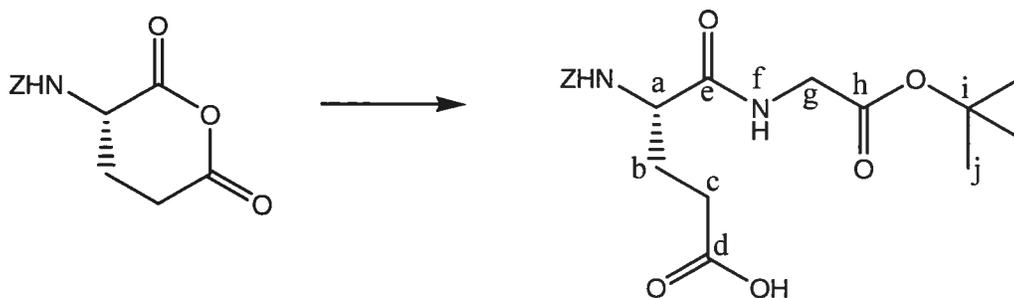
Rendement : 82%

pf : 91 °C (lit. 93–94 °C(21))

RMN ¹H : (CDCl₃): δ (ppm), *J*(Hz) = 1.91 (1H(i), dd, *J* = 13.2, 5.7); 1.97 (1H(i), dd, *J* = 18.3, 10.7); 2.47 (1H(j), t, *J* = 6.8); 2.84-3.08 (1H(j), m); 4.47 (1H(h), t, *J* = 6.5); 5.14 (2H(e), s); 5.62 (1H(g), s); 7.37 (5H(a,b,c), m).

RMN ¹³C : (CDCl₃): δ (ppm) = 23.3(i), 29.5(j), 51.0(h), 67.4(e), 128.1(c), 128.3(a), 128.5(b), 135.6(d), 155.7(f), 164.7(j?), 166.6(k?).

Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-glutamylglycinate de *tert*-butyle



Une masse de 1.00 g (3.8 mmol) de l'anhydride de N-Cbz-L-Glu et une masse de 0.637 g (3.8 mmol) d'hydrochlorure de Gly-O-*t*-Bu sont dissoutes dans 40 mL de CH₂Cl₂ sous N₂. Un volume de 3 mL (21.5 mmol) de triéthylamine est ajouté et la solution est agitée à température ambiante. Après 1 heure, le volume de solvant est réduit *in vacuo* jusqu'à environ 2 mL. Le mélange est déposé sur une colonne de gel de silice de 5 cm de diamètre x 20 cm de hauteur. L'éluant utilisé est un mélange 50% Et₂O / 50% AcOEt. Le premier produit récupéré est l'isomère α , avec un R_f de 0.78 sur CCM (89% AcOEt, 10% MeOH, 1% AcOH), suivit de l'isomère γ avec un R_f de 0.69. On récupère 560 mg (1.42 mmol) de petits cristaux blancs.

Rendement : 37%

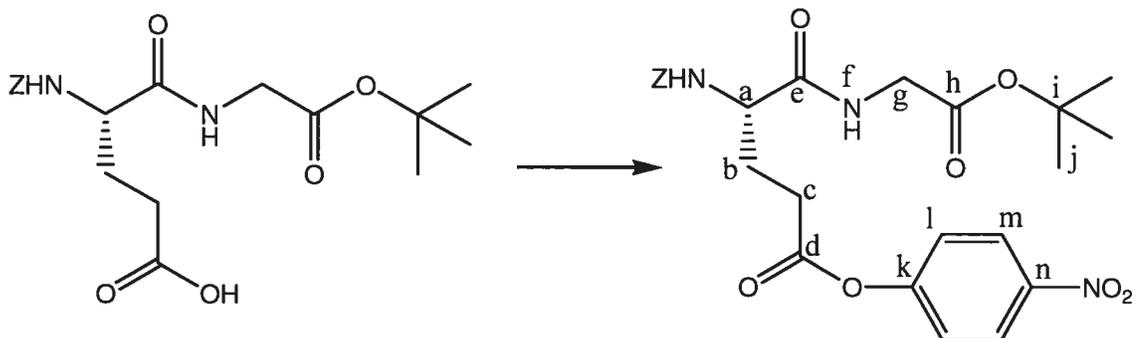
R_f : 0.78 (89/10/1 AcOEt/MeOH/AcOH)

pf : 101-103 °C (lit. 101 °C¹⁸)

RMN ¹H : (CDCl₃, 6 mg/mL): δ (ppm), J (Hz) = 1.45 (9H(j), s); 1.92-2.08 (1H(b), m); 2.12-2.17 (1H(b), m); 2.42-2.58 (2H(c), m); 3.92 (2H(g), d, J = 8.5); 4.46 (1H(a), t, J = 5.9); 5.10 (2H(Cbz), s); 5.80 (1H(CbzNH), d, J = 8.5); 7.02 (1H(f), t, J = 5.9); 7.33 (5H(Cbz), s).

RMN ¹³C : (CDCl₃) δ 27.9(b?), 28.0(j?), 42.0(g), 45.7(a), 53.6(c), 67.1(Cbz), 82.4(i), 127.9(Cbz), 128.1(Cbz), 128.4(Cbz), 135.9(Cbz), 156.4(Cbz), 168.7(h), 171.7(e), 176.3(d).

Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-O-*p*-nitrophényloxy-carbonyl-L-glutamylglycinate de *tert*-butyle



Une masse de 1 g (2,53 mmol) de N-benzyloxycarbonyl-L-glutamylglycinate de *tert*-butyle est dissout dans du dichlorométhane et 390 μ L (2.78 mmol) de triéthylamine sont ajoutés. La solution est mise sur glace et 31 mg de DMAP sont ajoutés. On attend 20 min et on ajoute 562 mg (2.78 mmol) de chloroformate de *p*-nitrophényle. Après 20 minutes, la phase organique est lavée avec 5 x 20 mL de HCl (pH = 3) jusqu'à ce que la phase aqueuse de lavage n'aie plus de coloration jaune. La phase organique est alors séchée avec MgSO₄ et évaporée pour donner une huile jaune pouvant être recristallisée dans Et₂O/hexanes pour donner 1.0 g de solide jaunâtre.

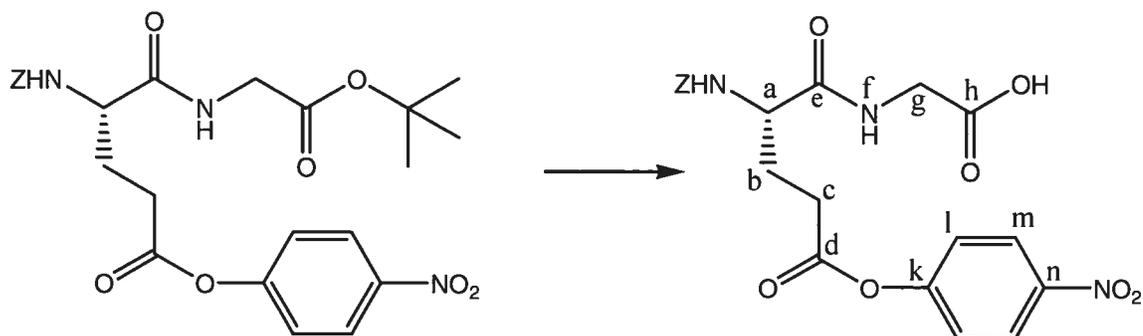
Rendement : 77 %

pf : 55-57 °C

RMN ¹H : (CDCl₃) δ 1.47 (9H(j), s); 2.03-2.12 (1H(b), m); 2.28-2.36 (1H(b), m); 2.70-2.87 (2H(c), m); 3.91 (1H(g), dd, $J = 5.1, 18.2$); 3.99 (1H(g), dd, $J = 5.5, 18.3$); 4.43 (1H(a), d, $J = 4.8$); 5.12 (2H(Cbz), td, $J = 12.2, 7.8$); 5.62 (1H(CbzNH), d, $J = 7.8$); 6.55 (1H(f), s); 7.26-7.34 (2H(l), m), 7.36 (5H(Cbz), s); 8.22-8.26 (2H(m), m).

RMN ¹³C : (CDCl₃) δ 27.9(b?), 28.0(j?), 30.2(c), 41.9(g), 53.5(a), 67.2(Cbz), 82.5(i), 122.4(m), 125.1(l), 128.0(Cbz), 128.2(Cbz), 128.5(Cbz), 135.8(Cbz), 145.3(n), 155.1(Cbz), 156.1(k), 168.4(h), 170.7(e), 170.9(d).

Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-glutamylglycine



À 0,81 g (1,57 mmol) de N-benzyloxycarbonyl-O-(*p*-nitrophényloxy-carbonyl)-L-glutamylglycinate de *tert*-butyle est ajouté 8 mL d'acide trifluoroacétique dans 1 mL de CH₂Cl₂. La réaction est agitée à 0 °C pour 4 heures. Les solvants sont évaporés et le résidu est recristallisé dans MeOH / H₂O et filtré *in vacuo* pour donner 0,78 g du produit final sous forme d'une poudre floconneuse.

Rendement : 95%

pf : 139-140 °C (lit. 139 °C¹⁸)

RMN ¹H : (CD₃OD) δ 2.01-2.11 (1H(b), m); 2.25-2.33 (1H(b), m); 2.77-2.81 (2H(c), m); 3.85-4.03 (2H(g), m); 4.32-4.38 (1H(a), m); 5.06-5.18 (2H(Cbz), m); 7.27-7.37 (7H(Cbz+l), m), 8.26 (2H(m), d, *J* = 9.0).

RMN ¹³C : (CD₃OD) δ 27.9(b), 53.5(a), 67.8(Cbz), 123.9(m), 126.0(l), 128.9(Cbz), 129.0(Cbz), 129.4(Cbz), 135.8(Cbz), 145.3(n), 155.1(k), 156.1(Cbz), 168.4(e), 170.7(d?), 170.9(h?).

Bibliographie

- ¹ Noguchi, K.; Ishikawa, K.; Yokoyama, K.-I.; Ohtsuka, T.; Nio, N. et Suzuki, E.-I., *J. Biol. Chem.*, **2001**, *64*, 2608
- ² Bishop, P.D.; Lasser, G.W.; Le Trong, I.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C., *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*(23), 13888-13889.
- ³ Glazer, A.N., et Smith, E.L., *The Enzymes*, **1971**, Academic Press, New York.
- ⁴ Verrinder, D.J.; Hourigan, M.J. et Prokipcak, J.M., *Can. J. Chem.*, **1978**, *56*, 2582
- ⁵ Castro, E.A. et Gil, F.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 7611
- ⁶ Castro, E.A.; Ibanez, F.; Lagos, S.; Schick, M. et Santos, J.G., *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 2691
- ⁷ Castro, E.A.; Pavez, P. et Santos, J.G., *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 3129
- ⁸ Castro, E.A.; Pavez, P. et Santos, J.G., *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 4494
- ⁹ Lapierre, Danielle, Mémoire de maîtrise, **2003**, Université de Montréal.
- ¹⁰ Adam, P. et Baron, F.A., *Chem. Rev.* **1965**, *65*, 567.
- ¹¹ Woodcock, D.A., *Chem. Comm.* **1968**, 267
- ¹² Hegarty, A.F. et Frost, L.N., *Chem. Comm.* **1972**, 501
- ¹³ Hegarty, A.F. et Frost, L.N., *J. Chem. Soc. Perkin II*, **1973**, 1719.
- ¹⁴ Folk, J.E. et Chung, S.I., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **1973**, *38*, 109-191.
- ¹⁵ Gagnon, P.; Huang, X.; Therrien, E. et Keillor, J.W., *Tetrahedron. Lett.*, **2002**, *43*, 7717-7719
- ¹⁶ Pardin, Christophe, Travaux non publiés
- ¹⁷ Greenstein, J. P. et Winitz, M., *Chemistry of the Amino Acids*, **1961**, John Wiley & Sons, Ltd., New York, NY.
- ¹⁸ Chung, S. I.; Shrager, R. I. et Folk, J. E., *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 6424-6435.



Chapitre 3: Étude de désacylation

Introduction

Dans le chapitre précédent, l'étape d'acylation du mécanisme d'action de la transglutaminase a été étudiée. Dans ce chapitre, il sera discuté de la deuxième étape de ce même mécanisme. En effet, suite à l'acylation de l'enzyme par un substrat donneur de glutamyle, il y a liaison d'un deuxième substrat (nucléophile) et désacylation par attaque de ce nucléophile sur le thiolester formé, aussi appelé l'acyl-enzyme¹. Simultanément, l'eau peut aussi remplir ce rôle. Un des premiers projets sur lesquels nous avons travaillé fut la détermination de l'effet qu'a la nucléophilie du substrat accepteur sur la vitesse de l'étape de désacylation².

Dans cette étude, des amines de nucléophilies diverses ont été utilisées comme substrats accepteurs et des courbes de Brønsted ont été tracées. Ce type de courbe permet de déterminer la charge développée sur l'azote de l'amine nucléophile à l'état de transition et sera décrit plus loin.

La désacylation comme étape limitante

Une étude cinétique se fait généralement sur l'étape la plus lente du cycle catalytique. Il est donc nécessaire de s'assurer que l'étape de désacylation est bel et bien limitante si celle-ci doit être étudiée.

L'hydrolyse du N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(γ -*p*-nitrophényl)glycine, un substrat analogue activé², a une constante de vitesse ($k_{\text{cat}(\text{hydrolyse})}$) de $17 \pm 2 \text{ min}^{-1}$ et un K_M de $0,020 \pm 0,002 \text{ mM}$. Par comparaison, la valeur de $k_{\text{cat}(\text{hydrolyse})}$ obtenue pour le substrat modèle typique, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine, est de $20 \pm 2 \text{ min}^{-1}$ avec un K_M de 66 mM^4 . Cela montre dans un premier temps que les deux

substrats s'hydrolysent sensiblement aussi rapidement malgré leurs différences structurales et fonctionnelles. Ce fait peut être rationalisé en constatant que selon le mécanisme proposé, les deux substrats génèrent la même acyle-enzyme et que, par conséquent, si l'étape d'hydrolyse est limitante, la même vitesse d'hydrolyse ($k_{\text{cat}(\text{hydrolyse})}$) devrait être observée, puisqu'il s'agit de la même réaction³. C'est en effet ce qui est observé, dans les limites des erreurs expérimentales.

De plus, si on s'attarde sur les détails d'un test d'activité classique⁴ utilisé pour la TGase, on constate que dans les cas où on utilise une concentration saturante de substrat donneur, spécifiquement la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine, et l'hydroxylamine, un excellent nucléophile, comme substrat accepteur, on observe une vitesse (k_{cat}) de l'ordre de 1400 min^{-1} . Cette vitesse est grande comparée à la vitesse d'hydrolyse (20 min^{-1}) et confirme, dans un premier temps, que 20 min^{-1} est une constante de vitesse bel et bien limitée par l'étape d'hydrolyse, et non par l'acylation. Dans un deuxième temps, en regardant la multitude de vitesses observées^{5.6.7.8.9} pour des substrats accepteurs différents, il est possible de conclure que toutes les vitesses obtenues pour un substrat donneur donné, avec des concentrations de N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine ou de N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-O-(*p*-nitrophényl)glycine saturantes, se situant en dessous de 1400 min^{-1} auront pour étape limitante l'étape de désacylation. Il est en effet possible d'utiliser des substrats accepteurs de plus en plus nucléophiles sans jamais saturer la vitesse de la réaction enzymatique. L'étape d'acylation est donc toujours plus rapide, même avec les meilleurs substrats accepteurs étudiés. Cette conclusion est essentielle à l'interprétation des résultats obtenus pour les courbes de Brønsted qui seront décrites plus loin.

Hypothèses

Les questions cinétiques auxquelles on peut vouloir répondre quant à l'étape de désacylation sont nombreuses. D'abord, on doit réaliser que l'attaque du nucléophile, une amine dans le cas général, sur l'acyle-enzyme doit se produire plus ou moins en même temps qu'une déprotonation de l'amine en question (voir figure 3.1).

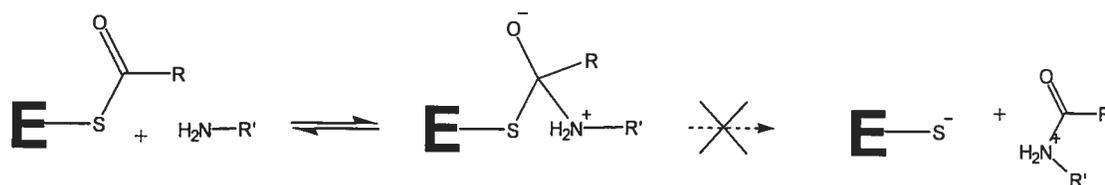


Figure 3.1 : Nécessité d'une déprotonation au cours de l'attaque nucléophile.

Une telle déprotonation est en effet nécessaire pour que le thiolate soit le meilleur groupe partant lors de la décomposition rapide de l'intermédiaire tétrahédrique généré.

On peut donc croire qu'une base (générale ou spécifique) située dans le site actif de l'enzyme aurait pour rôle cette déprotonation. Trois scénarios limites sont alors envisageables (voir figure 3.2) :

Scénario 1) On pourrait d'abord assister à l'attaque nucléophile et ensuite à la déprotonation de l'intermédiaire tétraédrique zwitterionique.

Scénario 2) On pourrait, dans un premier temps, assister à la déprotonation, puis à l'attaque nucléophile comme deuxième étape distincte.

Scénario 3) On peut trouver un mécanisme se situant entre les deux extrêmes dans lequel le lien C-N et le lien N-H seront respectivement formé et brisé de façon concertée.

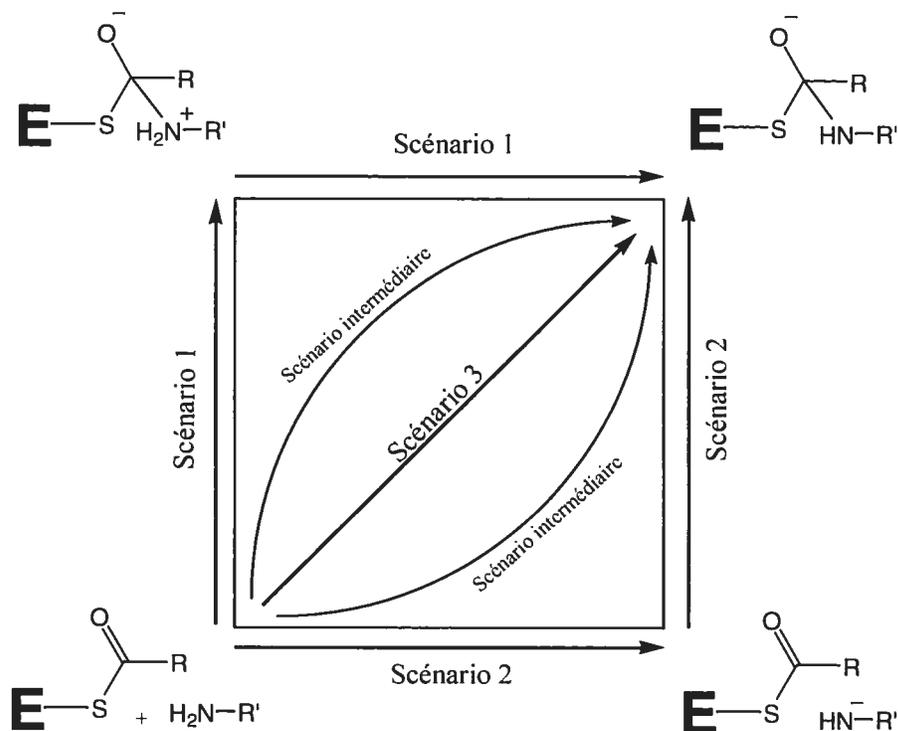


Figure 3.2 : Scénarios possibles de l'attaque nucléophile.

Si la formation et le bris de ces liens ne se fait pas exactement en même temps, on assistera à la formation temporaire d'une charge partielle sur l'azote. Cet effet peut être observé par la détermination du paramètre β de la courbe de Brønsted de la réaction.

En bref, une courbe de Brønsted rapporte le logarithme du ratio $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (une mesure de l'efficacité catalytique) en fonction d'un paramètre électronique représentant la nucléophilie des molécules étudiées. Dans le cas présent, ce paramètre est le pK_{a} de l'ion ammonium des amines utilisées comme substrat accepteur. La courbe obtenue est le résultat de la séparation de charges ou de dipôles se formant à l'état de transition. Une pente positive indique la formation d'une charge positive à l'état de transition, une pente négative indique la formation d'une charge négative à

l'état de transition et une pente nulle peut indiquer qu'aucune charge nette n'est formée ou que le paramètre électronique choisi n'est pas associé à l'étape limitante de la réaction.

Résultats

Six amines primaires ont été choisies pour effectuer l'étude. Celles-ci ont été sélectionnées pour que le pK_a de leurs ammoniums couvrent le plus grand intervalle possible, soit de 5,64 à 10,50. Ces pK_a ont été déterminés par titration automatisée sur un appareil de marque Mettler Toledo DL53 en utilisant le pH à la moitié du volume équivalent. Les diverses solutions d'hydrochlorures d'ammonium primaires ont été préparées pour contenir 5% de DMF et une force ionique de 0,25 M (ajustée avec du KCl). Cet ajustement vise à rendre les conditions de détermination des pK_a aussi similaires aux conditions des tests cinétiques que possible. Le titrant était une solution de NaOH 0,1 M. Les pK_a mesurés sont rapportés au tableau 3.1.

Toutes les vitesses observées lors des expériences cinétiques ont été mesurées en suivant la libération du *p*-nitrophénolate, par spectrophotométrie UV-Vis, à 400 nm, en utilisant un spectrophotomètre de marque Cary Varian Bio 100.

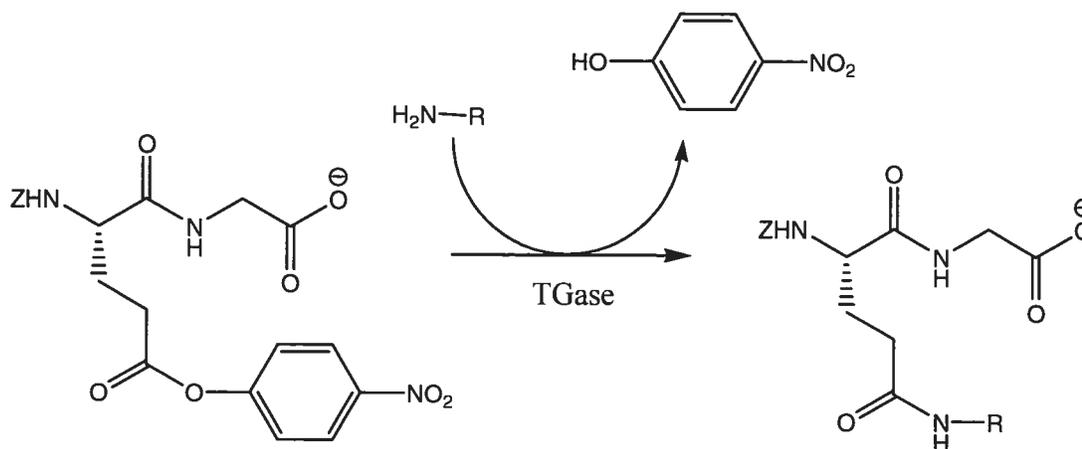


Figure 3.3 : Réactions étudiées.

Les conditions utilisées étaient de 100 μM en substrat donneur (N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-O-(*p*-nitrophényl)glycine), ce qui représente environ 5 fois sa valeur de K_M . Cet excès assure que la concentration de ce substrat varie peu au cours des premiers instants de la réaction. Le système est donc en situation de pseudo zéro ordre, présentant un profil de vitesse linéaire et fonction de la concentration de substrat accepteur utilisé. Le pH était fixé à 7,0 (Tampon MOPS 0,1 M) et la température était de 25 °C. Les solutions contenaient 50 μM d'EDTA et 50 mM de chlorure de calcium. Le substrat donneur étant sensible à l'hydrolyse chimique, celui-ci a été ajouté sous forme de solution dans le N,N-diméthylformamide, résultant en une concentration finale en solvant organique de 5%. Les réactions étaient initiées par l'ajout de 10-15 μL d'une solution de TGase (isolée de foie de cochon d'Inde) de 0,7-1,0 mg/mL (activité spécifique entre 12-16 U/mg). Le dégagement de *p*-nitrophénolate est suivi à 400 nm. Le coefficient d'extinction du produit, dans les conditions expérimentales a été évalué comme étant de 8040 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Des blancs non-enzymatiques ont été faits simultanément aux

mesures enzymatiques et ont été utilisés pour corriger les vitesses observées, éliminant ainsi la contribution au signal qu'apporte l'hydrolyse chimique du substrat activé. Les mesures n'ayant pas toutes été faites avec le même lot d'enzyme, il a fallu normaliser les vitesses observées en les ramenant aux vitesses observées pour une enzyme dont l'activité spécifique serait de 14 unités par mg. La valeur de 14 unités par mg a été choisie pour des raisons historiques, étant la valeur typique moyenne obtenue lors de la purification de l'enzyme à partir des tissus. Malgré cette correction, il est tout de même préférable que les activités spécifiques des divers lots d'enzyme utilisés soient semblables.

L'activité de la TGase a été mesurée par le test standard à l'hydroxamate. Celui-ci implique d'incuber l'enzyme avec 30 mM de N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine, 1 mM EDTA, 5 mM CaCl₂ et 0,1 M hydroxylamine dans un tampon Tris-acétate 0,2 M pH = 6,0, à 37 °C, pendant exactement 10 minutes. La réaction est ensuite arrêtée par l'ajout d'une solution de HCl/TCA/FeCl₃. L'absorbance du complexe Fer-hydroxamate est mesurée à 525 nm. Une unité (U) correspond à la quantité d'enzyme permettant la formation de 1 µmol d'acide γ-glutamylhydroxamique par minute et est exprimée en unités par milligramme de protéine, sous forme d'activité spécifique.

Pour chacune des amines primaires sélectionnées, une dizaine de concentrations ont été utilisées pour couvrir l'intervalle de concentrations allant d'environ 0,2 x K_M à 5 x K_M. Plus spécifiquement, les concentrations testées étaient de : aminoacétonitrile (0,02-3,0 mM); 2,2,2 trifluoroéthylamine (0,1-15 mM); glycinate de méthyle (0,1-12 mM); glycinamide (0,2-18 mM); 2-(éthylthio)éthylamine (0,5-40 mM) et N-acétyl-L-lysinate de méthyle (1,0-40 mM). Les vitesses observées lors des premières cinq minutes de réaction ont permis de déterminer les valeurs de K_M et V_{max}, puis, de k_{cat} et de log(k_{cat} /K_M). Ces données sont rapportées au tableau 3.1.

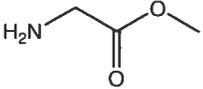
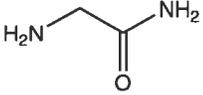
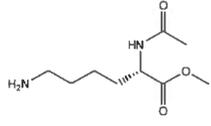
Substrats accepteurs	Structures	k_{cat} (min^{-1}) $\pm 10\%$	K_M (mM) $\pm 10\%$	$\log(k_{cat}/K_M)$ $\pm 0,05$	$\text{pK}_{a\text{NH}_3^+}$ $\pm 0,02$	f_{NH_2}
Amino acétonitrile		114	0,0980 0,0939	3,09	5,64	0,958
2,2,2-trifluoro éthylamine		62,2	0,492 0,445	2,15	6,02	0,905
Glycinate de méthyle		71,4	0,626 0,0672	2,98	7,92	0,107
Glycinamide		105	4,68 0,260	2,58	8,23	0,0556
2-(Ethylthio)- éthylamine		74,7	5,88 0,0158	3,67	9,57	0,00268
N-acétyl- L-lysinate de méthyle		28,3	2,80 8,85E-4	4,50	10,50	3,16E-4

Tableau 3.1 : Paramètres cinétiques de désacylation (aminolyse) à pH 7,0 (0,1 M MOPS), 25 °C, 0,1 mM (5 K_M) de substrat donneur. Les valeurs de K_M en caractère gras sont les valeurs corrigées pour la fraction d'amine sous sa forme nucléophile (f_{NH_2}) neutre et sont les valeurs utilisées pour calculer le $\log(k_{cat}/K_M)$.

Lorsque les valeurs d'efficacité catalytique ($\log(k_{\text{cat}}/K_M)$) sont représentées en fonction de la nucléophilie relative des amines (pK_a de leur ammonium), on obtient une relation linéaire d'énergie libre s'étendant sur tout l'intervalle étudié (Figure 3.4). Cette linéarité laisse croire qu'il n'y a pas de changement de l'étape limitante dans cet intervalle. En effet, un changement d'étape limitante aurait pu être observé pour des nucléophiles extrêmement puissants et qui désacylèrent l'intermédiaire acyl-enzyme plus rapidement qu'il n'est formé. On aurait alors vu un plafonnement des valeurs d'efficacité catalytique au delà d'un certain $\text{pK}_{\text{aNH}_2^+}$ (au haut de l'échelle).

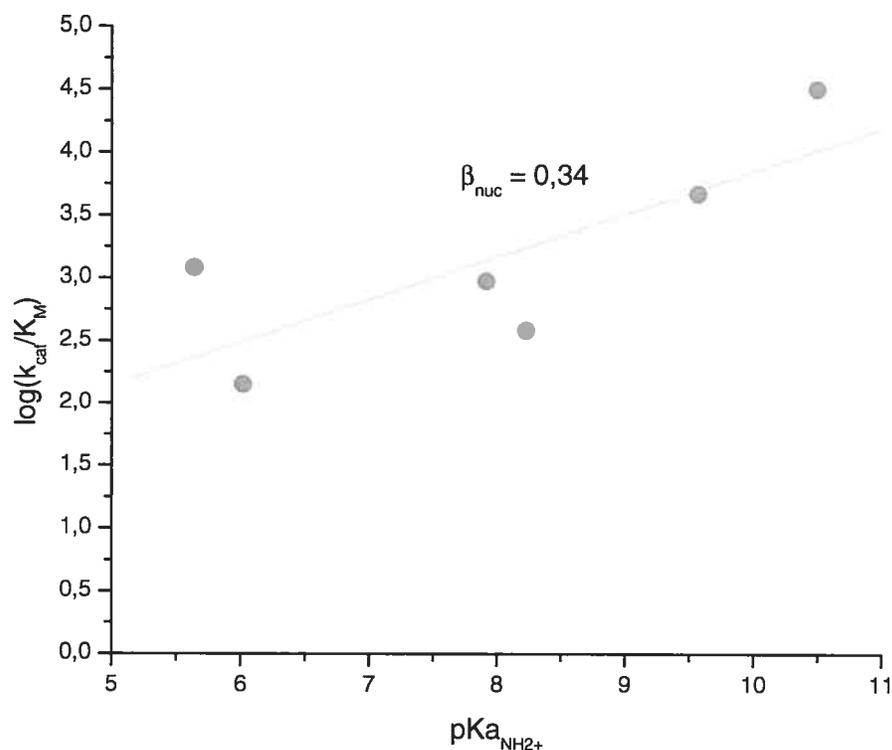


Figure 3.4 : Courbe de Brønsted de l'aminolyse de l'acyle-enzyme.

La représentation de k_{cat} en fonction de la nucléophilie relative des amines s'est avérée extrêmement dispersée et n'est pas représentée ici. La nécessité d'incorporer les valeurs de K_M dans la relation d'énergie libre signifie que les

constantes de vitesse reliées à l'équilibre de liaison du substrat sont incluses dans la loi de vitesse de l'étape limitante de l'étape de désacylation. Cela suggère que l'étape limitante de la désacylation implique les étapes menant à la formation de l'intermédiaire covalent tétraédrique plutôt que la décomposition de ce dernier (voir figure 3.5). L'étape limitante serait donc la formation du lien covalent entre l'amine nucléophile et l'intermédiaire acyle-enzyme, tenant compte de l'équilibre rapide de liaison du substrat.

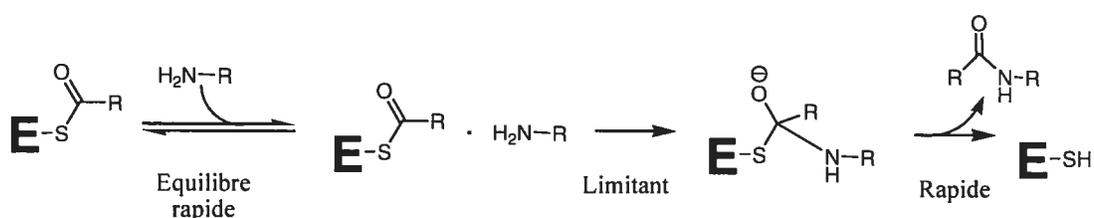


Figure 3.5 : Formation limitante du lien covalent par rapport à la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique.

La pente d'une courbe de Brønsted indique généralement la nature et l'importance du développement de charge à l'état de transition. Une pente positive indique donc dans ce cas-ci la formation d'une charge positive sur l'azote de l'amine nucléophile, indiquant que la nucléophilie influence principalement la vitesse de réaction, ce qui correspondrait au scénario 1 de la figure 3.2.

La courbe obtenue ayant une pente plutôt faible ($\beta_{\text{nuc}} = 0,34$) indique que le parcours réactionnel de la première partie de l'étape de désacylation passe par un état de transition où le bris du lien N-H est moins avancé que la formation du lien C-N. Cela correspond à la flèche recourbée située dans la partie supérieure gauche de la figure 3.2. En effet, le scénario 1 engendrerait une pente positive dans la courbe de Brønsted car selon ce parcours réactionnel, une amine plus nucléophile serait plus efficace. Le scénario 2 engendrerait quant à lui une pente négative de l'ordre de -1.0

car l'amine dont l'ammonium a le pK_a le plus petit donnerait la réaction la plus efficace. Le pK_a de l'ammonium étant une assez bonne mesure de la facilité avec laquelle on peut briser le lien N-H de l'amine, on voit donc que les amines plus nucléophiles réagissent mieux. La valeur absolue de β_{nuc} pouvant aller de 0 à 1 pour ce genre de mécanisme, une valeur de 0,34 nous indique que seulement une charge partielle (d'environ +0,34) est formée à l'état de transition, ce qui supporte l'hypothèse voulant qu'une base générale soit impliquée lors de cette étape.

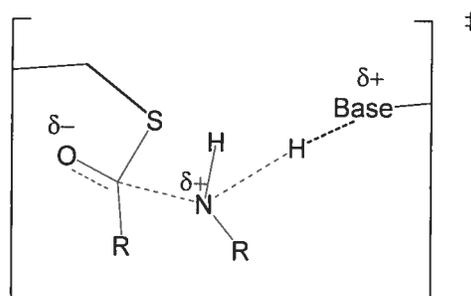


Figure 3.6 : Base générale impliquée lors de la formation limitante du lien covalent au cours de l'étape de désacylation

La facilité avec laquelle le substrat accepteur amine primaire peut être déprotonnée lors de l'attaque nucléophile n'est donc pas aussi importante que la nucléophilie de celui-ci. C'est là le comportement typique de l'aminolyse non enzymatique des thioesters qui procède par une réaction en deux étapes ou l'étape limitante n'implique que l'attaque nucléophile, laissant se former une charge partielle positive sur l'azote et donnant un β_{nuc} de +0,83¹⁰.

Puisque les substrats natifs de la TGase sont des résidus lysine de protéines variées, les fonctions ϵ -amine des chaînes latérales de ces résidus sont, au pH physiologique dans un état à 99,9% protoné. Il est donc raisonnable de croire que, bien que la forme du substrat pouvant effectuer l'attaque nucléophile soit la forme amine neutre, la TGase doit pouvoir lier les deux formes de la lysine.

Le proton de la forme ammonium de la lysine peut être perdu au profit du solvant lors de la liaison. C'est en effet ce qui est vu dans la réaction microscopiquement inverse, l'acylation par des amides primaires. Dans cette réaction, la protonation du groupe partant, l'ammoniaque, doit être faite par le solvant suite à sa libération⁹. Pour cette raison, il a été jugé utile de corriger la concentration de nucléophile en fonction du pK_a de l'ammonium des amines utilisées ($pK_{NH_3^+}$) et du pH de la réaction.

Une deuxième façon de vérifier si la correction des K_M selon l'état de protonation du substrat en solution avait une importance a été de reprendre les mesures à un pH différent. Les données cinétiques de certaines amines ont donc été mesurées à un pH de 6,0 et sont rapportées au tableau 3.2. La similitude entre les valeurs de $\log(k_{cat}/K_M)$ obtenues aux deux différents pH suite à la correction par la fraction d'amine neutre indique clairement la validité de cette manipulation supplémentaire par rapport aux valeurs obtenues sans cette correction. La faible pente positive observée dans la courbe de Brønsted n'est donc pas simplement due à la basicité relative et au ratio des états de protonation des amines primaires utilisées. Elle est plutôt représentative de la charge partielle développée sur l'azote à l'état de transition de l'attaque nucléophile, cette dernière étant catalysée par une base générale.

Finalement, puisqu'une amine primaire doit être sous sa forme neutre pour effectuer une attaque nucléophile, il peut y avoir un résidu basique, autre que l'histidine de la triade catalytique, permettant la liaison et la déprotonation rapide de la forme ammonium de l'amine, avant la réaction avec l'acyle-enzyme. L'effet du pH sur l'état d'ionisation de ce résidu basique hypothétique, sur l'affinité de l'enzyme pour des substrats amines primaires ainsi que sur la variation de la valeur de K_M causée par l'état d'ionisation du substrat lui-même peuvent expliquer l'interprétation difficile du profil pH-vitesse en terme d'information mécanistiques utiles⁷.

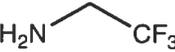
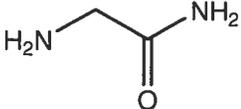
Substrats accepteurs	Structures	k_{cat} (min^{-1}) $\pm 10\%$	K_M (mM) $\pm 10\%$	$\log(k_{cat}/K_M)$ $\pm 0,05$	$pK_{NH_3^+}$ $\pm 0,02$	f_{NH_2}
Amino acétonitrile		59,6	0,060 0,042	3,15	5,64	0,697
2,2,2-trifluoro éthylamine		43,5	0,580 0,283	2,18	6,02	0,487
Glycinamide		42,9	3,21 0,0188	3,36	8,23	0,00585
2-(Ethylthio)- éthylamine		55,6	71,0 0,0191	3,46	9,57	2,69E-4

Tableau 3.2 : Paramètres cinétiques de désacylation (aminolyse) à pH 6,0 (0,1 M MES), 25 °C, 0,1 mM (5 K_M) de substrat donneur. Les valeurs de K_M en caractère gras sont les valeurs corrigées pour la fraction d'amine (f_{NH_2}) sous sa forme nucléophile neutre et sont les valeurs utilisées pour calculer le $\log(k_{cat}/K_M)$.

Sur l'intervalle limité de pH (de 6,0 à 8,0) étudié, les réactions d'hydrolyse et d'aminolyse se sont montrées insensibles au pH, montrant un plateau dans les relations pH- k_{cat} et pH- K_M . L'absence de dépendance sur cet intervalle est consistant avec un résidu basique hypothétique dont le pK_a apparent serait de moins de 6,0 ou avec un mécanisme où l'amine libre est liée et la déprotonation n'est pas catalysée.

Effet isotopique

Si la pente faible obtenue dans la courbe de Brønsted correspond à une catalyse par une base générale lors de la désacylation, avec un proton en vol à l'étape limitante, on peut s'attendre à observer un effet isotopique. Pour vérifier cette hypothèse, les données cinétiques de trois des amines primaires utilisées ont été reprises dans le D₂O comme solvant, à un pL de 7,0. Cette valeur de pL faisant partie du plateau observé dans les relation pH-vitesse, la perturbation de l'état d'ionisation par le changement de solvant devrait être négligeable et les variations observées peuvent donc être associées à des effets cinétiques plutôt qu'au déplacement d'un équilibre. Les valeurs obtenues sont présentées au tableau 3.3.

Substrats accepteurs	H ₂ O			D ₂ O			Effet Isotopique
	k_{cat} (min ⁻¹) ±10%	K_M (mM) ±10%	k_{cat}/K_M	k_{cat} (min ⁻¹) ±10%	K_M (mM) ±10%	k_{cat}/K_M	
Amino acétonitrile pK _{NH+} =5,64	114	0,098	1160	39,1	0,20	196	5,9
Glycinate de méthyle pK _{NH+} =7,92	71,4	0,626	114	24,7	0,74	33,3	3,4
N-Acétyl- L-lysinate de méthyle pK _{NH+} =10,5	28,3	2,80	10,1	28,9	3,1	9,32	1,2

Tableau 3.3 : Comparaison des paramètres cinétiques de désacylation (aminolyse) à pH 7,0 (0,1 M MOPS), 25 °C, 0,1 mM (5 K_M) de substrat donneur, dans l'eau et le D₂O.

Dans chacun des cas étudiés, un effet isotopique significatif a été observé pour les valeurs de k_{cat}/K_M , suggérant la présence d'un proton (ou d'un deutérium) en vol à l'état de transition de l'étape limitante, ce qui concorde bien avec l'hypothèse d'une catalyse par une base générale. De plus, l'importance de l'effet semble proportionnelle à l'acidité de l'ammonium correspondant. Puisque l'importance d'un effet isotopique dépend du degré de transfert de celui-ci à l'état de transition, avec un maximum à 50% de transfert¹¹ et que le degré de transfert du proton à l'état de transition dépend de l'acidité du nucléophile en question, il paraît logique que l'acidité de l'ammonium correspondant influence la force de l'effet isotopique observé. En fait, l'effet isotopique maximal devrait être observé pour le transfert d'un proton entre deux fonctions dont les pK_a sont similaires. Il peut donc être conclu que le pK_a de la base générale sera plus près de 5,64 (pK_a de l'aminoacétonitrile) que de 7,92 (pK_a du glycinate de méthyle). Cela correspond bien à l'hypothèse voulant que l'histidine-334 joue ce rôle, l'histidine ayant un pK_a d'environ 6,1.

Conclusion

Étant donné la structure tridimensionnelle de la transglutaminase, il semble raisonnable de postuler que la base générale impliquée dans les résultats cinétiques présentés dans ce chapitre soit l'histidine de la triade catalytique postulée (Cys-276, His-334 et Asp-358) chez l'humain. Il est à noter que le remplacement par mutagenèse dirigée de l'histidine correspondante chez le facteur XIIIa par une asparagine résulte en une perte complète d'activité, renforçant l'hypothèse voulant que cette histidine joue un rôle crucial dans l'activité catalytique de la transglutaminase¹². Il serait intéressant d'effectuer ce genre d'expérience sur la TGase de foie de cochon d'Inde.

Bibliographie

- ¹ Aeschlimann, D. et Paulsson, M., *Tromb. Haemostasis*, **1994**, *71*, 402-415.
- ² Leblanc, A.; Gravel, C.; Labelle, J. et Keillor, J.W. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 8335-8342
- ³ Folk, J.E. et Finlayson, J.S., *Adv. Protein Chem.*, **1977**, *31*, 1-133.
- ⁴ Folk, J.E. et Cole, P.W. *J. Biol. Chem.*, **1966**, *241*, 5518-5525.
- ⁵ Chung, S.I.; Shrager, R.I. et Folk, J.E., *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 6424-6435
- ⁶ Gross, M.; Whetzel, N.K. et Folk, J.E., *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 4648-4655
- ⁷ Leblanc, A., **1999**, *Mémoire de Maîtrise*, Université de Montréal
- ⁸ Gagnon, P., **2000**, *Mémoire de Maîtrise*, Université de Montréal
- ⁹ Day, N. et Keillor, J.W., *Anal. Biochem.* **1999**, *274*, 141-144.
- ¹⁰ Greenberg, C.S.; Birckbichler, P.J. et Rice, R.H., *FASEB J.*, **1991**, *5*, 3071-3077
- ¹¹ Lowry, T.H. et Richardson, K.H. *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, **1987**, Harper&Row, New York.
- ¹² Mircanovic, R.; Procyk, R.; Lyn, W. et Matsueda, G.R., *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 9190-9194



Chapitre 4 : Sulfoxyde et Sulfone

Introduction

La TGase étant une enzyme dont le nucléophile catalytique est une cystéine, elle est susceptible aux inhibiteurs irréversibles de protéases à cystéines classiques, notamment la 1,5-iodoacétyl-5'-(sulfonyl-1-naphthyl)-éthylènediamine¹, l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)², l'hydroxymercuribenzoate³, l'iodoacétamide², la N-éthylmaléimide⁴ et le *p*-chloromercuribenzoate¹. (Voir figure 4.1)

De plus, certains inhibiteurs irréversibles ont été développés par notre groupe de recherche. Ceux-ci comportent un motif de reconnaissance, le Cbz-Xaa-Gly, sur lequel est greffé la fonctionnalité inhibitrice. Ces inhibiteurs⁵ ont pour fonction inhibitrice les amides α,β -insaturés et les époxydes correspondants.

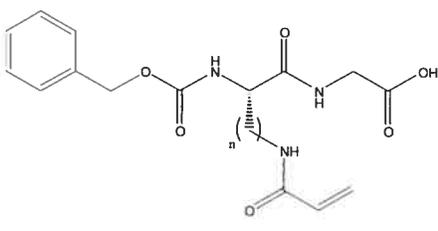
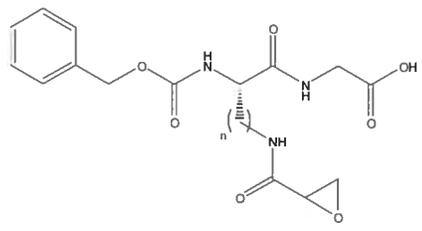
							
n	k_{inact} (min^{-1})	K_I (μM)	k_{inact}/K_I ($\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)	n	k_{inact} (min^{-1})	K_I (μM)	k_{inact}/K_I ($\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$)
1	1,34	2,75	0,49	1	0,60	1,10	0,55
2	0,59	0,48	1,24	2	0,81	1,23	0,66
3	0,54	0,28	1,95	3	0,63	0,56	1,12
4	0,46	0,15	3,00	4	0,59	0,59	1,00

Tableau 4.1 : Données cinétiques de quelques inhibiteurs⁵.

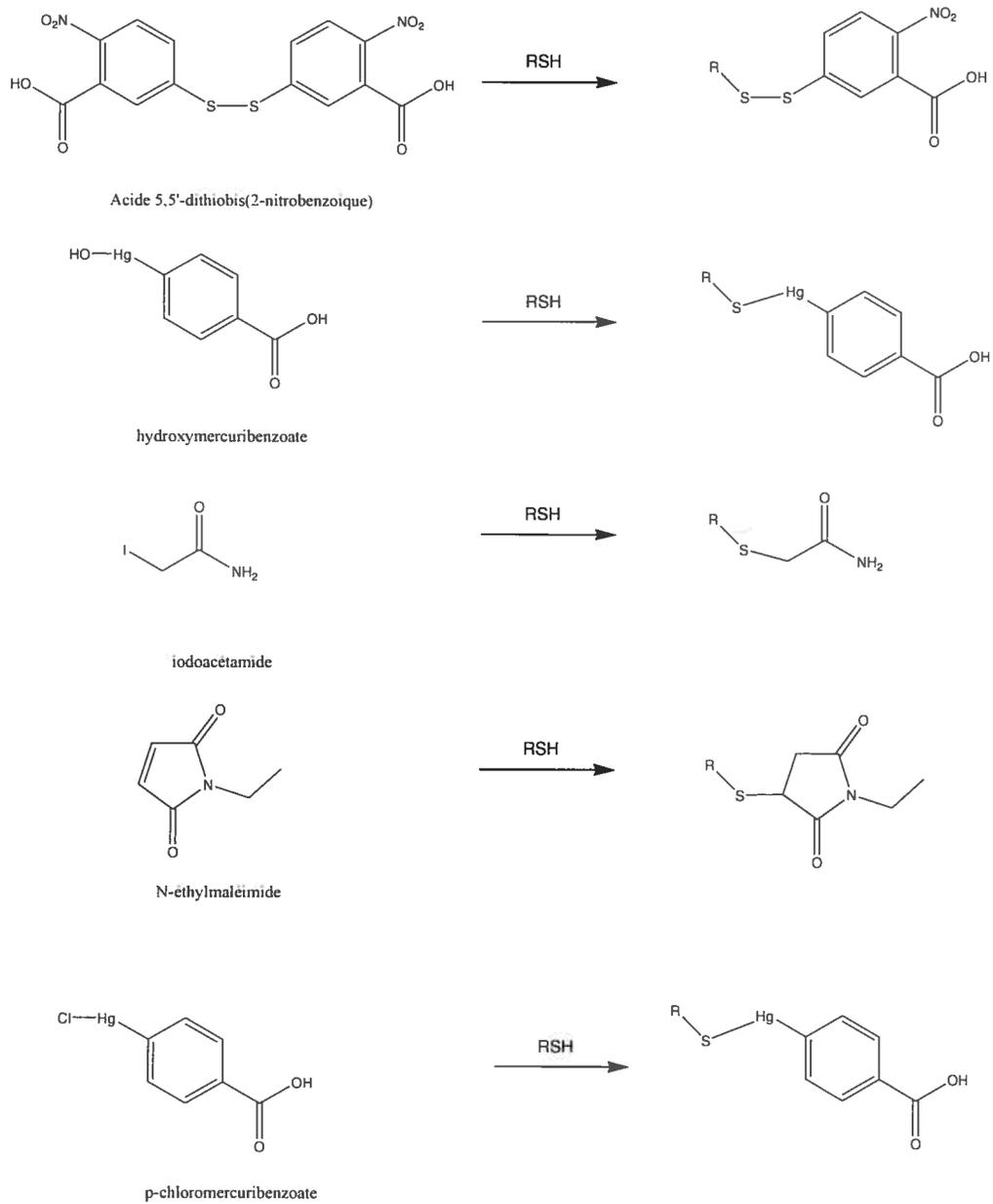


Figure 4.1 : Inhibition irréversible de la TGase (RSH) par divers inhibiteurs.

Finalement, une autre famille de substrats, développés en collaboration avec Danielle Lapierre, s'est montrée agir comme inhibiteur irréversible. L'étude détaillée de cette dernière famille a été présentée précédemment dans cet ouvrage, au chapitre 2.

Nouveaux inhibiteurs envisagés

La synthèse d'inhibiteurs dont la forme est basée sur la structure de l'état de transition fait souvent appel à des molécules mimant l'intermédiaire chiral tétraédrique résultant de l'attaque du résidu nucléophile sur le substrat. Il devient donc intéressant et essentiel de mieux définir l'arrangement spatial des résidus du site actif et des interactions stabilisant cet intermédiaire tétraédrique. Une distinction entre les deux faces d'approche chirales d'une fonction sulfoxyde pourrait apporter de nouvelles informations à ce sujet. Un analogue de type sulfone peut aussi être un analogue de l'intermédiaire tétraédrique du mécanisme de transglutaminase et mérite donc d'être étudié.

La sulfone de méthionine

La synthèse en quelques étapes de la N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfone à partir de la L-méthionine a été faite (voir à la fin de ce chapitre) et des expériences de compétition avec un substrat chromogène ont eu lieu. Ce genre d'expérience sera décrit plus loin dans ce chapitre. Lors de ces expériences, il a été démontré que la présence ou l'absence de la sulfone dans le milieu réactionnel n'avait aucun effet. On peut donc supposer que puisque la sulfone semble incapable d'agir comme inactivateur de la transglutaminase, même dans des concentrations de 20 mM, elle n'est pas liée au site actif de l'enzyme. A cause de manque d'affinité, il ne sera pas discuté plus en détail de la sulfone de méthionine.

Les sulfoxydes de méthionine

Un isostère de la fonction carbonyle pouvant bien mimer l'intermédiaire tétraédrique par lequel passe la réaction d'acylation de la TGase est la fonction sulfoxyde. En effet, la fonction sulfoxyde a une géométrie plutôt tétraédrique et le lien soufre-oxygène est généralement reconnu comme étant plus près du zwitterion que du lien covalent neutre. Il y a donc ici un système dans lequel le site électrophile du carbonyle est remplacé par un atome de soufre électrodéficient et l'oxyanion de l'intermédiaire tétraédrique est remplacé par un oxygène pratiquement anionique. De plus, contrairement à la sulfone, le sulfoxyde montre beaucoup moins d'encombrement sur l'une de ses faces, permettant une bonne disposition près du nucléophile du site actif (voir figure 4.2).

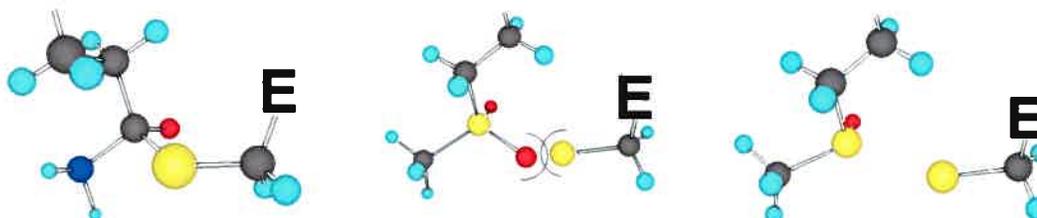


Figure 4.2 : Illustration de l'intermédiaire tétraédrique proposé (gauche), d'un inhibiteur de type sulfone (centre) et de type sulfoxyde (droite).

Pour des raisons de simplicité synthétique, la chiralité de la fonction sulfoxyde n'a pas été contrôlée lors des premières synthèses et ce sont les mélanges diastéréoisomériques qui ont été testés. Il est facile d'oxyder le soufre de la méthionine, un acide aminé peu coûteux, pour ensuite ajouter le groupe protecteur N-benzyloxycarbonyl au sulfoxyde de méthionine ainsi obtenu. Alternativement, on peut d'abord protéger la fonction amine de la méthionine par le groupement N-benzyloxycarbonyl pour ensuite procéder à l'oxydation de la molécule obtenue. Un contrôle de la stœchiométrie de l'oxydant utilisé est ici important pour limiter la formation de sulfone. (voir figure 4.3)

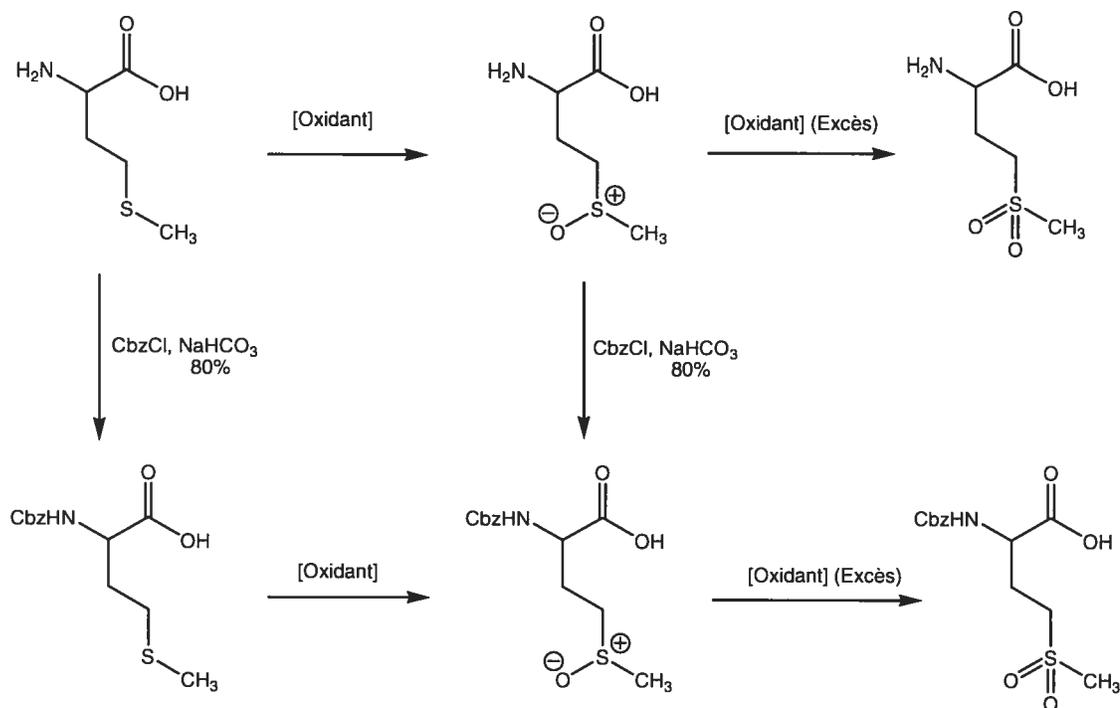


Figure 4.3 : Voies synthétiques

Les premiers échantillons testés comportaient une contamination à l'ester benzylique de N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine, probablement due à la présence de chlorure de benzyle dans le chloroformate de benzyle utilisé lors de la synthèse. C'est pour éviter cette contamination qu'une voie alternative où les étapes de synthèse ont été inversées a été utilisée. En effet, la purification des sulfoxydes est légèrement plus difficile en raison de leur forte polarité mais puisque l'étape d'oxydation s'effectue quantitativement et proprement, une inversion des étapes a permis l'obtention plus rapide d'échantillons plus propres sans nécessiter de purifications difficiles.

Le ratio diastéréomérique du mélange obtenu a été déterminé grâce à l'intégration de l'aire des pics caractéristiques du méthyle terminal de la chaîne latérale de la méthionine, clairement résolus sur des spectres de ^{13}C pris sur un RMN 400 MHz. Lors de ces mesures, l'intervalle entre les impulsions est fixé à 10 secondes pour assurer une intégration aussi représentative que possible. Pour tous les oxydants testés (H_2O_2 , mCPBA et NaIO_4), le ratio des diastéréoisomères obtenus était de 1 : 1. De plus, aucune

séparation des diastéréoisomères n'a été possible par les techniques standard de purification telle la cristallisation et la chromatographie sur gel de silice. Le mélange 1 :1 des deux diastéréoisomères a donc été testé tel quel.

Type d'inhibition

Pour déterminer le type d'inhibition de la (*RS*)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde, des expériences préliminaires de cinétique de compétition ont été effectuées.

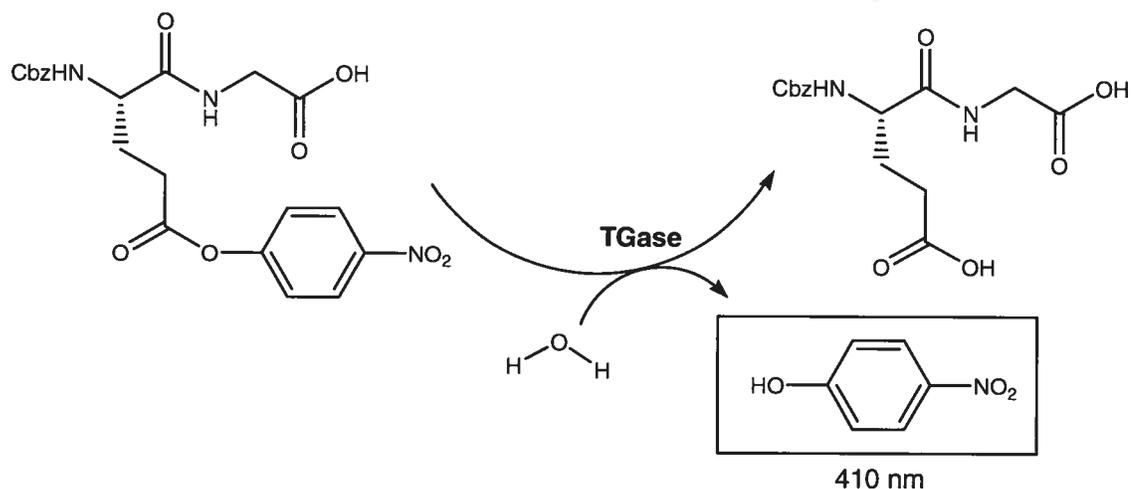


Figure 4.4 : Méthode spectrophotométrique de suivi cinétique.

Dans ces expériences, on utilise une quantité variable d'un substrat donneur chromogène, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-(O-*p*-nitrophenyl)-glycine. Ce chromogène est hydrolysé par la transglutaminase en présence d'une quantité variable d'inhibiteur. La vitesse de relâchement du *p*-nitrophenol est suivie spectrophotométriquement à une longueur d'onde d'absorbance de 410 nm (voir figure 4.4). Pour toutes les mesures, les cellules spectrophotométriques contenaient 3 mM de chlorure de calcium, 50 μ M d'EDTA et 100 mM de tampon MOPS à un pH de 7,0. Le

substrat et l'inhibiteur ont été ajoutés au mélange sous la forme d'une solution de N,N-diméthylformamide (DMF), résultant en une concentration finale en DMF de 5% v/v dans tous les cas. Les réactions ont eu lieu à 25 °C et des blancs non enzymatiques où la transglutaminase a été remplacée par de l'eau désionisée ont été utilisés pour corriger les vitesses observées. Dans tous les cas, la réaction était initiée par l'ajout de l'enzyme au mélange et les mesures d'absorbance étaient débutées immédiatement. (voir figure 4.5)

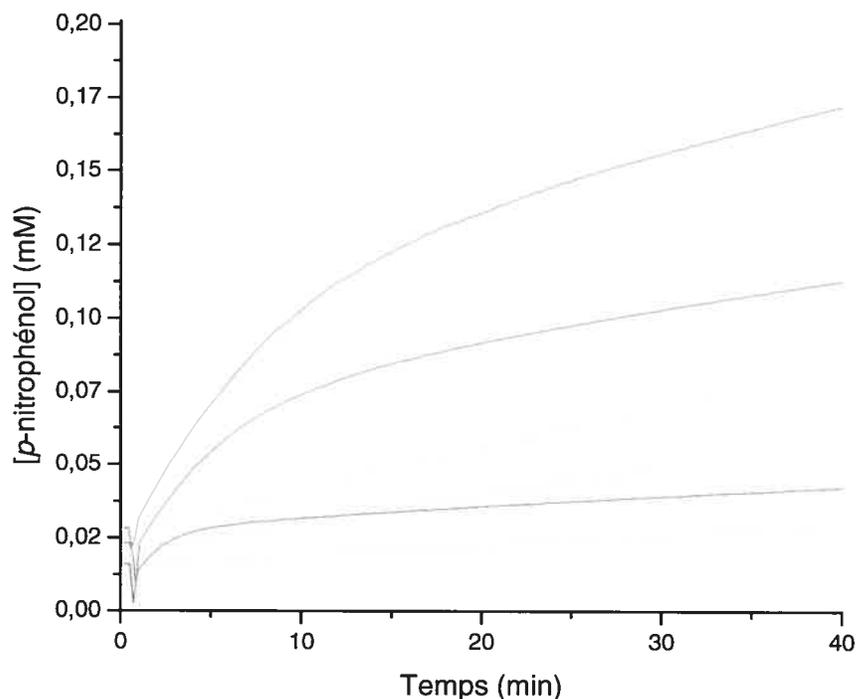


Figure 4.5 : Hydrolyse de quantités variables (vert = 0,5 mM, rouge = 0,3 mM, bleu = 0,1 mM) de N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-O-(*p*-nitrophényl)glycine par 30 µg/mL de transglutaminase tissulaire, en présence de 21,4 mM de (*RS*₃)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde. Les lignes pointillées correspondent aux blancs non-enzymatiques et les lignes continues aux réactions enzymatiques.

L'allure générale des courbes obtenues lors de l'hydrolyse de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-O-(*p*-nitrophényl)-glycine en présence de N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde s'est avérée être celle d'une inhibition irréversible dépendante du temps. En effet, une vitesse initiale répondant assez bien à un

profil d'inhibition compétitive (voir plus loin) était suivie d'une diminution graduelle de la vitesse observée jusqu'à ce qu'il ne reste que l'hydrolyse chimique de substrat pour générer d'avantage de *p*-nitrophénol. Les courbes présentées à la figure 4.5 sont représentatives de ce phénomène. Dans cette figure, les courbes pleines et pointillées représentent respectivement les essais avec et sans enzyme. Il peut y être clairement vu qu'après 5 à 15 minutes, les deux séries ont des vitesses de réaction identiques et constantes, ce qui résulte graphiquement en l'obtention de droites parallèles. Pour bien caractériser l'inhibiteur, une première étape est de déterminer avec certitude le type d'inhibition (compétitive, incompétitive ou non compétitive), en utilisant les vitesses observées lors des premiers instants de la réaction. En effet, lors des premiers instant, l'inhibition irréversible de l'enzyme n'a pas encore eu lieu suffisamment pour perturber la vitesse observée et celle-ci ne dépend donc que de la compétition qu'il y a (ou qu'il n'y a pas) entre le substrat et l'inhibiteur, pour le site actif de la protéine. Ici, puisque le temps nécessaire à l'inactivation complète de l'enzyme est proportionnel à la quantité de substrat présente, il peut être anticipé que l'inhibiteur sera de type compétitif. Une fois le type d'inhibition déterminé, les valeurs d'affinité (K_I) et de vitesse d'inactivation (k_{inact}) peuvent être déterminées.

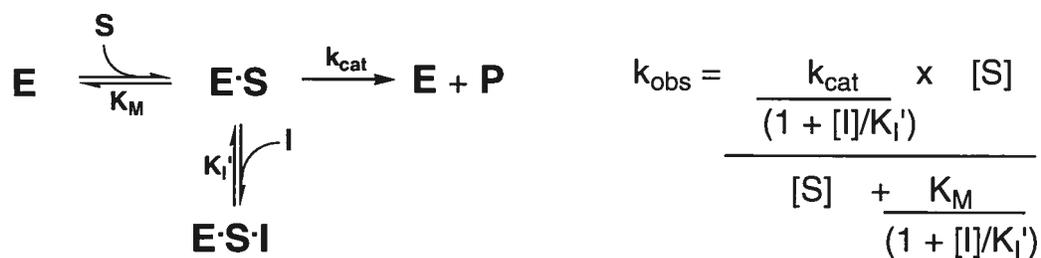
La détermination des paramètres cinétiques de la réaction enzymatique, K_M et k_{cat} , en présence de diverses concentrations d'inhibiteur permet de déterminer le type de liaison de l'inhibiteur à l'enzyme. Les divers types de liaison et les variations observées sur le K_M et le k_{cat} qui en résultent sont représentées à la figure 4.6. Dans cette figure, **E** représente l'enzyme, **S** le substrat, **P** le produit et **I** l'inhibiteur.

Trois concentrations (0, 8 et 20 mM) de N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde ont été utilisées pour déterminer les valeurs de k_{obs} et K_{Mobs} de l'hydrolyse enzymatique d'une quantité fixe de N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-O-(*p*-nitrophényl)glycine. L'inhibiteur étant de type irréversible, les vitesses réactionnelles ont été déterminées à partir du tout début de suivi cinétique, avant qu'une courbure due à l'inhibition irréversible ne soit observée. Les courbes de saturation ainsi obtenues sont représentées à la figure 4.7.

Inhibition compétitive



Inhibition incompétitive



Inhibition non compétitive

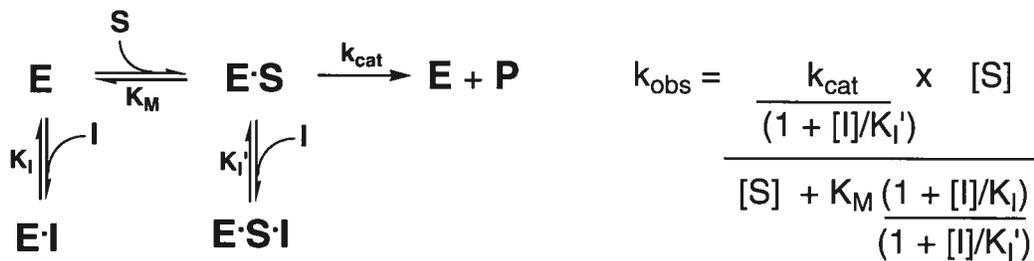


Figure 4.6 : Types d'inhibition réversibles enzymatique et équation hyperbolique s'y rattachant.

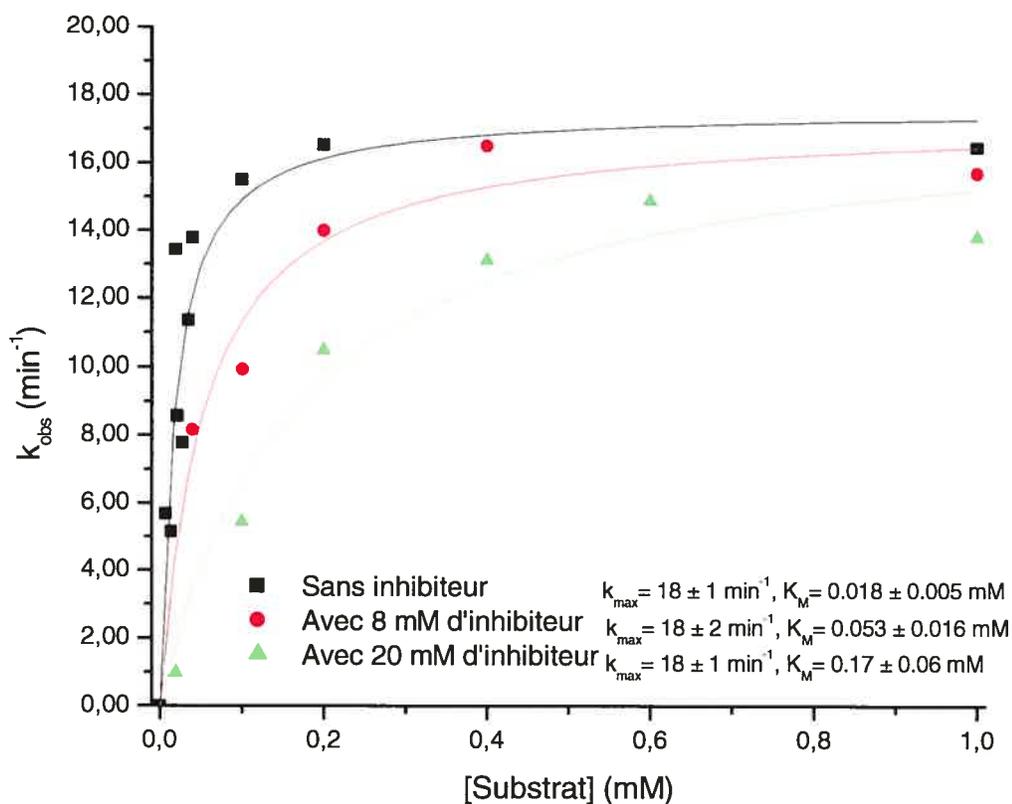


Figure 4.7 : Courbe de saturation de l'hydrolyse de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl-O-(p-nitrophényl)glycine par la transglutaminase tissulaire, en présence de quantités variables de (RS)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde.

Il est facile de constater que seule la valeur de la constante de Michealis-Menten (K_M) est affectée par la présence de N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde. L'inhibiteur agit donc selon un mode de liaison de type compétitif, tel qu'attendu. En effet, la figure 4.5 avait montré la diminution de l'effet d'inhibition irréversible lors de l'augmentation de la concentration de substrat. Cela indique une protection du site actif par la présence de substrat et concorde avec un mode de liaison compétitif.

Détermination du K_I

Puisque dans un modèle compétitif la valeur du K_{Mobs} dépend linéairement de la concentration d'inhibiteur utilisée, on peut facilement déterminer la valeur de la constante d'affinité (K_I) de ce dernier en traçant le graphique illustré à la figure 4.8.

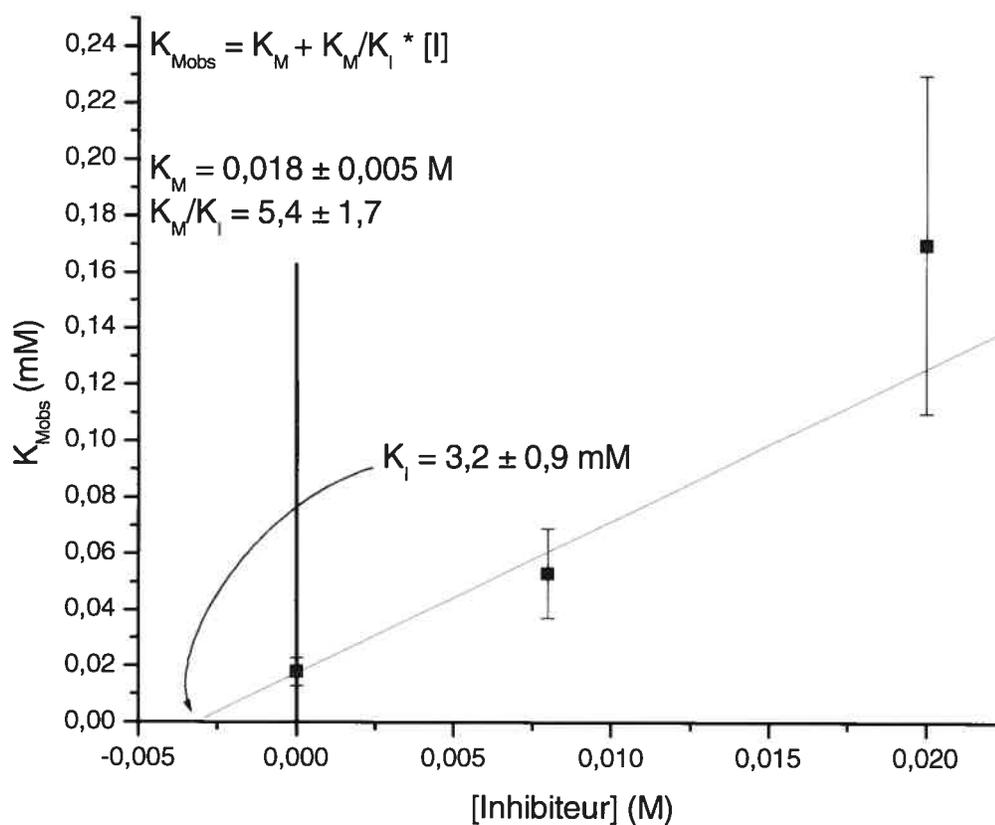


Figure 4.8 : Détermination de la valeur de la constante d'affinité (K_I) de l'inhibiteur (*RS*₅)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde. La régression linéaire tient compte du poids statistique des erreurs sur chaque point.

Une régression linéaire a été tracée en tenant compte du poids statistique des erreurs sur chaque point. La faible quantité de points explique la grande incertitude retrouvée sur la valeur de K_I ainsi déterminée et une autre méthode de détermination a

été utilisée pour confirmer cette valeur (voir plus bas). Avec une constante d'affinité de $3,2 \pm 0,9$ mM, la N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sufoxyde n'est pas aussi bien reconnue que la plupart des autres substrats et inhibiteurs rencontrés dans la littérature et développés dans le groupe. L'utilité d'un inhibiteur irréversible dépendant aussi de la vitesse à laquelle il inactive l'enzyme (k_{inact}), cette valeur doit être déterminée.

Détermination du $k_{inactivation}$

Pour déterminer la constante d'inactivation, des expériences d'incubation de l'enzyme en présence de l'inhibiteur ont eu lieu, avec une mesure de l'activité résiduelle à différents temps. Pour chaque concentration d'inhibiteur utilisée, la constante de vitesse ($k_{inact(obs)}$) de la décroissance exponentielle observée a été déterminée par régression non linéaire. Les valeurs de $k_{inact(obs)}$ ainsi obtenues ont été représentées en fonction de la concentration d'inhibiteur pour obtenir une courbe de saturation permettant de confirmer la valeur de la constante d'affinité (K_i) et de déterminer la valeur de la constante de vitesse d'inactivation (k_{inact}) de ce système. La courbe obtenue est représentée à la figure 4.9.

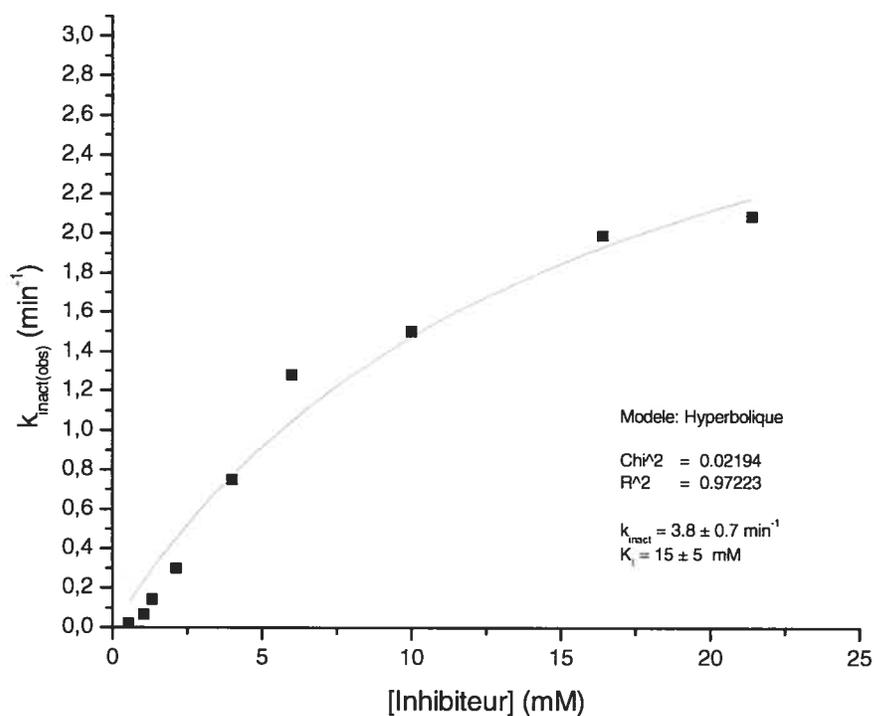


Figure 4.9 : Détermination de la valeur de la constante d'affinité (K_I) et la vitesse d'inactivation (k_{inact}) de l'inhibiteur (RS_S) -N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde.

La courbe de saturation obtenue confirme que l'inhibiteur a une constante d'affinité élevée, de $15 \pm 5 \text{ mM}$ et une constante de vitesse d'inactivation de $3,8 \pm 0,7 \text{ min}^{-1}$. Le tableau 4.2 fait la comparaison de cet inhibiteur à quelques autres inhibiteurs irréversibles^{5,6,7}.

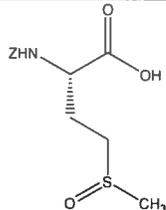
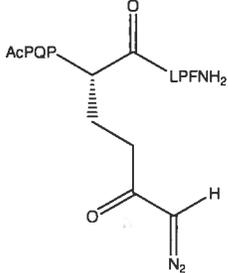
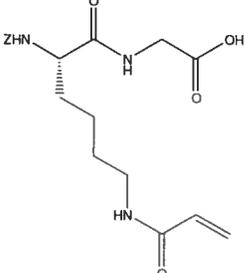
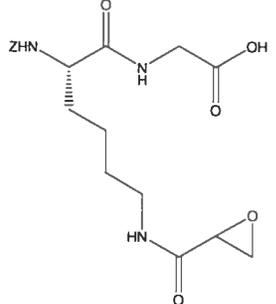
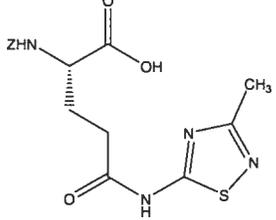
Ref.	Structures	K_I (μM)	k_{inact} (min^{-1})	k_{inact}/K_I ($\text{min}^{-1}/\text{mM}$)
Ce travail		15 000	3,8	0,00025
7		0,00007	0,20	2900
5		0,150	0,46	3,1
5		0,590	0,59	1,0
6		0,770	0,69	0,90

Tableau 4.2 : Comparaison de l'efficacité inhibitrice de la N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde avec divers inhibiteurs irréversibles. L'erreur sur les valeurs est de 10 à 30 %.

Une comparaison rapide des constantes cinétiques mesurées pour la N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde et pour les autres inhibiteurs représentés au tableau 4.2 montre dans un premier temps, que la vitesse d'inactivation du sulfoxyde est supérieure à celle des autres inhibiteurs. Ce qui nuit donc principalement à l'efficacité du dérivé sulfoxyde comme inhibiteur, c'est sa faible reconnaissance par la transglutaminase. C'est donc sur cet aspect qu'il faudrait travailler.

Dans le but d'améliorer l'affinité de l'inhibiteur, quelques variations du motif de reconnaissance ont été effectuées. Celles-ci sont représentées au tableau 4.3.

Composés	K_I (mM)	k_{inact}
<i>(RS_S)</i> -N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde-OH	15 ± 5 mM	$3,8 \text{ min}^{-1}$
<i>(RS_S)</i> -N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde-OBn	4 ± 2 mM	-
<i>(RS_S)</i> -N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde-Gly-OH	>10 mM	-

Tableau 4.3: Variations structurelles de l'inhibiteur sulfoxyde

Contrairement à ce qui était attendu, l'ajout d'une glycine en C-terminal n'a pas amélioré l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur. De plus, le comportement irréversible et dépendant du temps a été perdu lors de l'ajout du benzyle ou de la glycine. Il peut donc être supposé que le sulfoxyde de méthionine et/ou le dérivé glyciné ne se lie peut-être pas au site actif de la même manière que ne le font les substrats habituels qui comportent une glycine. Aucune hypothèse spécifique ne sera faite à ce sujet, faute d'avoir suffisamment d'information structurelle. En effet, aucune structure tridimensionnelle de l'enzyme liée à un quelconque ligand n'est actuellement disponible.

Effets distincts des deux diastéréoisomères

Dans le but de déterminer plus précisément les propriétés inhibitrices de chacun des diastéréoisomères individuellement, une méthode de cristallisation de l'isomère $S_C S_S$ du sulfoxyde de méthionine a été utilisée. (Voir figure 4.10). Cette méthode¹², vieille de 44 ans, a permis l'obtention de l'isomère $S_C S_S$ avec une pureté de 95%, déterminé par RMN du ^{13}C . (Groupement méthyle terminal : δ 26,2 ppm (isomère $S_C S_S$) vs δ 25,9 ppm (isomère $S_C R_S$)),

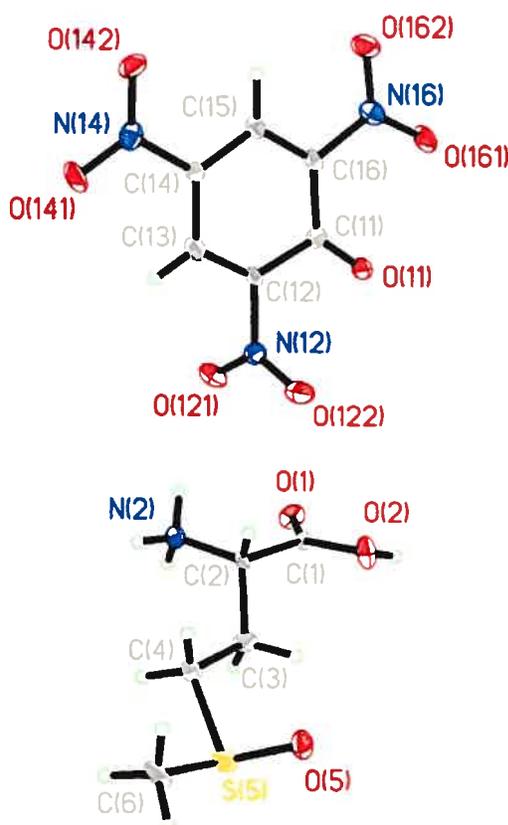


Figure 4.10 : Structure cristalline du diastéréoisomère de sulfoxyde de L-méthionine purifié par cristallisation. Le contre ion est l'acide picrique.

À partir de ce produit diastéréotopiquement pur, la ($S_C S_S$)-N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde a été synthétisée selon la même procédure que pour le mélange

diastéréotopique. Ce produit a été testé et n'a présenté aucune activité inhibitrice. On peut donc en conclure que c'est le diastéréoisomère de configuration $S_C R_S$ qui possède toute l'activité. Cela veut donc dire que la valeur de K_I préalablement établie à 15 mM serait plutôt d'environ 7,5 mM pour le composé diastéréotopiquement pur. Ceci n'est toutefois pas significatif, car peu importe la valeur, elle est trop élevée pour être utile. Il est à noter ici que la cristallisation n'a permis d'isoler qu'une faible quantité de l'isomère $S_C S_S$ et que la solution mère n'était donc pas particulièrement enrichie en isomère $S_C R_S$. Faute d'avoir ce dernier en main, ses constantes cinétiques n'ont pas été déterminées et aucun effort additionnel n'a été alloué à la synthèse d'autres dérivés sulfoxydes.

Mécanisme d'inactivation

Il est à première vue difficile de proposer une explication pour l'inhibition irréversible causée par la fonction sulfoxyde, une fonction plutôt stable et n'étant pas connue pour avoir un quelconque effet irréversible. C'est en lisant des publications^{8,9} décrivant le mécanisme de la méthionine sulfoxyde réductase qu'une hypothèse valable a pu être proposée.

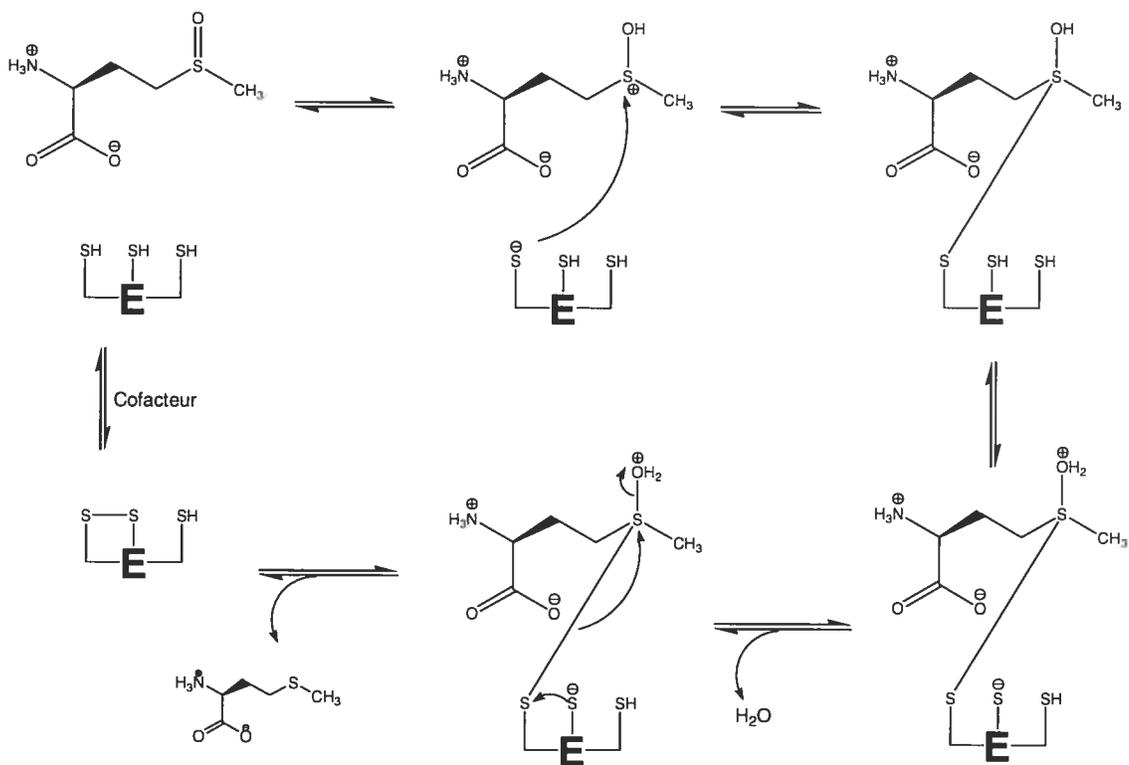


Figure 4.11 : Mécanisme d'action de la méthionine réductase A.¹⁰

La méthionine sulfoxyde réductase est une petite protéine ayant pour fonction la réduction du sulfoxyde de méthionine. Le mécanisme proposé pour cette réaction est le suivant. D'abord, le sulfoxyde est lié non covalent à l'enzyme qui comporte trois cystéines en son site actif. Après le transfert d'un proton, l'une des cystéines forme un lien avec le soufre de la fonction sulfoxyde. Par la suite, il y a protonation de la fonction

S-hydroxysulfide et la méthionine peut être relâchée suite à la formation d'un pont disulfure. En milieu biologique, plusieurs petites molécules comme de glutathion ont pour fonction la réactivation de la méthionine réductase. La figure 4.11 décrit toutes ces étapes. Il est proposé que la cystéine du site actif puisse faire l'attaque nucléophile sur le sulfoxyde. Par la suite, l'oxygène du groupement sulfoxyde peut être protonné à deux reprises avant qu'une deuxième attaque nucléophile ne permette l'élimination de la méthionine et d'une molécule d'eau. Ces attaques se feraient par le soufre de la cystéine de la triade catalytique et par la cystéine distale, ou vice-versa.

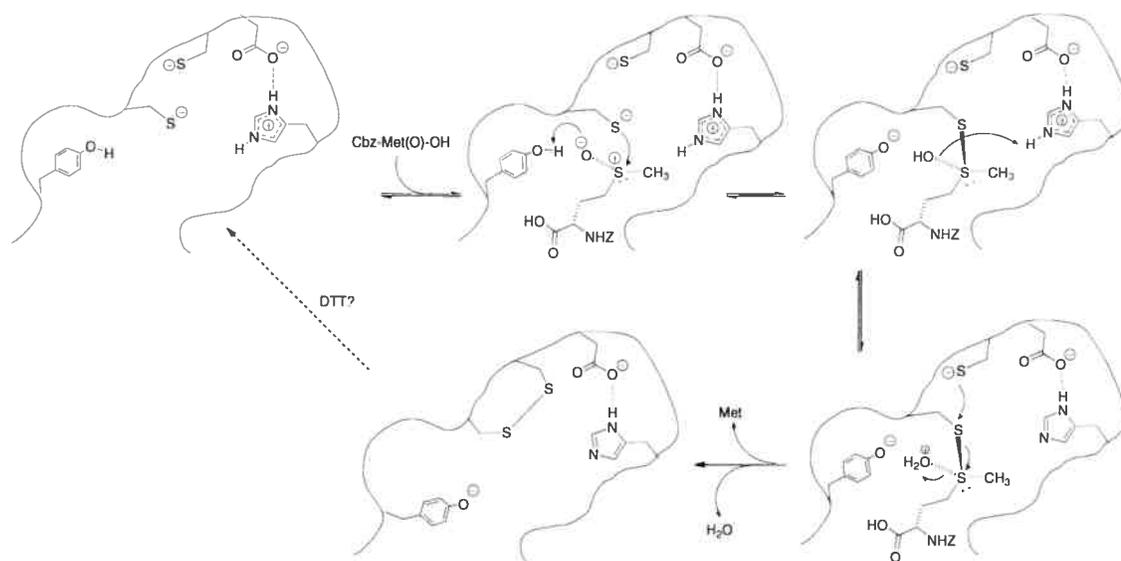


Figure 4.12 : Proposition d'un mécanisme d'inactivation de la transglutaminase par le sulfoxyde de méthionine.

Dans le but de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, une expérience simple d'inactivation/réactivation a été effectuée. Une solution d'enzyme a été incubée avec 2 mM d'inhibiteur et un aliquot de cette solution a été prélevé après divers temps. Comme attendu, l'activité enzymatique, mesurée par le test standard à l'hydroxamate, a diminué d'environ 70% après une heure. Une portion de la solution restante a alors été prélevée et mélangée à une solution contenant 30 mM de dithiothéitol (DTT), un réducteur de ponts disulfures bien connu (voir figure 4.12).

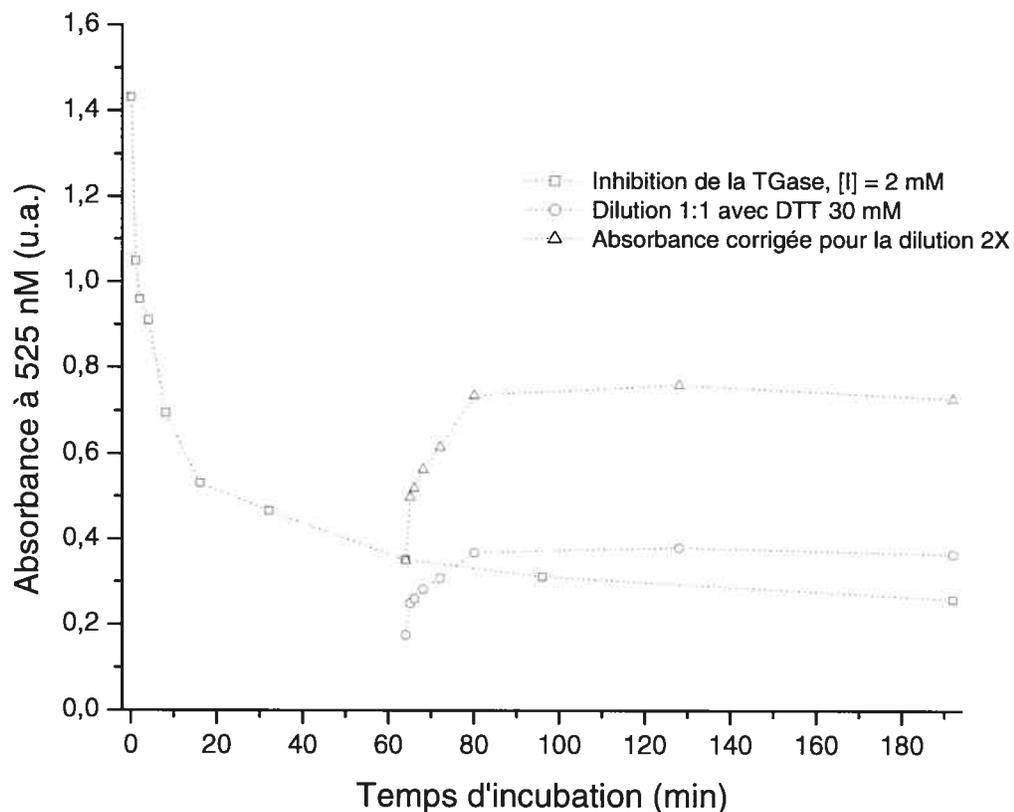


Figure 4.13 : Inactivation de la transglutaminase par la N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfoxyde et réactivation par le DTT.

La restauration d'environ 30% de l'activité perdue semble confirmer que l'inhibition est causée par une réaction d'oxydoréduction d'un ou plusieurs résidus du site actif. De plus, il semble que le DTT ne parvienne à réactiver l'enzyme qu'à 50%. Cela peut s'expliquer par le fait que suite à l'ajout du DTT, il reste toujours en solution une bonne quantité de sulfoxyde et un équilibre dans lequel l'inactivation et la réactivation auraient la même vitesse serait alors obtenu. Sans la structure cristalline de l'enzyme inhibée, il est difficile d'en dire plus à ce sujet.

Conclusion et travaux futurs

Un nouveau type d'inhibiteur irréversible ayant été découvert, il pourrait être intéressant d'étudier plus en profondeur le mécanisme d'inactivation prenant place. En effet, l'inactivation par oxydoréduction à partir d'un sulfoxyde n'est pas chose courante et mérite plus d'attention par soucis académique. D'un point de vue pratique, deux arguments suggèrent cependant de ne pas investir trop d'efforts sur ce type d'inhibiteur.

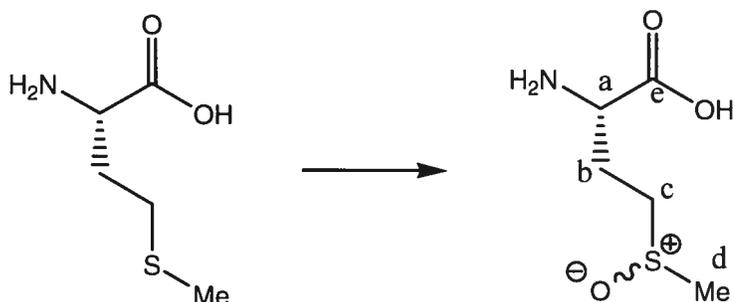
D'abord, la faible efficacité des inhibiteurs synthétisés n'augure pas bien pour d'autres composés du genre. Le K_i de l'ordre du mM rend l'inhibiteur d'une utilité limitée. Il est peut-être possible de régler ce problème en intégrant la fonction sulfoxyde dans une séquence mieux reconnue, comme la séquence peptidique PQPXLPF¹¹.

Deuxièmement, le sulfoxyde de méthionine ne pourrait être envisagé comme pharmacophore car plusieurs voies métaboliques ont pour but la réduction de ce résidu. Un tel inhibiteur serait probablement rapidement réduit par le milieu cellulaire et ne serait donc pas utile pour des tests *in vivo*. Il est cependant possible que l'affinité de ces enzymes pour un peptide utilisant la séquence PQPXLPF soit faible.

Pour ces raisons, peu d'efforts supplémentaires seront mis sur ce projet pour l'instant.

Partie expérimentale

Synthèse du sulfoxyde de L-méthionine ¹²



Une masse de 9 g de L-méthionine est dissoute dans 6,6 mL de HCl concentré, 45 mL d'eau et 75 mL de méthanol. À 0°C, 8,2 mL de peroxyde 30% v/v sont ajoutés et le volume est complété à 150 mL avec de l'eau. La solution est agitée à température ambiante pendant 3 heures. 8 mL d'amylamine et 75 mL de méthanol sont ajoutés. Quelques minutes plus tard, 750 mL d'acétone sont ajoutés et le précipité est filtré. Le solide obtenu est recristallisé avec H₂O/acétone pour donner 5,2 g d'un solide blanc cristallin.

Rendement : 60%

RMN ¹H : (D₂O) δ (ppm) J (Hz); 2,15 (2H(b), q, J = 7,5); 2,57 (3H(d), s); 2,83 (2H(c), m); 3,71 (1H(a), q, J= 8 Hz).

RMN ¹³C : (D₂O) δ (ppm); Mélange des deux diastéréoisomères; (24,09/24,08)(b); (36,71/36,83)(d); (48,50/48,54)(c); (53,61/53,80)(a); 174(e)

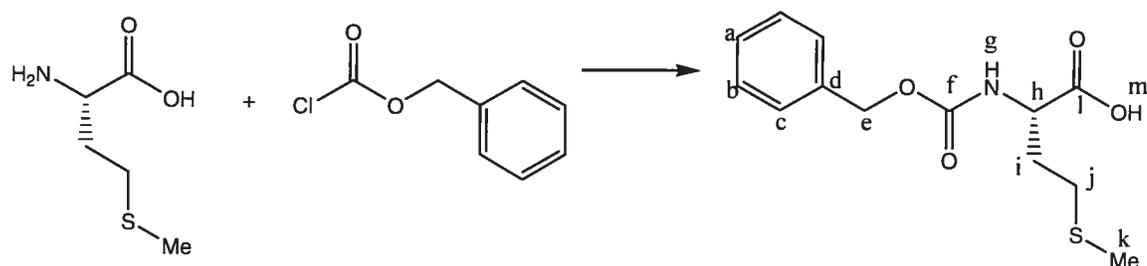
Spectre de masse: Calc pour C₅H₁₁NO₃S+H :166,05324. Trouvé : 166,05340

Séparation des deux diastéréoisomères par formation d'un sel diastéréomérique¹²

On dissout 2,6 g du mélange dans 10 mL d'eau et on ajoute, goutte-à-goutte, 90 mL d'une solution de méthanol contenant 3,44 g d'acide picrique (explosif). Après 20 heures, le solide est filtré et recristallisé dans 30 mL d'eau chaude (70 °C). 1,5 g de cristaux du sel d'acide picrique sont formés et resuspendus dans 25 mL d'eau. 500 µL d'amylamine et 250 mL d'acétone sont finalement ajoutés pour faire précipiter 1,1 g du S_CS_S-sulfoxyde de méthionine pur.



Synthèse de la N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine



Une masse de 5 g (33,5 mmol) de L-Méthionine et 28 g de bicarbonate de sodium sont dissous dans 150 mL d'eau et amené à 0°C. 5,5 mL de chloroformate de *p*-nitrophényle sont ajoutés goutte à goutte pendant 25 minutes et la solution est agitée pendant la nuit, à température ambiante. Le lendemain, la phase aqueuse est lavée à l'éther et est ensuite acidifiée avec HCl 1M jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement gazeux. La phase aqueuse est alors extraite avec 4 x 50 mL d'acétate d'éthyle. Le solvant organique est évaporé *in vacuo* et le produit obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice avec un mélange 30/65/5 AcOEt/hexanes/AcOH comme éluant. 8,19 g d'un solide blanc sont obtenus.

Rendement : 91%

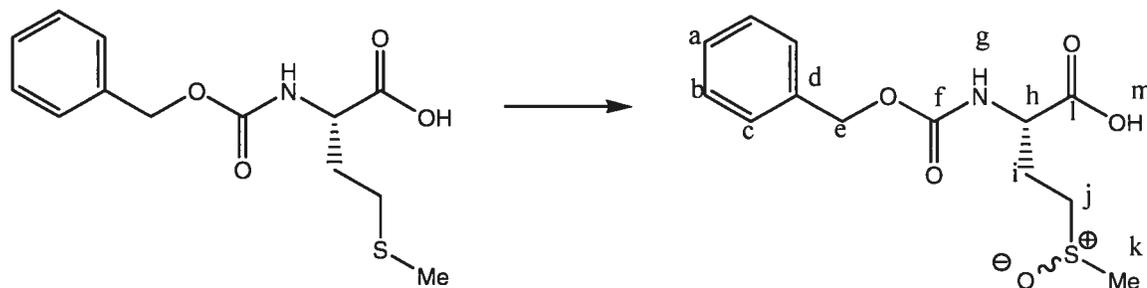
RF : 0,10 (50/50 AcOEt/hexanes)

RMN ¹H : (CDCl₃) δ (ppm); 2,0 (1H(i), m); 2,1 (3H(k), s); 2,2 (1H(i), m); 2,55 (2H(j), m); 4,55 (1H(h), m); 5,1 (2H(e), s); 5,55 (1H(g), d, J=8,2 Hz); 7,3 (5H(a,b,c), m); 9,2 (1H(m), s).

RMN ¹³C : (CDCl₃) δ (ppm); 15,21(m); 29,74(j); 31,39(i); 52,88(h); 67,11(e); 126,97(c); 127,99(a); 128,43(b); 135,86(d); 156,05(f); 176,06(l).

Spectre de masse: Calc pour C₁₃H₁₇NO₄S+H : 284,09511. Trouvé : 284,09603

Synthèse de la (RS_s)-N-benzyloxycarbonyl-S-oxo-L-méthionine (Voie numéro 1)



À 350 mg (1,24 mmol) de N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sont ajoutés 127 mL (1,24 mmol) de peroxyde d'hydrogène 30% v/v dans 3 mL de méthanol. Après 16h, on évapore la solution *in vacuo* pour obtenir un solide blanc.

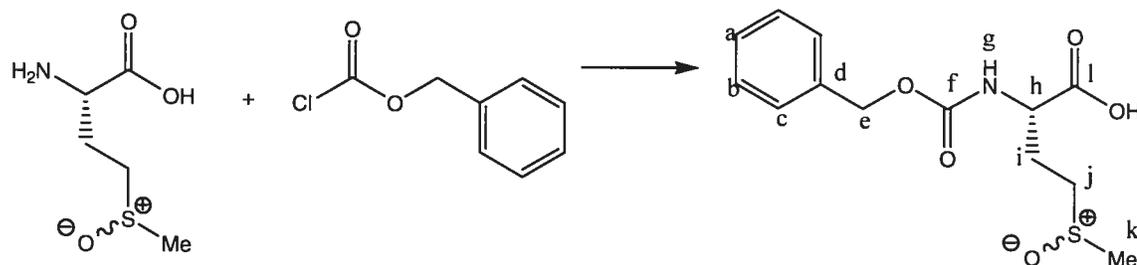
Rendement : Quantitatif

RMN ¹H : (CD₃OD) δ (ppm) J (Hz); 2,12 (1H(i), m); 2,39 (1H(i), m); 2,57 (3H(k), s); 2,8 (2H(j), m); 4,28 (1H(h), m); 5,12 (2H(e), s); 7,3 (5H(a,b,c), m).

RMN ¹³C : (CD₃OD, mélange de diastéréoisomères) δ (ppm) ((**26,2/25,9**)(b) ; (**38,3/38,2**)(d) ; (**51,2/51,0**)(c) ; (**54,6/54,3**)(a) ; 67,83(e); 128,23(c); 128,56(a); 129,02(b); 142,3(d); 158,34(f); 175,30(l). *Les valeurs en caractères gras sont celles de l'isomère S_CS_s.

Spéctre de masse: Calc pour C₁₃H₁₇NO₅S+H : 300,09002. Trouvé : 300.08941

Synthèse de la (RS_S)-N-benzyloxycarbonyl-S-oxo-L-méthionine (Voie numéro 2)



Une masse de 250 mg (1,51 mmol) de sulfoxyde de L-méthionine et 1,27 g de bicarbonate de sodium sont dissous dans 5 mL d'eau et amenés à 0°C. Un volume de 248 µL (1,1 équivalent) de chloroformate de *p*-nitrophényle est ajouté goutte à goutte et la solution est agitée pendant la nuit, à température ambiante. Le lendemain, on acidifie le mélange avec HCl 1M jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement gazeux. La phase aqueuse est alors extraite avec 3 x 20 mL d'acétate d'éthyle. Le solvant organique est évaporé *in vacuo* et dissout dans un minimum d'acétone. Cette solution est filtrée sur silice et les premières fractions du filtrat sont combinées et évaporées pour donner 319 mg (1,06 mmol) d'un solide blanc sont obtenus. Ce produit est très hygroscopique.

Rendement : 71%

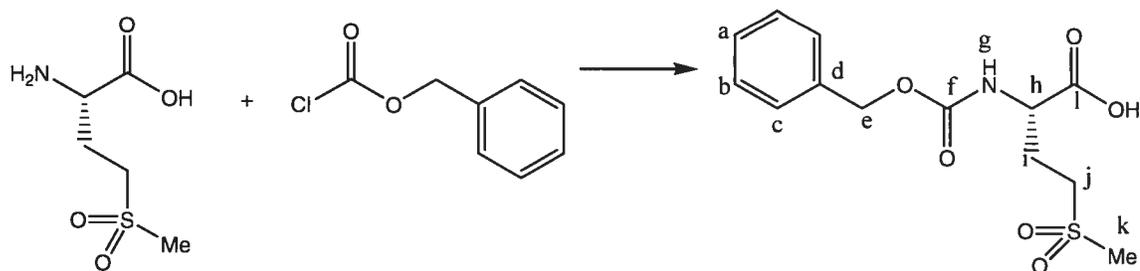
RF : 0,05 (50/50 AcOEt/Hexanes)

RMN ¹H : (CD₃OD) δ (ppm) J (Hz); 2,12 (1H(i), m); 2,39 (1H(i), m); 2,57 (3H(k), s); 2,8 (2H(j), m); 4,28 (1H(h), m); 5,12 (2H(e), s); 7,3 (5H(a,b,c), m).

RMN ¹³C : (CD₃OD, mélange de diastéréoisomères) δ (ppm) ((**26,2/25,9**)(b) ; (**38,3/38,2**)(d) ; (**51,2/51,0**)(c) ; (**54,6/54,3**)(a) ; 67,83(e); 128,23(c); 128,56(a); 129,02(b); 142,3(d); 158,34(f); 175,30(l). *Les valeurs en caractères gras sont celles de l'isomère S_CS_S.

Spectre de masse: Calc pour C₁₃H₁₇NO₅S+H : 300,09002. Trouvé : 300,08941

Synthèse du N-benzyloxycarbonyl-L-méthionine sulfone



Une masse de 250 mg (1,51 mmol) de sulfone de L-méthionine et 1,16 g de bicarbonate de sodium sont dissous dans 5 mL d'eau et amenés à 0°C. 226 μ L (1,1 équivalent) de chloroformate de *p*-nitrophényle sont ajoutés goutte à goutte et la solution est agitée pendant la nuit, à température ambiante. Le lendemain, on acidifie le mélange avec HCl 1M jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de dégagement gazeux. La phase aqueuse est alors extraite avec 3 x 20 mL d'acétate d'éthyle. Le solvant organique est évaporé *in vacuo* et 320 mg (1,01 mmol) d'un solide blanc sont obtenus.

Rendement : 67%

RF : 0,05 (50/50 AcOEt/Hexanes)

RMN ^1H : (CD₃OD) δ (ppm) J (Hz), 2,15 (1H(i), m); 2,4 (1H(i), m); 3,00 (3H(k), s); 3,20 (2H(j), q; J = 7,5); 4,3 (1H(h), m); 5,10 (2H(e), s); 7,30 (5H(a,b,c), m).

RMN ^{13}C : (CD₃OD) δ (ppm) 35,7(b) ; 39,2(d) ; 55,0(c) ; 56,3(a) ; 67,83(e); 128,3(c); 128,6(a); 129,0(b); 142,1(d); 158,4(f); 175,4(l).

Bibliographie

- ¹ Chang, S.K. et Chung, S.I., *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8112-8121
- ² Folk, J.E. et Chung, S.I., *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1973**, *38*, 109-191
- ³ Wong, W.S.D.; Batt, C. et Kinsella, J.E., *Int. J. Biochem.* **1990**, *22*, 53-59
- ⁴ Folk, J.E. et Cole, P.W., *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 5518-5525
- ⁵ Marrano, C.; de Macédo, P. et Keillor, J.W., *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 1923-1928,
- ⁶ Marrano, C.; de Macédo, P.; Gagnon, P.; Lapierre, D.; Gravel, C. et Keillor, J.W., *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 3231-3241.
- ⁷ Hausch, F.; Halttunen, T.; Maki, M. et Khosla, C., *Chem. Biol.*, **2003**, *10*, 225-231
- ⁸ Weissbach, H.; Resnick, L. et Brot, N., *Biochem. Biophys. Acta*, **2005**, *1703*, 203-212
- ⁹ Brot, N. et Weissbach, H., *Biopolymer*, **2000**, *55*, 288-296.
- ¹⁰ Lowther, W. T.; Brot, N.; Weissbach, H.; Honek, J.F. et Matthews, B.W., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2000**, *97*, 6463-6468.
- ¹¹ Shan, L.; Molberg, O.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G.M.; Sollid, L.M. et Khosla, C., *Science*, **2002**, *297*, 2275-2279.
- ¹² Greenstein, J.P. et Winitz, M., *Chemistry of the Amino Acids*; Wiley, New York, **1961**; Vol 3, p.2145.



Chapitre 5: Titration calorimétrique isotherme (ITC)

Introduction

La réaction de transamidation est une réaction particulièrement difficile à suivre cinétiquement. En effet, les méthodes spectroscopiques infra-rouge et UV permettent difficilement de distinguer le produit final du produit de départ et puisque le pH d'une solution ne varie pas au cours de ce type de réaction, un suivi par titration acido-basique est également impossible.

C'est pour ces raisons que diverses méthodes indirectes ont été développées^{1,2}. Le principal désavantage de ces méthodes est qu'elles nécessitent souvent des modifications structurales des substrats naturels de l'enzyme qui atténuent la pertinence des observations faites. En effet, le remplacement des groupes partants aminés des substrats classiques par des chromophores tels que le *p*-nitrophénol ou la *p*-nitroaniline implique un ajout considérable au niveau de la taille de ce groupe partant et au niveau de l'encombrement stérique engendré lors de la liaison des substrats au site actif de l'enzyme étudiée (voir figure 5.1).

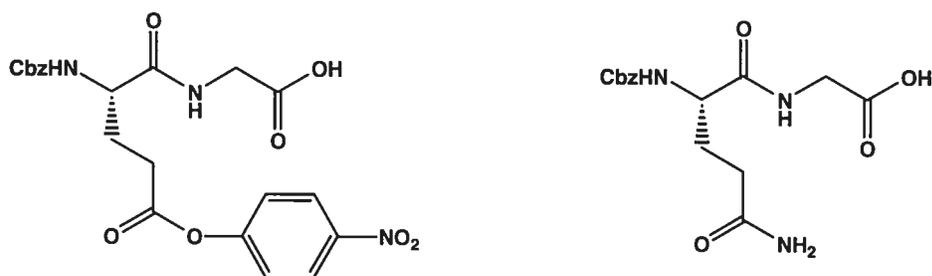


Figure 5.1: Structure de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(δ -*p*-nitrophenyl)glycine (gauche) et de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine (droite)

Pour un substrat ainsi modifié, la liaison, et donc le K_M mesuré, de même que la vitesse de la réaction de transamidation et d'hydrolyse (k_{cat}) sont donc systématiquement affectés, ce qui peut entraîner l'expérimentateur à tirer de fausses conclusions.

Par exemple, l'utilisation de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutamyl(δ -*p*-nitrophényl)glycine pour mimer la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminylglycine engendre une diminution substantielle du $K_{M(\text{hydrolyse})}$ observé, de 7 ± 1 mM pour l'amide³ à $0,020 \pm 0,005$ mM pour l'ester activé¹⁵. Un observateur inexpérimenté pourrait voir en cette variation d'un facteur d'environ 350 une amélioration de l'affinité de l'enzyme pour l'ester de *p*-nitrophényle. Ce n'est pas nécessairement le cas. Certes, on peut envisager que les interactions hydrophobes et la possibilité d'empilement π entre le noyau aromatique du *p*-nitrophényle et les tryptophanes situés à l'entrée du site actif puissent favoriser la liaison de ce substrat. On peut cependant envisager une seconde explication : l'effet de la vitesse d'acylation. Lorsqu'on active ainsi la fonction carbonyle subissant l'attaque par le nucléophile du site actif, c'est d'abord et avant tout la valeur de la constante de vitesse de l'acylation (k_2) qui s'en trouve augmentée (voir figure 2). Puisque cette constante est incluse (cachée) dans la valeur du K_M du substrat, cette dernière valeur semble augmenter pour un substrat hautement réactif, bien que la constante de dissociation réelle du complexe enzyme substrat (k_{-1}/k_1) n'aie pas été nécessairement modifiée (voir figure 5.2). De la même façon, un substrat très peu réactif aura un K_M ne dépendant pratiquement que de k_1 et k_{-1} et paraîtra plus petit que si le composé était très réactif.



Figure 5.2 : Constante de Michaelis-Menten

Il faut donc, pour bien distinguer la liaison du substrat de sa réactivité, déterminer la valeur de k_2 , ici équivalent à k_{acyl} , et la retirer du K_M observé.

La vitesse d'acylation (k_{acyl}) de l'ester *p*-nitrophénylique a été déterminée par Stopped-Flow et évaluée comme étant de $85,3 \text{ s}^{-1}$, ou 5100 min^{-1} (Voir chapitre 2 : Études d'acylation). Cette valeur est comparable à la vitesse d'acylation de l'amide (glutamine), puisqu'il est constaté que dans les cas où l'hydroxylamine est utilisée comme substrat accepteur, une constante de vitesse (k_{cat}) de l'ordre de 2600 min^{-1} est observée⁴. En fait, la vitesse d'acylation observée augmente avec la nucléophilie du substrat accepteur utilisé et même en utilisant un nucléophile puissant comme l'hydroxylamine, la vitesse d'acylation ne devient toujours pas limitante. Il semble donc que la vitesse d'acylation de l'amide puisse être égale ou même plus grande que celle de l'ester activé, l'enzyme étant spécifiquement construite pour optimiser cette réaction. Si tel est le cas, la variation de K_M observée entre l'ester activé et l'amide pourrait ne pas être totalement reliée à l'affinité de l'enzyme pour le substrat, mais plutôt reliée à une grande valeur de k_{acyl} (k_2 dans la figure 5.2). C'est parce qu'un tel doute existe toujours lors de l'utilisation d'un analogue du substrat naturel de l'enzyme qu'une méthode directe utilisant le substrat naturel plutôt qu'un analogue est souhaitable.

Une autre famille de méthodes de suivi cinétique parfois employée est constituée de systèmes d'enzymes couplées dans lequel le produit de l'enzyme d'intérêt est également substrat d'une deuxième enzyme dont la réaction est plus facilement observable.

Le défaut évident d'une telle méthode est la nécessité d'effectuer des contrôles systématiques de toutes interactions possibles entre les substrats testés et le bon fonctionnement de l'enzyme responsable du signal observé. L'utilisation de la glutamate déshydrogénase (GDH) dans une méthode de ce genre est décrite aux pages 18-19.

Devant les limitations de ces diverses méthodes de suivi cinétique, il devient apparent qu'une méthode universelle, qui ne dépendrait pas des modifications faites aux

substrats ou d'autres composantes ajoutées au milieu réactionnel serait souhaitable. La calorimétrie pourrait remplir ces conditions. Cette technique a en effet été utilisée pour suivre des réactions enzymatiques par le passé^{5,6,7,8,9}. La titration calorimétrique isotherme a même récemment servi à déterminer la constante de dissociation du complexe transglutaminase-GTP¹⁰.

Principes

Toute réaction ayant lieu implique une variation positive ou négative d'enthalpie. De même un cycle catalytique impliquant une série de réactions, solvations, désolvations, complexations des substrats et relâchements des produits implique une quantité fixe et constante de chaleur (q), correspondant à la somme de toutes les variations enthalpiques en jeu (ΔH_{cat})¹¹.

$$\Delta H_{\text{cat}} = \sum \Delta H_{\text{rx}} + \sum \Delta H_{\text{slv}} + \dots = q = n H_{\text{cat}}$$

Cette chaleur peut être mesurée par un appareil de titrage calorimétrique isotherme (ITC). Les fondements sur lesquels repose le fonctionnement de cet appareil peuvent être expliqués assez facilement. Tout d'abord, l'appareil contient deux cellules d'analyse, l'une pour l'échantillon et l'autre pour la solution de référence, en l'occurrence de l'eau désionisée. Les deux cellules sont maintenues à une température fixe, généralement supérieure à la température ambiante, déterminée par l'utilisateur. L'appareil est conçu pour pouvoir chauffer et/ou refroidir les deux solutions pour que leur température demeure constante. L'énergie nécessaire pour maintenir la température stable, ou puissance, est enregistrée par l'appareil en fonction du temps. Suite à l'injection du réactif dans la cellule échantillon, la variation enthalpique de la réaction s'y déroulant sera déduite de la puissance nécessaire pour maintenir la température constante de la cellule. En effet, une réaction exothermique contribuera à maintenir la température de la cellule à sa valeur désirée, nécessitant donc un moins grand travail de la part des éléments chauffants de l'appareil. À l'inverse, une cellule d'échantillon dans laquelle une réaction endothermique a lieu nécessitera un plus grand travail de la part des éléments chauffants de l'appareil. La puissance nécessaire pour maintenir stable la température de la cellule de référence, contenant de l'eau désionisée, sert à normaliser les valeurs de puissance nécessaire pour maintenir la cellule échantillon isotherme.

On peut définir un profil cinétique de la variation enthalpique comme étant une fonction du temps ($f(t)$) dans laquelle chaque intervalle de temps (dt) correspond à une quantité particulière de chaleur (dq).

$$dq/dt = f(t)$$

Si l'on s'assure que la réaction en question est suivie sur un intervalle de temps suffisant pour que la réaction soit complète, on obtient la forme intégrée suivante :

$$\int f(t) dt = q = n H_{\text{cat}}$$

On peut donc, en utilisant l'aire totale sous la courbe de la réaction complète, correspondant à q , et en connaissant la quantité de substrat ayant réagi (n), déterminer la valeur d'enthalpie molaire H_{cat} .

$$q = n H_{\text{cat}}$$

$$dq = dn H_{\text{cat}}$$

Il est donc possible, pour tous les points de données obtenus, de convertir la variation enthalpique observée en une vitesse de réaction à ce temps (V_t):

$$(dq/dt)_t / H_{\text{cat}} = dn/dt = V_t$$

De même, puisque l'aire sous la courbe est proportionnelle à la quantité de substrat ayant réagi, la quantité de substrat encore disponible à chaque temps (t) peut être déterminée par la différence entre la variation d'enthalpie totale de la réaction complète et la variation d'enthalpie jusqu'au temps t :

$$[S]_t = [S]_o \left(1 - \frac{\int_0^t f(t) dt}{\int_0^\infty f(t) dt} \right)$$

Il est donc théoriquement possible d'obtenir une vitesse et une concentration en substrat pour tous les points de données, à tous les temps de mesures et donc, de tracer une courbe de saturation (V_t vs $[S]_i$) permettant de déterminer les K_M et k_{cat} d'un substrat donné. La condition à ceci est évidemment qu'une quantité initiale de substrat supérieure au K_M soit utilisée. En effet, l'utilisation d'une quantité initiale en substrat trop faible ne permet pas d'atteindre la vitesse maximale nécessaire à la détermination précise du k_{cat} et de K_M , que l'on utilise l'ITC ou une autre méthode.

Bien sûr, ce traitement des données est limité aux cas où la concentration croissante du produit de la réaction ne nuit pas au bon fonctionnement de l'enzyme. En effet, une inhibition compétitive par le produit aurait pour effet de diminuer l'efficacité catalytique de l'enzyme. Cet effet serait d'ailleurs plus marqué vers la fin de l'analyse qu'en son début.

Limitations

L'appareil d'ITC possède certaines caractéristiques physiques limitant les diverses analyses pouvant y être effectuées. En effet, les dimensions des cellules et de la seringue d'injection limitent les quantités de réactifs et/ou d'enzyme pouvant être utilisées.

Premièrement, que la solution contenant du substrat soit injectée sur une solution d'enzyme ou l'inverse, le volume limitant est celui de la solution d'injection, la seringue ne pouvant être remplie qu'avec un maximum de $293,3 \pm 0,1$ μL de solution. La cellule échantillon, elle, a un volume initial fixe de $1,4527 \pm 0,0001$ mL.

Il est souvent plus pratique et intéressant d'injecter plusieurs volumes consécutifs d'une solution contenant du substrat sur une solution d'enzyme. Ainsi, une fois la réaction d'une première quantité de substrat complétée, une deuxième quantité peut être injectée, produisant un duplicata et/ou confirmant un effet d'inhibition compétitive par le produit de la réaction enzymatique, phénomène ayant pour effet de ralentir la vitesse de la réaction étudiée, d'une injection à l'autre. À cause de cet avantage stratégique, la solution d'injection est typiquement une solution concentrée de substrat, et la limite pratique de concentration initiale en substrat est celle de la solubilité du substrat dans 293 μL de tampon.

L'autre option, ne permettant pas d'injections multiples, est d'injecter la solution d'enzyme à une solution de substrat. Le volume de la cellule étant 6 fois plus grand que celui de la seringue, il est alors possible d'atteindre une concentration initiale en substrat légèrement supérieure à celle obtenue dans le système décrit au paragraphe précédent. Cette approche nécessite cependant l'utilisation d'une solution assez concentrée en enzyme, ce qui n'est pas toujours souhaitable si l'enzyme en question présente des problèmes de solubilité aux hautes concentrations.

Il est aussi essentiel de ne pas utiliser une quantité d'enzyme résultant en une variation enthalpique trop grande, le signal détecté par l'appareil plafonnant alors.

Finalement un dernier problème envisageable qui limiterait l'utilité de cette technique est celui du temps d'analyse. En effet, même avec une concentration élevée d'enzyme, la consommation de la totalité du substrat peut prendre un certain temps, voir même quelques heures. Il est alors nécessaire de travailler avec une enzyme stable dans les conditions expérimentales. En effet, si l'enzyme perd de son activité entre le début et

la fin de l'expérimentation, les données se trouvent faussées, principalement pour les données de la fin de l'analyse, c'est-à-dire les données à faible concentration de substrat. Celles-ci servent principalement à la détermination précise du K_M du substrat étudié et c'est donc cette valeur qui se trouverait affectée.

Il y a donc une situation dans laquelle une trop grande quantité d'enzyme peut résulter en un signal trop grand et une trop faible quantité d'enzyme peut résulter en une réaction nécessitant un temps d'analyse trop long et une perte d'activité de l'enzyme.

Allure attendue de la courbe

Lors de l'utilisation d'une quantité saturante de substrat et d'une quantité appropriée d'enzyme, une vitesse constante devrait être observée, à l'équilibre, ce qui correspond à une variation enthalpique constante. Puis, lorsque le substrat s'épuise, la différence de puissance requise pour maintenir l'échantillon à la température choisie devrait diminuer jusqu'à ce que le signal regagne la ligne de base, définie par la puissance requise pour maintenir la cellule de référence à cette même température.

En plus de cette allure générale, l'inévitable signal d'injection devrait être observé. Celui-ci est dû aux enthalpies de solvation/dissolution de l'enzyme par le volume de solution d'injection et du substrat dans le volume de la solution contenue dans la cellule échantillon. En effet, ces enthalpies de solvation ne font pas partie des divers termes constituant l'enthalpie globale du cycle catalytique, ne se manifestant que lors de l'injection initiale. Il est donc primordial, pour obtenir une valeur d'enthalpie molaire de catalyse réelle et bien quantifiée, d'effectuer tous les blancs possibles pour déterminer la valeur de toutes ces enthalpies d'injection. De plus, les valeurs de différence de puissance mesurées pour les quelques premières minutes suivant l'injection ne peuvent être utilisées comme mesure de la vitesse du cycle catalytique, étant faussées par l'enthalpie d'injection. Ces points de données ont donc été systématiquement retirés des profils cinétiques obtenus et rapportés dans cet ouvrage.

Réaction contrôle

Afin de déterminer la faisabilité du suivi cinétique d'une réaction enzymatique, l'hydrolyse de l'ester éthylique de benzoyl-arginine (BAEE) par la papaïne, une protéase à cystéine bien connue a été étudiée.

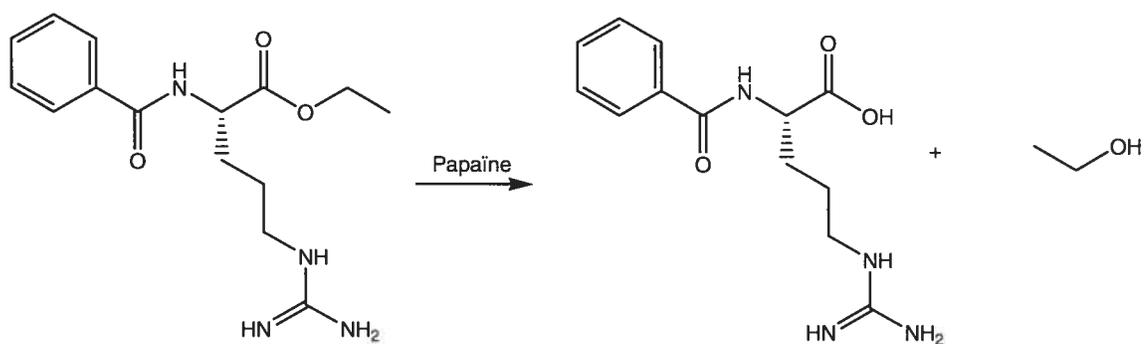


Figure 5.4: Réaction d'hydrolyse du BAEE par la papaïne

Un concentration de 87,75 mM de BAEE a été placée dans la cellule échantillon de l'appareil, d'un volume total initial de 1,4527 mL. À cette solution, 100 μ L d'une solution de papaïne 10 U/mL sont ajoutés et la variation enthalpique est titrée sur 4 heures. La vitesse d'agitation était de 300 rpm. La température du système était de 30°C. Le profil obtenu est présenté à la figure 5.5.

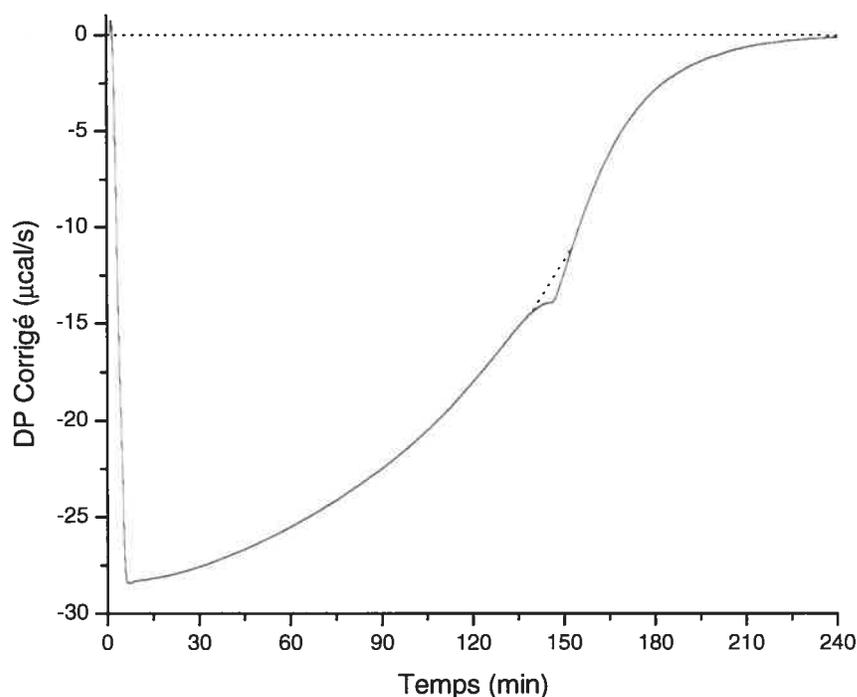


Figure 5.5: Titration calorimétrique isotherme de catalyse de l'hydrolyse du benzoylarginate d'éthyle (BAEE, 87,7 mM) par la papaïne (1,0 U). $T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$. 100 mM MOPS pH=6,2, 20 mM β -mercaptoéthanol, 100 mM EDTA. Les données ont été corrigées pour ramener DP initial à 0.

Le profil obtenu débute par un petit signal vers le haut, correspondant à un phénomène endothermique de dilution de l'enzyme dans la cellule. Rapidement, un fort signal exothermique prend le dessus et la réaction enzymatique se déroule alors avec une vitesse quasi stationnaire, visible par la valeur de DP (variation d'énergie potentielle) demeurant stable à environ $-27 \mu\text{cal/s}$. La vitesse de réaction décroît par la suite car la concentration en substrat diminue alors que celui-ci est épuisé, jusqu'à devenir nulle lorsque toute la quantité initiale en substrat a été consommée. La légère déviation à 150 minutes n'est pas facilement explicable. Il peut s'agir d'une bulle se déplaçant dans la cuvette ou d'une légère impureté s'y déposant. Globalement, la courbe obtenue a exactement la forme attendue et la première étape de traitement de données requise est l'intégration sur toute la durée de l'expérience du signal exothermique enregistré. La forme intégrée ainsi obtenue est présentée à la figure 5.6.

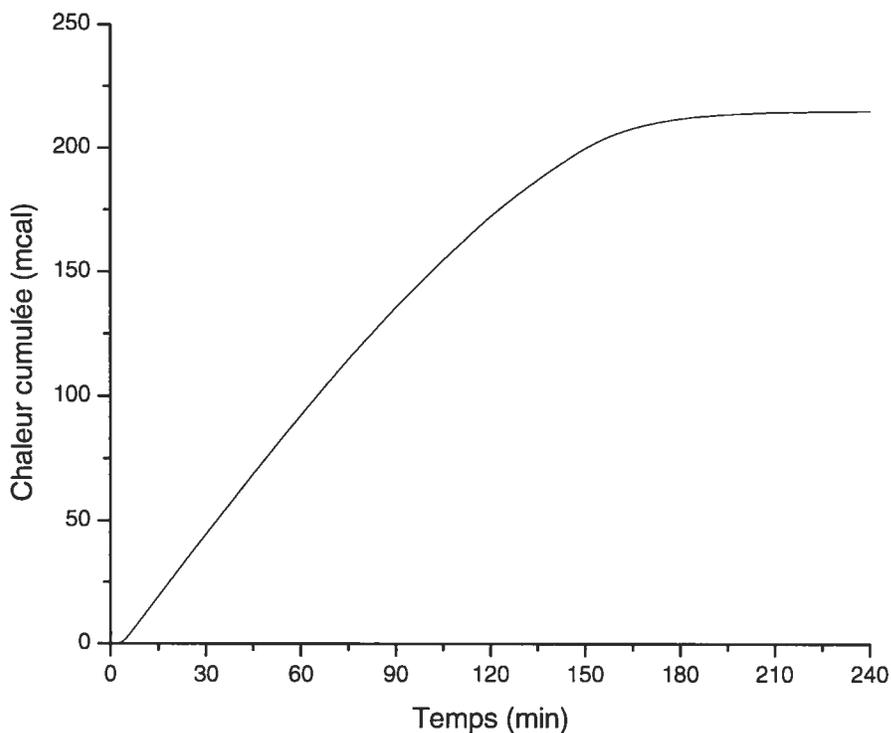


Figure 5.6: Forme intégrée de la variation calorimétrique de catalyse de l'hydrolyse du benzoylargininate d'éthyle (BAEE, 87,75 mM) par la papaïne (1,0 U). $T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$. 100 mM MOPS pH=6,2 , 20 mM β -mercaptoéthanol, 100 mM EDTA.

L'intégration sur la totalité de réaction donne une valeur finale de 215,2 mcal. Puisque cette chaleur totale correspond à la consommation de 127,5 μmol de substrat (BAEE), on obtient une enthalpie molaire de catalyse de 1,7 kcal/mol. De plus, le rapport de l'intégration du signal jusqu'au temps t sur l'intégration totale du signal étant proportionnel à la quantité de substrat ayant réagi jusque là, on peut en déduire la concentration de substrat restant au temps t grâce au traitement mathématique décrit précédemment. Les données brutes peuvent donc être représentées sous une forme correspondant à une cinétique de saturation. Celle-ci est représentée à la figure 5.7.

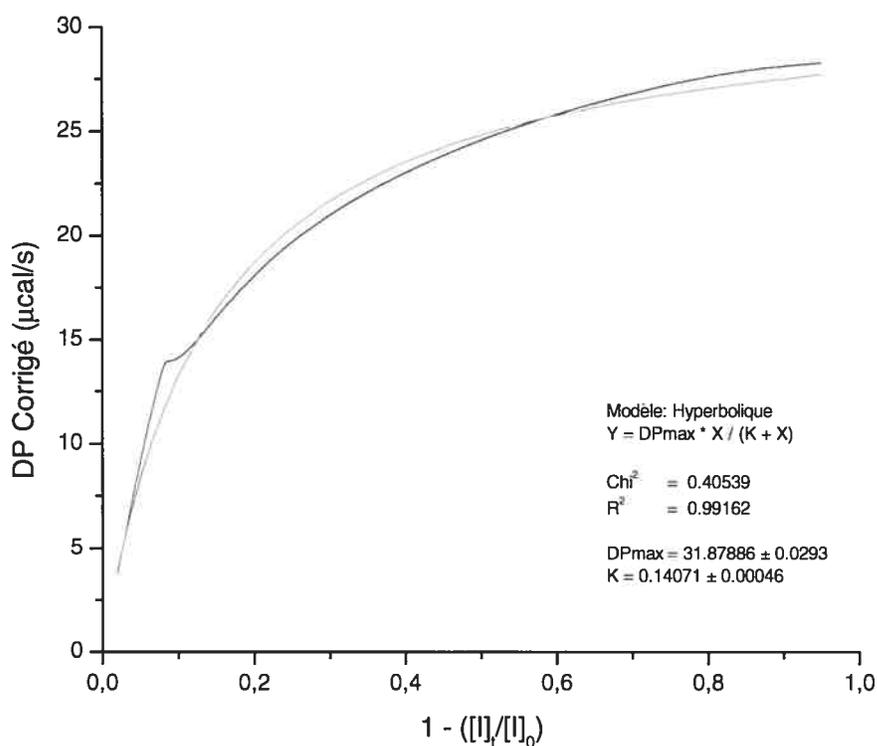


Figure 5.7: Courbe de saturation de l'hydrolyse de l'ester éthylique du benzoylargininate d'éthyle (BAEE, 87,75 mM) par la papaïne (1,0 U). $T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$. 100 mM MOPS pH=6.2, 20 mM β -mercaptoéthanol, 100 mM EDTA.

Une régression non linéaire avec un modèle hyperbolique permet de trouver 32 $\mu\text{cal/s}$ comme valeur de DP maximal (une forme de V_{max}) et 0,141 comme portion de la concentration initiale en substrat correspondant à la moitié du signal maximal (une forme de K_M).

Connaissant la variation d'enthalpie molaire de catalyse ($H_{\text{cat}} = 1688 \text{ cal/mol}$), on peut convertir la valeur de DP maximale de 31,88 $\mu\text{cal/s}$ en vitesse maximale, obtenant ainsi un V_{max} de 1,133 $\mu\text{mol/min}$. De cette valeur est obtenue une valeur de k_{cat} en la divisant par la quantité d'enzyme utilisée (1,6 nmol). On trouve finalement un k_{cat} de 725 min^{-1} .

En utilisant la valeur de K déterminée par la régression non linéaire avec un modèle hyperbolique et la concentration initiale en substrat, 87,75 mM, un K_M de 12,34 mM est calculé. Ces données sont rapportées dans le tableau 5.1.

	Mesuré	Littérature ^{12,13,14}
H_{cat}	1,7 kcal/mol	-
K_M (mM)	$12,3 \pm 0,04$ mM	18 - 18,2 mM
k_{cat} (min^{-1})	$725 \pm 0,7$ min^{-1}	16,4 - 28,5 min^{-1}

Tableau 5.1: Données cinétiques de la réaction d'hydrolyse du benzoylargininate d'éthyle catalysée par la Papaïne

On voit rapidement une certaine différence des valeurs de K_M et k_{cat} mesurées et rapportées dans la littérature. D'abord, la valeur de k_{cat} semble démesurément grande, dépassant la valeur acceptée par un facteur de 30. De plus, la valeur de H_{cat} mesurée peut sembler plutôt faible. En effet, les variations d'enthalpie molaire des réactions de ce type sont généralement de l'ordre de quelques dizaines de kcal/mol. Bien sûr, ici, les valeurs énergétiques de solvatation et de désolvatation des produits et réactifs ne sont pas facilement prévisibles et peuvent donc affecter grandement la valeur de H_{cat} observée. La titration calorimétrique isotherme a pour principal inconvénient le fait qu'elle est aveugle, mesurant un paramètre aux multiples contributions.

Une explication possible pour corriger la valeur de H_{cat} et donc de k_{cat} mesurée est de s'attarder à ce qui peut se produire lors de la fin d'une réaction enzymatique. En effet, l'enzyme n'étant qu'un catalyseur, elle n'influence pas la différence d'énergie libre entre les réactifs et les produits, mais abaisse plutôt la barrière énergétique à franchir pour passer des réactifs aux produits ET des produits aux réactifs. La papaïne, qui est connue pour son activité hydrolase peut, en théorie et selon le principe de réversibilité microscopique, catalyser la formation de liens amides et esters, si les concentrations en acide et amine (ou alcool) favorisent cette réaction. La fin de la réaction enzymatique observée dans toute expérience de cinétique enzymatique n'est donc en fait que l'établissement de l'équilibre entre la vitesse de formation des produits

dans un sens, et la formation des réactifs lors de la réaction en sens inverse. Si un tel équilibre n'était pas suffisamment poussé vers la formation complète des produits, cela aurait pour effet de diminuer la valeur de H_{cat} calculée en causant une surestimation de la concentration de substrat consommé pour atteindre la « fin » de la réaction. De plus, s'il y a toujours une certaine quantité de produit de départ présente lorsque l'équilibre est atteint, la valeur de K_M déterminée s'en trouvera sous estimée. Puisqu'il est impossible, par ITC, de dissocier la vitesse de la réaction dans un sens de la vitesse de la réaction en sens inverse, il devient évident qu'une telle technique ne peut être efficacement utilisée que pour des systèmes enzymatiques où l'équilibre est pratiquement totalement poussé vers les produits finaux.

Essais avec la transglutaminase

Après avoir constaté la possibilité d'observer le signal de la réaction enzymatique de la papaïne, un essai avec la transglutaminase semblait approprié. La réaction d'hydrolyse du substrat typique, la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine fut donc suivie. Une portion de 100 μ L d'une solution de transglutaminase 0,5 mg/mL fut donc injectée dans une solution de 33 mM de N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine, à 30°C. Les conditions initiales suite à l'injection étaient donc de 31 mM en substrat donneur, 50 mM $CaCl_2$, 100 μ M EDTA et 100 mM MOPS pH 7,0. Ces derniers trois constituants sont présents dans les solutions de la cellule et de la seringue d'injection dans les mêmes concentrations, pour minimiser toute enthalpie de dissolution lors de l'injection. La courbe obtenue est présentée à la figure 5.8.

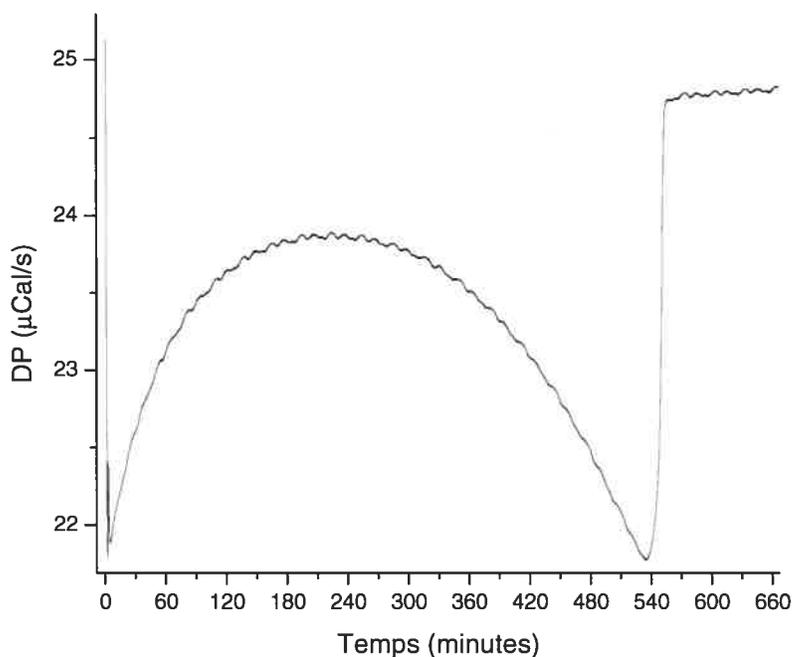


Figure 5.8: Titration calorimétrique isotherme de catalyse de l'hydrolyse du N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine (33 mM) par la transglutaminase.

$T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$. 100 mM MOPS pH=7,0 , 50 mM CaCl_2 , 100 μM EDTA.

L'allure initiale de la courbe semble bonne, avec un signal exothermique diminuant graduellement alors que la concentration en substrat diminue. Cependant, plutôt que de regagner la ligne de base, la courbe présente un deuxième signal fortement exothermique, après cinq ou six heures de mesure. Encore plus étrange, ce signal prend fin brusquement, après neuf ou dix heures, et ce phénomène est reproductible, à plus ou moins une heure de délai lors de duplicata.

Parmi les phénomènes pouvant engendrer un signal exothermique après plusieurs heures d'analyse, il peut être envisagé que la dénaturation de l'enzyme par le temps soit en cause. En effet, la réactivité de la transglutaminase suite à une incubation dans les mêmes conditions, telle que mesurée par le test d'activité standard à l'hydroxamate, montre une perte d'environ 50% de l'activité initiale après quatre heures. Cela concorde assez bien avec le phénomène observé mais une interprétation

plus détaillée du phénomène à partir des données obtenue par ITC semble impossible et ne fut pas poursuivie.

Avant de poser d'avantage d'hypothèses sur la cause de ce deuxième signal, quelques conclusions immédiates peuvent être tirées. D'abord, l'hydrolyse de 31 mM de substrat par 0,050 mg de transglutaminase est trop lente pour être suivie adéquatement par ITC. Il faudrait donc diminuer la quantité de substrat à hydrolyser, augmenter la concentration en protéine ou ajouter un substrat accepteur pour effectuer la transamidation plutôt que l'hydrolyse de la glutamine, la transamidation étant beaucoup plus rapide que l'hydrolyse.

Une série d'expériences dans lesquelles la concentration en substrat fut diminuée et celle en enzyme augmentée a donc été effectuée en présence de 73 mM de N-acétyl-L-lysinate de méthyle comme substrat accepteur ($K_M = 2,8$ mM) pour la réaction de transamidation. Sans montrer le détail de chaque essais, disons simplement que la protéine semble mal tolérer d'être trop concentrée, ce qui limite la concentration pouvant être introduite dans le système. Pour cette raison et pour avoir une analyse demeurant courte dans le temps (moins de deux ou trois heures), la quantité de substrat maximale pouvant être utilisée fut évaluée à environ 17 mM. Pour cette concentration, on obtient la courbe de titration calorimétrique isotherme présentée à la figure 5.9.

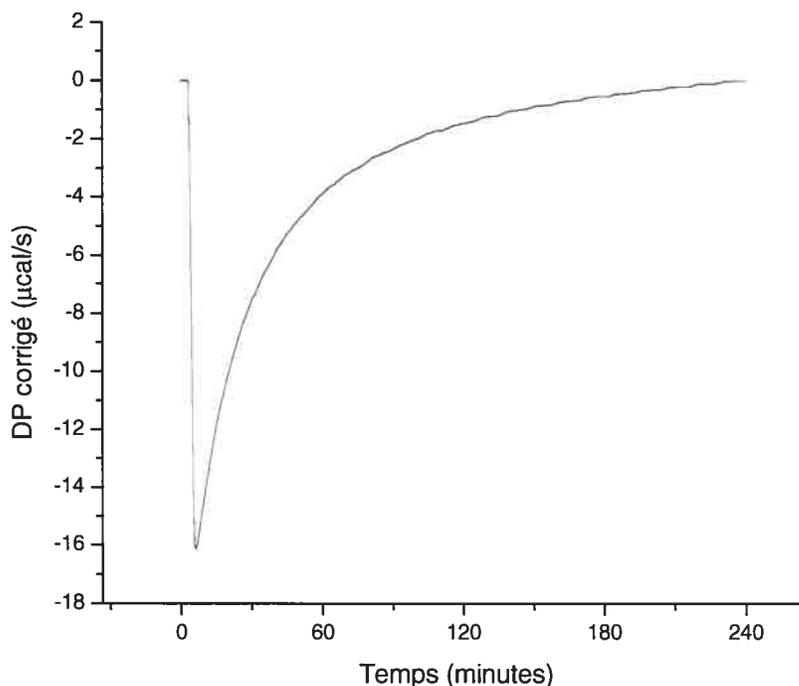


Figure 5.9: Titration calorimétrique isotherme de catalyse de la transamidation de la N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine (16,9 mM) par la transglutaminase (0,125 mg). $T^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$. 73 mM N-acétyl-L-lysinate de méthyle, 50 mM CaCl_2 , 100 μM EDTA et 100 mM MOPS pH 7,0. Les données ont été corrigées pour ramener la DP initiale à 0.

Cette fois, l'allure de la courbe est légèrement différente, c'est-à-dire que cette fois-ci, la vitesse initiale n'est pas constante et décroît déjà très rapidement. La réaction semble complète après environ 3 heures, ce qui est près de la limite de temps au-delà de laquelle on risque d'avoir une forte perte d'activité par vieillissement (dénaturation, oxydation, etc.) de l'enzyme. Cette différence peut être expliquée par le fait que la concentration en substrat donneur, N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine, n'est que de 17 mM, ce qui n'est pas une quantité bien supérieure au K_M de ce produit, dont la valeur se situe autour de 3 à 7 mM^{3.15}. La conséquence de cela est que la portion de concentrations de substrat étudiée est contenue dans la partie linéaire de la courbe de Michaelis-Menten et la courbe de saturation obtenue n'atteint pas le plateau de vitesse maximale. La courbe de saturation obtenue est présentée à la figure 5.10.

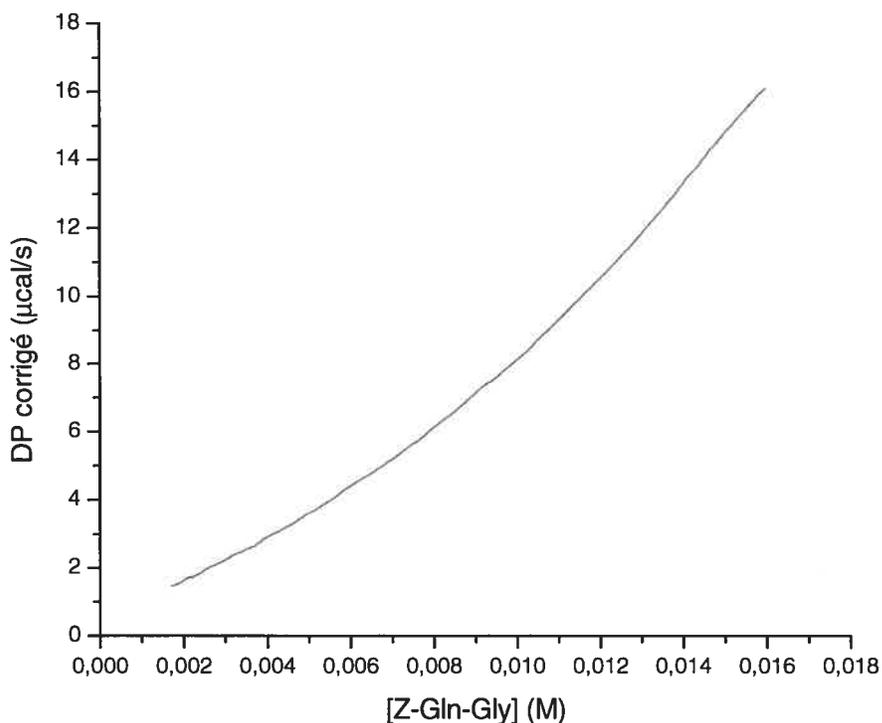


Figure 5.10: Courbe de saturation de la transamidation du N-benzyloxycarbonyl-L-glutaminyglycine (16,9 mM) par la transglutaminase (0,125 mg). $T^{\circ} = 37^{\circ}\text{C}$. 73 mM N-acétyl-L-lysinate de méthyle, 50 mM CaCl_2 , 100 μM EDTA et 100 mM MOPS pH 7,0.

La déviation étrange des données, donnant à la courbe obtenue une courbure concave, peut s'expliquer en posant quelques hypothèses. D'abord, il se peut que le produit de la réaction de transamidation inhibe la réaction de façon compétitive. Deuxièmement, il se peut que l'enzyme ait perdu une partie de son activité en fin d'expérience, les valeurs de vitesse observées s'en trouveraient sous-estimées par rapport à ce qu'elles devraient être.

Pour bien visualiser les effets respectifs de l'inhibition par le produit de l'inactivation (vieillessement) de l'enzyme, quelques simulations ont été faites. À l'aide du chiffrier électronique Excel™ de la compagnie Microsoft, l'évolution cinétique

d'une réaction fictive à été calculée en utilisant l'équation de vitesse d'une réaction enzymatique selon le modèle hyperbolique de Michaelis-Menten. Les paramètres fixés dans la simulation étaient les suivants : $V_{\max} = 1$, $K_M = 10$, $[S]_0 = 100$. Pour l'hypothèse de l'inhibition par le produit, différentes valeurs de K_i (5,10 et 20) ont été utilisées pour calculer l'évolution théorique des concentrations du substrat et du produit. Pour l'hypothèse du vieillissement de l'enzyme, une décroissance exponentielle a été appliquée sur la valeur de V_{\max} , avec des temps de demi-vie de 1333 et 133, pour simuler la perte d'activité selon une cinétique de premier ordre. Les courbes simulées ainsi obtenues sont représentées à la figure 5.11.

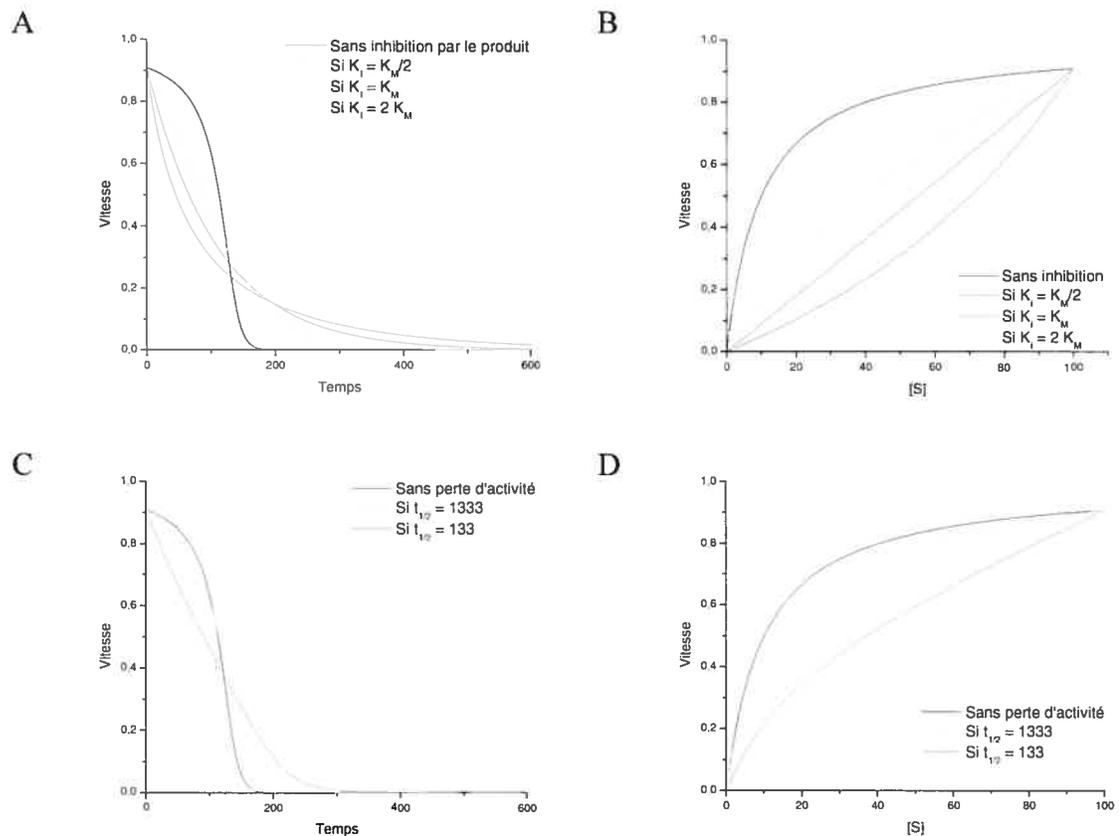


Figure 5.11: Simulations des effets de l'inhibition par le produit (A et B) et du vieillissement de l'enzyme (C et D). Dans tous les cas, $V_{\max} = 1$, $K_M = 10$ et $[S]_0 = 100$

Un coup d'œil rapide aux courbes simulées permet de voir que l'inhibition par le produit, lorsque celui-ci a une constante d'affinité (K_i) inférieure à la constante d'affinité du substrat, permet d'expliquer une courbure concave (figure 5.11 B, courbe bleue). Malheureusement, il est impossible de calculer les valeurs de K_i du produit sans connaître la valeur de K_M du substrat et vice-versa. Les données expérimentales obtenues sont donc d'une faible utilité, bien que pouvant être expliquées par un phénomène d'inhibition par le produit. Ce phénomène n'avait pas été observé auparavant parce que les expériences cinétiques normales ne se font pas au-delà de la consommation de plus de 10% du substrat, pour assurer des conditions initiales dans lesquelles la concentration en substrat demeure à peu près constante.

Conclusion et applications futures

La limite principale de la titration calorimétrique isotherme semble être son incapacité à distinguer entre les divers processus se déroulant dans la cellule d'analyse mais la raison principale pour laquelle cette méthode n'est pas appropriée à l'étude de la transglutaminase demeure dans les contraintes physiques de l'appareil et dans la faible spécificité de l'enzyme pour ses substrats. L'appareil ne permettant pas de mettre à la fois une grande quantité d'enzyme et une grande concentration du substrat, des concentrations supérieures au K_M et des temps d'analyse suffisamment courts ne peuvent être atteints. Maintenant que ces faiblesses sont connues, une alternative peut être envisagée : l'étude de la γ -glutamyltranspeptidase (voir figure 5.12).

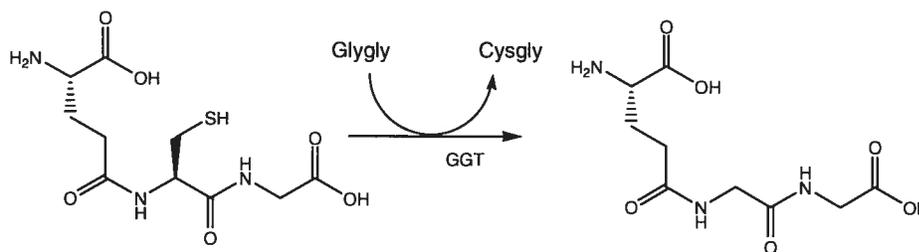


Figure 5.12: Réaction de transpeptidation de glutathion avec GlyGly catalysée par la GGT.

La γ -glutamyltranspeptidase (GGT), est une enzyme de la famille des glutamyltransférases, tout comme la TGase et est également étudiée dans le groupe de recherche du professeur Keillor. Il serait donc naturel de tester sur cette enzyme toute nouvelle technique développée pour la TGase, et vice-versa. Ici, notons d'abord quelques avantages présentés par la GGT en comparaison à la TGase.

Tout d'abord, la GGT est particulièrement stable sur de longues périodes de temps, ne perdant pratiquement pas d'activité au cours d'une expérience cinétique de plusieurs heures, contrairement à la TGase. De plus, des expériences préliminaires ont montré que la réaction catalytique de la GGT avec le glutathion et la glycyglycine (GlyGly) a une enthalpie catalytique suffisamment grande pour avoir un bon signal mais suffisamment faible pour qu'une grande quantité d'enzyme soit utilisée sans que le signal ne sature (voir figure 5.13). Il est donc possible d'effectuer une mesure dans laquelle la totalité du substrat est consommée en peu de temps, et ce avec une quantité de substrat supérieure au K_M .

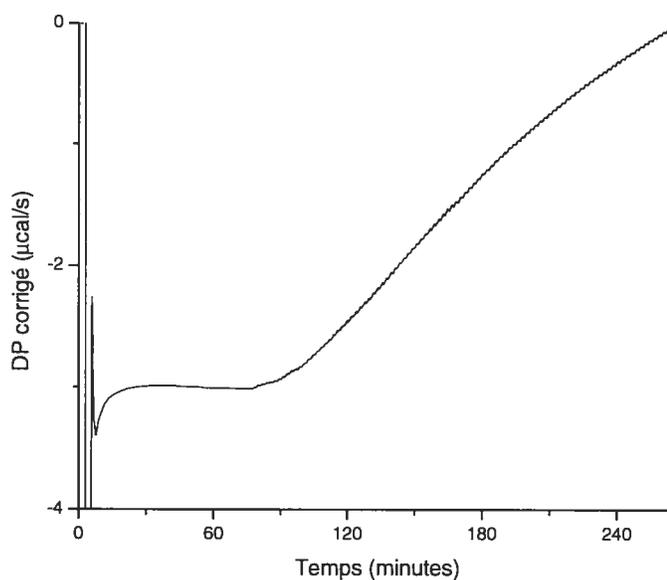


Figure 5.13: Courbe de titration calorimétrique isotherme de la réaction de transamidation du glutathion (2 mM) par la γ -glutamyltranspeptidase (0,12 μ g). $T^\circ = 37^\circ\text{C}$. 20 mM Glycyglycine, 100 mM Tris-HCl pH 8,0. Les données ont été corrigées pour ramener DP initial à 0.

Des essais préliminaires semblent encourageants mais plus de travail devra être fait pour minimiser les pics d'injection observés, ceux-ci faussant légèrement les résultats obtenus jusqu'à présent. Malgré cela, le traitement mathématique décrit au début du chapitre a permis d'obtenir la courbe de saturation présentée à la figure 5.14.

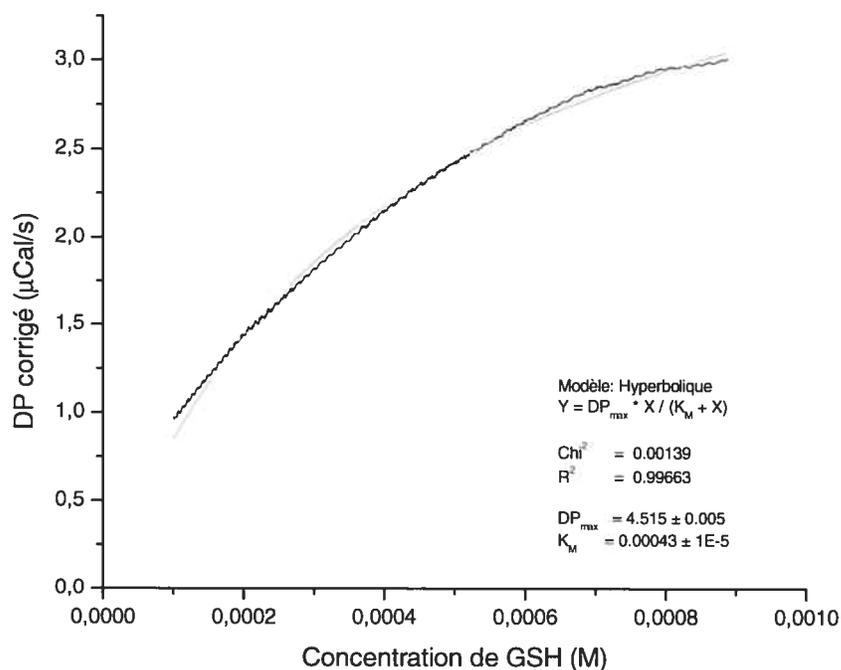


Figure 5.14: Courbe de saturation de la réaction de transamidation du glutathion (2 mM) par la γ -glutamyltranspeptidase (0,12 μ g). $T^\circ = 37^\circ\text{C}$. 20 mM glycylglycine, 100 mM Tris-HCl pH 8,0. Les données ont été corrigées pour ramener DP initial à 0.

Il est intéressant de noter que le K_M observé, $0,430 \pm 0,001$ mM est comparable au K_M rapporté dans la littérature¹⁶ de 0,113 mM et au K_M de 0,67 mM déterminé dans notre groupe par une méthode par chromatographie liquide¹⁷.

L'utilisation de l'ITC pourrait donc s'avérer utile pour l'étude d'autres réactions. Si elle est raffinée d'avantage, cette technique pourrait même peut-être servir à mesurer l'effet inhibiteur de divers produits des réactions enzymatiques, pourvu que le K_M des substrats utilisés soit connu.

Bibliographie

- ¹ Parameswaran, K.N. et Lorand, L., *Biochemistry*, **1981**, *20*, 3703-3711.
- ² Leblanc, A.; Gravel, C.; Labelle, J. et Keillor, J.W. *Biochemistry*, **2001**, *40*, 8335-8342
- ³ Folk, J.E. et Chung, S.I., *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.*, **1973**, *38*, 109-191
- ⁴ Gross, M. et Folk, J.E., *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 6534-6540
- ⁵ Spink, C. et Wadso, I., *Methods Biochem. Anal.*, **1976**, *23*, 1-159
- ⁶ Watt, G.D., *Anal. Biochem.*, **1990**, *187*, 141-146
- ⁷ Morin, P.E. et Friere, E., *Biochemistry*, **1991**, *30*, 8494-8500
- ⁸ Williams, B.A. et Toone, E.J., *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 3507-3510
- ⁹ Wiseman, T.; Willison, S.; Brandts, J.F. et Lin, L.-N., *Anal. Biochem.*, **1989**, *179*, 131.
- ¹⁰ Ahvazi, B.; Boeshans, K.M. et Steinert, P.M. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(25), 26716-26725
- ¹¹ Todd, M.J. et Gomez, J., *Anal. Biochem.*, **2001**, *296*, 179-187
- ¹² Blumberg, S.; Schechter, I.; Berger, A., *Eur. J. Biochem.*, **1970**, *15*, 97-102.
- ¹³ Brocklehurst, K.; Carlsson, J.; Kierstan, M.P.J. et Crrok, E.M., *Biochem. J.*, **1973**, *133*, 573-584.
- ¹⁴ Glazer, A.N. et Smith, E.L., *The Enzymes*, 3rd ed, Ed, Boyer, P.D., **1971**, *3*, 501-546.
- ¹⁵ Folk, J.E. et Cole, P.W., *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 5518-5525.
- ¹⁶ Meredith, M.J., *Biochem. Int.*, **1991**, *25*, 321-330
- ¹⁷ Morin, M., *Mémoire de maîtrise, Université de Montréal*, **2005**



Chapitre 6 : Cristallisation de la TGase

Introduction

Dans l'étude d'une enzyme, la quantité d'information pouvant être obtenue à l'aide des constantes d'affinité de petites molécules est limitée. Il est en effet aussi utile d'avoir une représentation véritable de la structure tridimensionnelle de l'enzyme. Malheureusement, aucune structure cristalline de la transglutaminase tissulaire n'est à ce jour disponible. Devant ce besoin et grâce à un accès facile à de grandes quantités de la protéine, un projet de cristallographie de la transglutaminase a été initié en collaboration avec le laboratoire de recherche du professeur et cristallographe Albert Berghuis, de l'Université McGill, à Montréal. Il est espéré que les structures de l'enzyme libre et liée au calcium pourront être obtenues de cette collaboration. De plus, puisque aucune transglutaminase n'a encore été co-cristallisée en présence d'un inhibiteur, les modèles de liaison proposés n'ont toujours pas été validés. Une co-cristallisation en présence d'inhibiteur réversible donnerait en effet plus d'informations sur la liaison du substrat au site actif de l'enzyme, mimant le complexe de Michaelis (complexe entre l'enzyme et le substrat). Similairement, une cristallisation de l'enzyme inhibée par un inhibiteur irréversible donnerait peut-être de l'information sur les changements de conformation induits par la formation de l'intermédiaire acyl-enzyme.

Historique

La première enzyme de la famille des transglutaminases à avoir été cristallisée est le Facteur de coagulation XIIIa humain. Les travaux principaux publiés pour cette enzyme sont ceux de P.D.Bishop, D.C.Teller *et al.* Ces chercheurs ont mis au point, en 1990, une méthode efficace d'expression¹ et de purification dans les levures *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine a été par la suite obtenue sous la forme de cristaux orthorhombiques² d'un groupe espace P2₁2₁2. L'enzyme est alors cristallisée

sous forme de dimère. Les cristaux ont été obtenus par la méthode de diffusion de vapeur sur goutte suspendue, avec de sulfate d'ammonium comme précipitant, dans du tampon MES à un pH de 5,8 et avec 10 mM de 2-mercaptoéthanol comme agent réducteur visant à maintenir l'état réduit de la cystéine du site actif. Les informations structurales obtenues³ grâce à ces cristaux sont encore aujourd'hui celles utilisées pour extrapoler les propriétés structurales des autres enzymes appartenant à la famille des transglutaminases. Ces informations se résument à la présence de quatre domaines (un sandwich- β , un cœur- α/β et deux barils- β), de même qu'en l'identification des acides aminés potentiellement impliqués dans l'activité enzymatique. Chez le facteur XIIIa, ce sont les acides aminés Cys-314, His-373 et Asp-396 qui sont reconnus comme nucléophile, base générale et activateur de la triade catalytique. Il est intéressant de noter que cette triade et les quelques acides aminés les entourant sont positionnés de façon très similaire à ceux retrouvés dans le site actif de la papaïne, une protéase à cystéine.

D'autres groupes de recherche ont également obtenus des cristaux du Facteur XIIIa dans des conditions différentes. Notons ici les travaux⁴ de R. Holgenfeld *et al.*, qui ont utilisé la technique de diffusion de vapeur sur goutte suspendue, avec du tampon MES à un pH de 6,2 et 1-2% de PEG (Polyéthylène glycol) 6000 comme précipitant, et ceci de façon automatisée. Ces chercheurs ont obtenu des cristaux de qualité comparable à ceux obtenus antérieurement.

Plus récemment, en 1999, des expériences⁵ de co-cristallisation du facteur XIIIa en présence de calcium et d'autres métaux ont permis aux chercheurs d'identifier un site potentiel de liaison du calcium. Les cristaux d'enzyme libre (sans calcium, obtenus par diffusion de vapeur sur goutte suspendue en présence de 24% v/v de propane diol et de tampon phosphate à un pH de 6,2) ont été trempés dans une solution contenant 90 mM de chlorure de calcium (CaCl_2). Suite à la diffusion du calcium dans les cristaux et à sa complexation à certains sites potentiels, la diffraction par rayons X a permis d'observer un site de liaison du métal constitué des acides aminés Glu-485, Ala-457, Asn-436, Asp-438 et Glu-490.

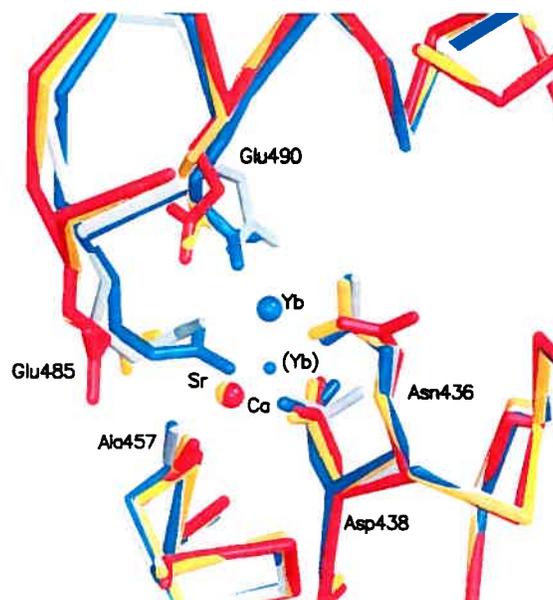


Figure 6.1 : Image du site de liaison de divers cations⁵ : calcium (rouge), strontium (jaune), ytterbium (Bleu) et libre (gris).

Il est généralement accepté que la liaison du calcium engendre un changement de conformation permettant la liaison éventuelle du substrat donneur de groupement glutamyle. Étrangement, la liaison du calcium n'a pas semblé provoquer un changement de conformation majeur de l'enzyme dans les conditions utilisées pour obtenir des cristaux complexés au calcium. En effet, les structures tridimensionnelles de l'enzyme avant et après trempage dans la solution de chlorure de calcium étaient presque identiques. Les auteurs ont d'ailleurs reconnu que l'insertion par trempage d'un ligand dans un cristal d'enzyme libre déjà formé n'avait peut-être pas généré une structure compatible avec la forme active retrouvée en solution. Ceci serait principalement parce que le changement conformationnel se produisant librement en solution lors de la liaison du métal n'était pas permis par les contraintes rigides de la maille cristalline. Le site de liaison du calcium identifié par les chercheurs n'est peut-être pas le véritable site de liaison lorsque l'enzyme est libre, en solution. Il devient donc intéressant de co-cristalliser l'enzyme en présence de calcium pour ainsi obtenir des cristaux de transglutaminase complexée à ce dernier et existant dans une conformation se rapprochant plus de la conformation active réelle adoptée en solution.

Depuis le début du vingt-et-unième siècle, d'autres TGases ont pu être cristallisées. Le groupe de B. Ahvazi a travaillé sur la TGase de type 3 humaine (TGase épidermale). Ils ont pu obtenir des cristaux du zymogène recombinant⁶ par diffusion de vapeur sur goutte suspendue, avec 4-14% m/v de PEG 8000 comme précipitant et du tampon Tris-HCl, à un pH de 8,5. Ils ont aussi obtenu des cristaux de l'enzyme activée, avec 8% m/v de PEG 20000 et dans du tampon Tris-HCl à un pH de 8,5. Ils ont de plus pu co-cristalliser la TGase épidermale avec le guanoside monophosphate (GMP), supportant ainsi l'idée que certaines TGases puissent avoir un rôle de liaison et d'hydrolyse du GMP⁷.

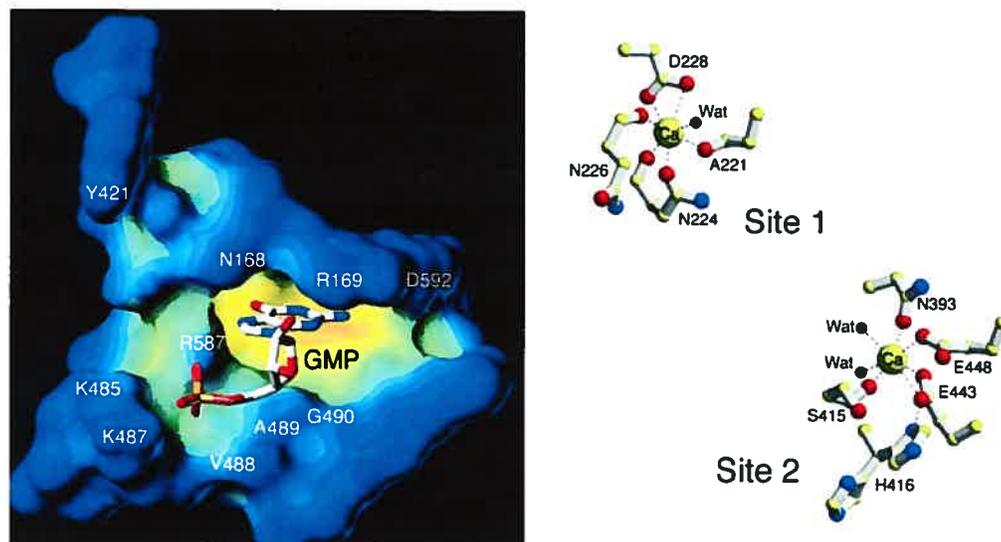


Figure 6.2 : Images du site de liaison proposé pour le guanoside monophosphate (GMP) (droite) et des deux sites proposés pour la liaison du calcium (gauche)⁷.

Dans cette étude, la triade catalytique identifiée était composée de Cys-272, His-330 et Asp-353, ce qui correspond bien au positionnement de la triade catalytique de la papaïne. Les deux sites de liaison du calcium potentiellement identifiés étaient constitués de 1) Ala-221, Asn-224, Asn-226, et Asp-228 et 2) Asn-393, Glu-443, Glu-448 et Ser-415. Finalement, le site de liaison de GMP trouvé serait situé entre le cœur- α/β et le

baril- β -1 et serait constitué des résidus Asn-168, Arg-169, Lys-485, Lys-487, Val-488, Met-491, Leu-492, Arg-587, Asp-588, Ile-590, Leu-591 et Asp-592.

Finalement, l'étude la plus pertinente à ce jour pour les chercheurs intéressés à la TGase de type II (tissulaire) est la structure publiée⁸ par Nogushi *et al.* en 2001. Cette structure de la TGase tissulaire du poisson a confirmé la grande similitude structurale reliant les transglutaminases. Les cristaux ont été obtenus en utilisant la diffusion de vapeur sur goutte suspendue, avec 1% m/v de PEG 6000 comme précipitant, dans du tampon HEPES à un pH de 7,0 et avec du DTT comme agent réducteur maintenant l'état d'oxydation réduit du site actif.

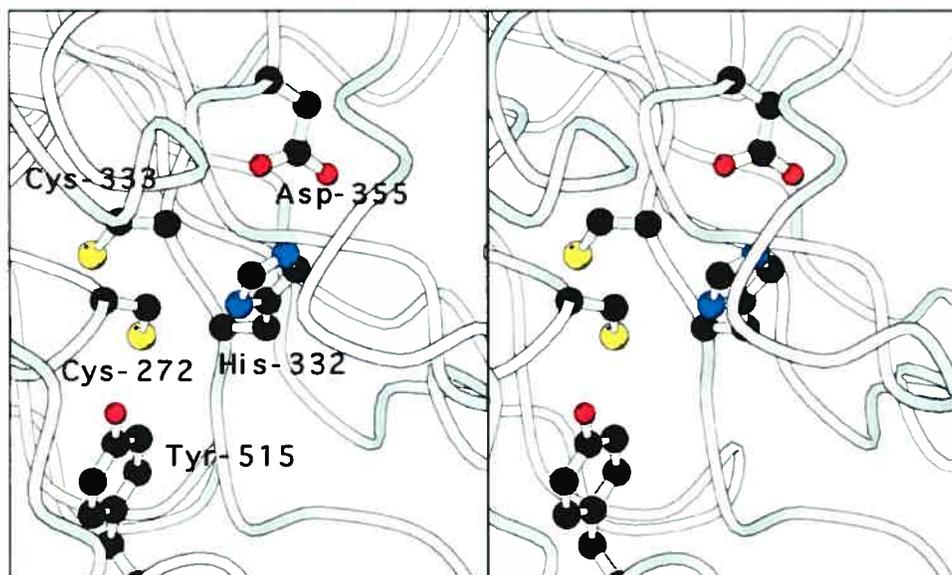


Figure 6.3 : Stéréogramme du site actif proposé par Nogushi *et al.*⁸

La structure a révélé la triade catalytique comme étant Cys-272, His-332 et Asp-355. Il s'agit ici de la même triade catalytique, constituée des mêmes acides aminés que pour le facteur XIII et la TGase épidermale. Ces trois acides aminés sont d'ailleurs conservés chez toute les TGases actives séquencées à ce jour, la TGase microbienne étant la seule exception. Cette dernière n'est toutefois pas structurellement reliée aux TGases dont il est ici question.

Théorie, principes et méthode

Tout soluté peut exister sous forme soluble stable, métastable ou insoluble. La difficulté lors de la cristallisation provient du fait qu'il faut faire passer la protéine de son état stable à son état solide suffisamment lentement pour qu'un empilement compact ordonné ait lieu. On utilise généralement un système de diffusion de solvant pour concentrer lentement la solution protéique.

La méthode la plus utilisée pour obtenir des cristaux suffisamment gros et de qualité suffisamment grande pour obtenir un patron de diffraction bien résolu est celle de la goutte suspendue. En effet, plusieurs techniques peuvent être choisies, les deux principales étant la technique de la goutte assise et celle de la goutte suspendue. Ces deux techniques reposent sur le même principe : le volume de la goutte diminue lentement par diffusion et la protéine s'y trouve alors de plus en plus concentrée. Elle passe donc d'un état soluble à un état cristallin. La goutte suspendue a comme principal avantage le fait que les cristaux formés vont naturellement s'éloigner, par gravité, de la surface de la lamelle.

Dans le cas de la technique de la goutte assise, les cristaux s'approchent par gravité de la lamelle et ce contact avec la surface solide peut entraîner des malformations du cristal. La goutte assise a, quant à elle, comme principal avantage la possibilité d'automatisation. Il est en effet facile pour un robot de déposer de petites gouttes sur un plateau prévu à cet effet.

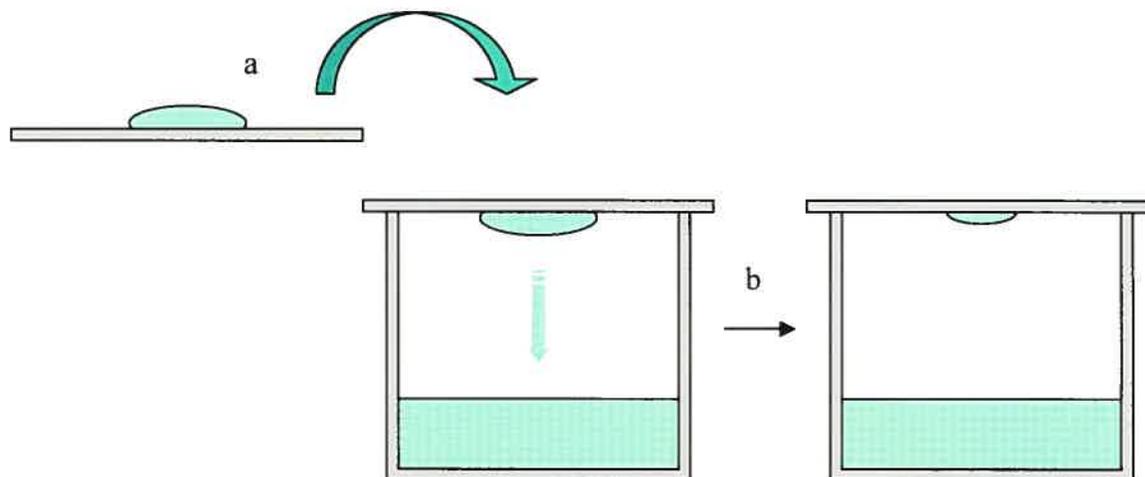


Figure 6.4 : La technique de la goutte suspendue : Une goutte contenant la solution du cristallisation et la solution protéique est déposée sur une lamelle (a) avant d’être déposée sur un puit contenant la solution de cristallisation. La concentration s’effectue ensuite par diffusion de vapeur (b).

Un volume de 0.5 à 2 mL d’une solution typiquement riche en sels et autres solutés est d’abord mise au fond d’un des réservoirs de la plaque d’essai. Un volume de 0.5 à 5 μL de cette solution est ensuite déposé délicatement sur une lamelle de verre préalablement silanisée. La silanisation sert ici à rendre la surface particulièrement hydrophobe et permet ainsi à la goutte formée de maintenir une forme aussi parfaitement hémisphérique que possible. On ajoute ensuite un volume de 0.5 à 5 μL d’une solution de protéine dont la concentration peut typiquement varier entre 5 et 25 mg/mL. La goutte présente donc une concentration en sel inférieure à celle de la solution au fond du réservoir par un facteur variant en fonction des volumes de solution du réservoir et de solution protéique utilisés. Une fois la goutte formée, la lamelle est renversée et celle-ci est scellée hermétiquement sur l’ouverture du réservoir à l’aide d’un peu de graisse de silicone.

Pendant les heures qui suivent, le solvant diffuse lentement de la gouttelette moins concentrée en sels vers la solution du réservoir pour y équilibrer les potentiels chimiques par diffusion. La concentration en protéines dans la gouttelette se trouve alors

augmentée suite à la diminution du volume de solvant dans celle-ci et des cristaux peuvent émerger si cette diminution de volume fait passer la concentration protéique au-delà de la constante de solubilité de la protéine dans les conditions utilisées. (Voir figure 6.4)

Deux types de paramètres peuvent influencer les résultats obtenus : les facteurs influençant la solubilité initiale de la protéine et les facteurs influençant la vitesse à laquelle la goutte est concentrée.

Dans la première catégorie sont inclus : le pH de la solution et le tampon utilisé, l'ajout de sels, l'ajout de produits appelés précipitants, l'ajout de détergent, la présence de substrats et de cofacteurs, la concentration de protéine utilisée et la température. Tous ces facteurs visent à modifier la nature et le nombre d'interactions possibles entre la protéine et le solvant. Le pH de la solution influence le nombre de résidus chargés positivement et négativement à la surface de la protéine, les cations et anions introduits sous forme de sel peuvent se complexer en divers endroits sur la protéine, limitant les mouvements moléculaires permis et diminuant ainsi les degrés de liberté de la protéine. De la même façon, l'ajout d'un ligand (inhibiteur, substrat, cofacteur) restreindra le nombre de conformations permises et facilitera l'empilement compacte et ordonné de la protéine. Finalement, la concentration à laquelle la protéine est dissoute influera sur le temps qu'il faudra avant que la diffusion du solvant ne cause la cristallisation (ou la précipitation) de la protéine.

Dans la deuxième catégorie sont inclus : la proportion des volumes de solution protéique et de solution de cristallisation utilisés pour former la goutte, la température, l'ajout d'huile sur la surface de la solution de cristallisation du réservoir et l'introduction de centres de nucléation par ensemencement. Il faut tout d'abord comprendre que la vitesse à laquelle le solvant diffusera dépendra de la différence de concentration en soluté entre l'échantillon protéique et le réservoir adjacent, d'où l'utilité de varier la proportion des volumes de solution protéique et de solution de cristallisation utilisées pour former la goutte. L'utilisation d'huile sur la surface de la solution contenue dans le réservoir vise

plutôt à réduire la vitesse de diffusion du solvant en introduisant un obstacle supplémentaire à ce dernier.

Un système qualitatif de caractérisation des cristaux obtenus permet de prendre en note les conditions intéressantes et de suivre le développement des cristaux dans le temps. La figure 6,6 montre des exemples de cristaux/précipités obtenus par cet auteur et leur codification. Il est à noter ici que les caractéristiques recherchées sont tout d'abord la régularité macroscopique du cristal, c'est-à-dire sa forme tridimensionnelle, la clarté de ses arêtes et la netteté de ses angles. En effet bien que la forme macroscopique du cristal ne soit pas une indication absolue de la forme de la maille cristalline, il n'en demeure pas moins que la qualité de l'empilement compact cristallin obtenu au niveau moléculaire se reflète généralement dans l'apparence tridimensionnelle du cristal. Un cristal égratigné n'est jamais un bon signe.

Le cristal doit aussi être unique, c'est-à-dire qu'il ne doit pas être constitué de plus d'une zone régulière et ordonnée. Une agglomération de cristaux est inutile car elle générerait un patron de diffraction constitué de la superposition des patrons de chacun des cristaux agglomérés. Bien qu'il soit possible de dissocier les patrons de diffractions superposés par voies informatiques, cela demande plus de travail et de temps que ce qui est souhaité. Il est ici bon de noter qu'une cassure dans un cristal engendrera le même dédoublement du patron de diffraction car les deux fragments de chaque côté de la cassure n'auront plus une maille cristalline parfaitement alignée.

Finalement, un cristal d'une taille supérieure à 0.2 mm dans ses trois dimensions est souhaitable. Un prisme (trois dimensions) est préférable à une plaquette (deux dimensions) ou à une aiguille (une dimension). Il s'agit ici d'une simple question pratique : si le cristal ne présente une épaisseur de matériel suffisante à la diffraction que sur une petite portion des angles d'acquisition possibles, une grande portion des angles devient inutile et l'acquisition des données est incomplète.

Le véritable test pour déterminer la qualité d'un cristal demeure cependant la mesure de la qualité de sa diffraction. Un cristal est jugé acceptable s'il diffracte à 3 \AA et bon s'il diffracte à 2 \AA . Ces valeurs peuvent être déterminées rapidement en observant la largeur de l'angle entre la trajectoire du faisceau de rayon X et les rayons diffractés les plus loin de la normale.

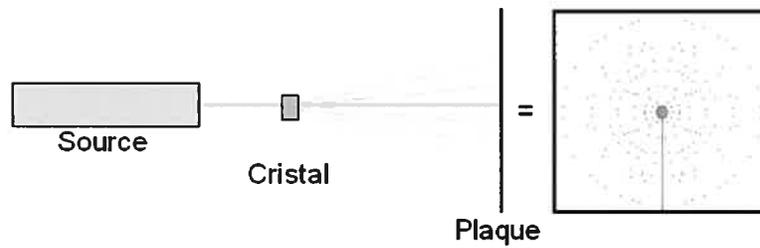


Figure 6.5 : Phénomène de diffraction des rayons X

X
Précipité Brun



5
Oursins,
Sphérulites



1
Goutte claire



6
Aiguilles

2
Séparation de
phase



7
Plaquettes

3
Précipité
granuleux
régulier



8
Cristal
tridimensionnel
(Trop petit)

4
Précipité
microcristallin
(Biréfringents)



9
Cristal
tridimensionnel
(Assez gros)

Figure 6.6 : Exemples de codification qualitative des cristaux

Étapes suivies et résultats

La première tentative de cristallisation ayant été faite a été celle de l'enzyme libre, en présence de calcium. L'objectif était alors d'obtenir une structure cristalline dans laquelle le calcium serait lié et dans laquelle la transglutaminase serait sous sa conformation active. Une série de conditions variées ont donc été testées pour trouver des conditions initiales satisfaisantes à partir desquelles un raffinement aurait lieu. Les séries commerciales CrytalScreen I™, CrystalScreen II™, Wizard I™ et WizardII™ ont été testées. Après une à deux semaines, quelques unes des conditions testées montraient des précipités cristallins et dans un cas en particulier, de petits monocristaux.



Figure 6.7 : Monocristaux obtenus lors du criblage initial.

Conditions : 3.4 M hexanediol, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M $MgCl_2$

À partir de ces conditions, une optimisation par variations itératives a permis d'obtenir des cristaux d'une taille suffisante mais agglomérés les uns aux autres. (voir figure 6.8). Puisqu'il est essentiel de pouvoir placer dans le faisceau de rayons X un seul réseau cristallin à la fois, il a fallu raffiner d'avantage les conditions et contrôler de façon plus directe le nombre de centres de nucléation présents dans la goutte.

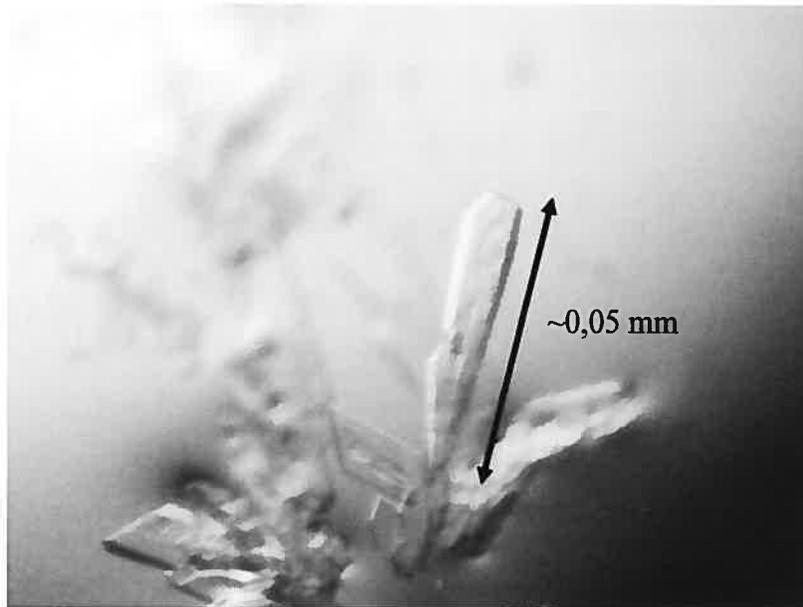


Figure 6.8 : Cristaux obtenus suite aux premiers raffinements.

3.6 M hexanediol, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M $MgCl_2$. 10mg/mL TGase. 0.6 M $CaCl_2$.

L'ensemencement est une méthode par laquelle des fragments minuscules de cristaux sont introduits dans la goutte dès sa préparation, avant que le processus de diffusion ne commence à concentrer la protéine. L'introduction de centres de nucléation déjà cristallins et ordonnés peut aider à la croissance de plus gros cristaux plus réguliers. Les agglomérats de cristaux déjà obtenus ont donc été broyés et la suspension alors obtenue a servi pour y tremper un poil de crinière de cheval. Ce matériel a en effet la rigidité idéale et offre une surface aux propriétés d'adsorption idéales pour que s'y dépose les fragments de cristaux broyés. Le poil est ensuite passé dans la goutte par un mouvement latéral rapide et les quelques fragments de cristaux se désorbant de celui-ci deviennent les centres de nucléation désirés. (Voir figure 6.9). On observe généralement une concentration de microcristaux plus grande sur l'axe ou le poil a été passé, formant une traînée de cristaux (voir figure 6.10). Une dilution de la suspension d'ensemencement permet de contrôler le nombre de centres de nucléation et donc la taille des cristaux et agglomérats s'y formant. Il est donc possible d'espérer parvenir à obtenir des cristaux uniques de taille acceptable.

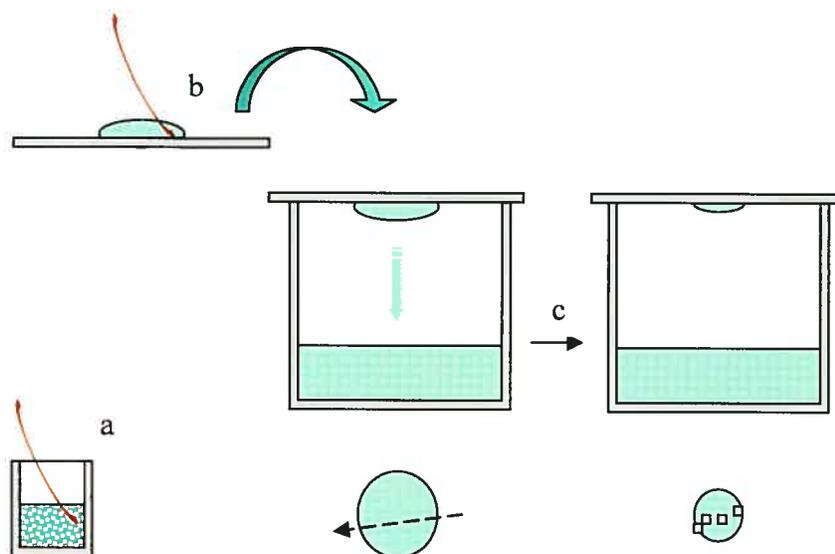


Figure 6.9 : La technique d'ensemencement : un poil de crinière de cheval préalablement trempé dans une solution contenant des fragments de cristaux (a) est passé dans la gouttelette (b) et la concentration se fait par diffusion du solvant de la goutte vers le puits (c).



Figure 6.10 : Exemple de traînée de microcristaux obtenus par ensemencement.
 3.6 M hexanediol, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M $MgCl_2$, 10mg/mL TGase. 0.6 M $CaCl_2$.
 (L'image fait environ 1 mm de largeur)

Grâce à cette technique et grâce au raffinement des conditions de cristallisation, quelques cristaux d'une taille suffisante ont été obtenus et testés (voir figure 6.11). Malheureusement, ceux-ci n'ont pas montré un patron de diffraction clairement protéique. En effet, la diffraction causée par un cristal protéique peut être différenciée de celle causée par une plus petite molécule par le nombre très élevé de petites taches rapprochées retrouvées près du centre de la plaque d'acquisition. Dans notre cas, des taches plutôt faibles et peu nombreuses ont été observées.



Figure 6.11 : Meilleurs cristaux obtenus. 20% 2-methylpentane-2,5-diol (MPD), 0.1 M Tris pH 8.5, 25 mM MgCl₂, 10mg/mL TGase. 0.6 M CaCl₂. La taille des cristaux est d'environ 0,1 mm sur les trois axes.

Deux hypothèses s'imposent alors : 1) il ne s'agit pas de protéine mais plutôt d'une des composantes de la solution de cristallisation et 2) il s'agit de protéine mais le cristal est composé d'un très grand nombre de petites zones cristallines désalignées les unes par rapport aux autres. Cette dernière situation peut parfois être observée si les cristaux ont une croissance trop rapide. La maille n'a alors pas le temps de croître de façon ordonnée.

Dans le cas présent, il a été observé que les cristaux parvenaient à leur taille finale en moins de 24 heures, ce qui est plutôt rapide et peu recommandé. Il a donc été nécessaire de tenter de ralentir la cristallisation par divers moyens : réduction de la concentration de précipitant, réduction de la concentration de protéine et utilisation d'une

couche d'huile de silicone et/ou de paraffine pour ralentir la diffusion. Aucune de ces méthodes n'a permis de ralentir la cristallisation suffisamment pour d'obtenir des cristaux diffractant bien.

Suite à l'obtention de cristaux ne diffractant pas tel qu'espéré, une stratégie différente a alors été envisagée : l'utilisation d'un inhibiteur irréversible comme ligand. La présence d'un ligand permet généralement de restreindre les degrés de liberté d'une protéine, la figeant dans une conformation pouvant parfois cristalliser mieux que ne le ferait l'enzyme libre. En effet, les interactions généralement fortes et spécifiques assurant la liaison des substrats (et inhibiteurs) restreignent les mouvements moléculaires.

La cristallisation de l'enzyme inhibée par un inhibiteur irréversible, le N-benzyloxycarbonyl-N-(acryloyle)-L-ornithine a donc été entreprise. L'inhibiteur a été synthétisé par Christophe Pardin, membre du groupe de recherche du professeur Keillor, selon une procédure publiée⁹. Cet inhibiteur est connu pour inhiber irréversiblement la transglutaminase avec un K_i de 2,32 μM et un k_{inact} de 1,33 min^{-1} ¹⁰.

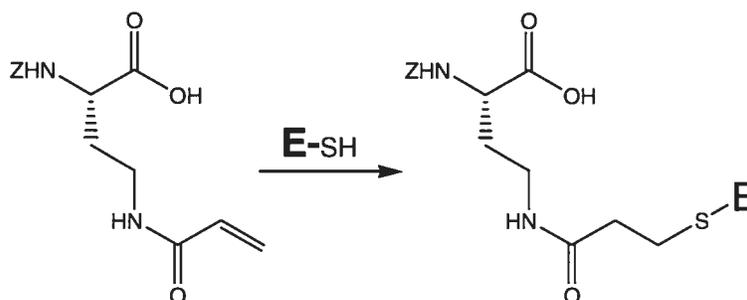


Figure 6.12 : Inhibition irréversible de la transglutaminase

Les étapes de criblage à partir des solutions commerciales CrytalScreen ITM, CrystalScreen IITM, Wizard ITM et Wizard IITM ont été effectuées et ont permis d'observer des structures cristallines de faible qualité (sphérulites) provenant de conditions partageant certaines caractéristiques communes. Tout d'abord, toutes les conditions

comportaient du polyéthylène glycol de faible masse (400-1000) comme précipitant, du $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ ou du $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ comme sel et un tampon acétate à pH faible ou cacodylate à pH 6-7. C'est à partir de ces conditions que de meilleures conditions ont été recherchées par processus itératif.

Les meilleures conditions trouvées ont été 25% PEG 400, acétate pH 4,0, 44 mM $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ et ont donné des agglomérats de cristaux tridimensionnels.



Figure 6.13 : Meilleurs cristaux obtenus en présence d'un inhibiteur irréversible.

25% PEG 400, tampon acétate pH 4.0, 44 mM $\text{Zn}(\text{OAc})_2$. Les images ont environ 2 mm de largeur.

Il a été possible de délicatement prélever quelques-uns des plus gros cristaux de ces agglomérats pour ensuite tenter d'obtenir un patron de diffraction aux rayons X. Le patron obtenu de façon reproductible pour plus d'un de ces cristaux ne montrant que quelques taches intenses, plutôt éloignées les unes des autres et loin du centre de la plaque d'acquisition, il fut conclu qu'il ne s'agissait pas de protéine mais plutôt d'une petite molécule quelconque ne pouvant comporter plus d'une trentaine d'atomes. Peut-être s'agissait-il de cristaux d'inhibiteur, ou même de cristaux d'une impureté présente dans la solution protéique.

Conclusion et travaux futurs

L'inhibiteur irréversible ayant été utilisé dans des concentrations largement excédentaires (3 mM d'inhibiteur pour 60 μ M d'enzyme), il faudra reprendre en utilisant le minimum requis, soit la quantité permettant un ratio stoechiométrique de 1 :1 avec l'enzyme, c'est-à-dire une concentration de \sim 60 μ M de chacun. Ceci est possible car un inhibiteur irréversible est utilisé. Il n'est donc pas nécessaire que cet inhibiteur soit en excès pour piéger l'enzyme sous la forme désirée. Ainsi, il ne devrait pas y avoir apparition de cristaux d'inhibiteur et peut-être y aura-t-il formation des précieux cristaux désirés.

Matériel

Les plaques utilisées sont des plaques de 24 puits, fond plat, transparent, d'une surface de 2 cm² de marque VDX, achetée auprès de Hampton Research. Les lamelles de silice de 22 mm de diamètre, pré-silanisées, proviennent également de Hampton Research, tout comme les ensembles de criblage CrytalScreen I™ et CrystalScreen II™. Les ensembles de criblage Wizard I™ et Wizard II™ proviennent de la compagnie Emerald Biostructures. Les solvants organiques et autres produits proviennent de la compagnie Sigma-Aldrich.

La protéine utilisée a été obtenue selon le protocole d'expression développé par le Dr. Steve Gillet et Roberto Chica du groupe de recherche du professeur Keillor¹¹.

Bibliographie

- ¹ Bishop, P.D.; Teller, D.C.; Smith, R.A.; Lasser, G.W.; Gilbert, T. et Seale, R.L., *Biochemistry*, **1990**, *29*, 1861-1869
- ² Bishop, P.D.; Lasser, G.W.; Le Trong, I.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C. *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265* (23), 13888-13889
- ³ Yee, V.C.; Pedersen, L.C.; Le Trong, I.; Bishop, P.D.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 7296-7300.
- ⁴ Hilgenfeld, R.; Liesum, A.; Storm, R.; Metzner, H.J. et Karges, H.E. *FEBS*, **1990**, *265*, 110-112, Weiss, M.S. et Hilgenfeld, R. *Acta Cryst. Section D*, **1999**, *D55*, 1858-1862
- ⁵ Fox, B.A.; Yee, V.C.; Pedersen, L.C.; Le Trong, I.; Bishop, P.D.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274* (8), 4917-4923.
- ⁶ Kim, H.-C.; Nemes, Z.; Idler, W.W.; Hyde, C.C.; Steinert, P.M. et Ahvazi, B. *J. Struct. Biol.*, **2001**, *135*, 73-77
- ⁷ Ahvazi, B.; Boeshans, K.M. et Steinert, P.M. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(25), 26716-26725
- ⁸ Nogushi, K.; Ishikawa, K.; Yokoyama, K.-I.; Ohtsuka, T.; Nio, N. et Suzuki, E.-I. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 12055-12059
- ⁹ de Macédo, P.; Marrano, C. et Keillor, J.W., *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *10*, 355-360.
- ¹⁰ Marrano, C.; de Macédo, P. et Keillor, J.W., *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 335-360
- ¹¹ Gillet, S.M.F.G.; Chica, R.A.; Keillor, J.W. et Pelletier, J.N. *Prot. Exp. Purif.* **2004**, *33*, 256-264



Chapitre 7 : Alignement de séquence

Introduction

Afin de mieux comprendre les paramètres structuraux importants pour l'activité catalytique des transglutaminases, une comparaison des séquences d'acides aminés a été effectuée en utilisant l'interface ClustalX^{1,2}, à partir des séquences disponibles sur les bases de données Swiss-prot³ et TrEMBL⁴. L'alignement des 13 séquences choisies est donné aux pages 170 à 172. Le tableau 7.1 précise la source des diverses séquences utilisées. La numérotation des acides aminés de la séquence est relative et ne correspond donc pas exactement à la numérotation individuelle de chaque séquence. Dans la discussion qui suit, les numéros de positions mentionnés font référence au cadre de numérotation utilisé aux pages 170 à 172. Par exemple, la méthionine qui débute la séquence de la transglutaminase tissulaire humaine (hTG2) est à la position H108 du cadre de numérotation bien qu'elle soit à la position H1 de sa propre séquence.

Il est à noter que l'ordre dans lequel les séquences sont disposées n'est pas aléatoire. Les trois premières entrées sont trois transglutaminases tissulaires et toutes les autres entrées sont des transglutaminases humaines. La dernière entrée est celle de la bande protéique EP42 de l'érythrocyte humain. Cette dernière protéine est particulièrement intéressante parce qu'elle est très similaire aux autres membres de la famille mais n'a aucune activité catalytique.

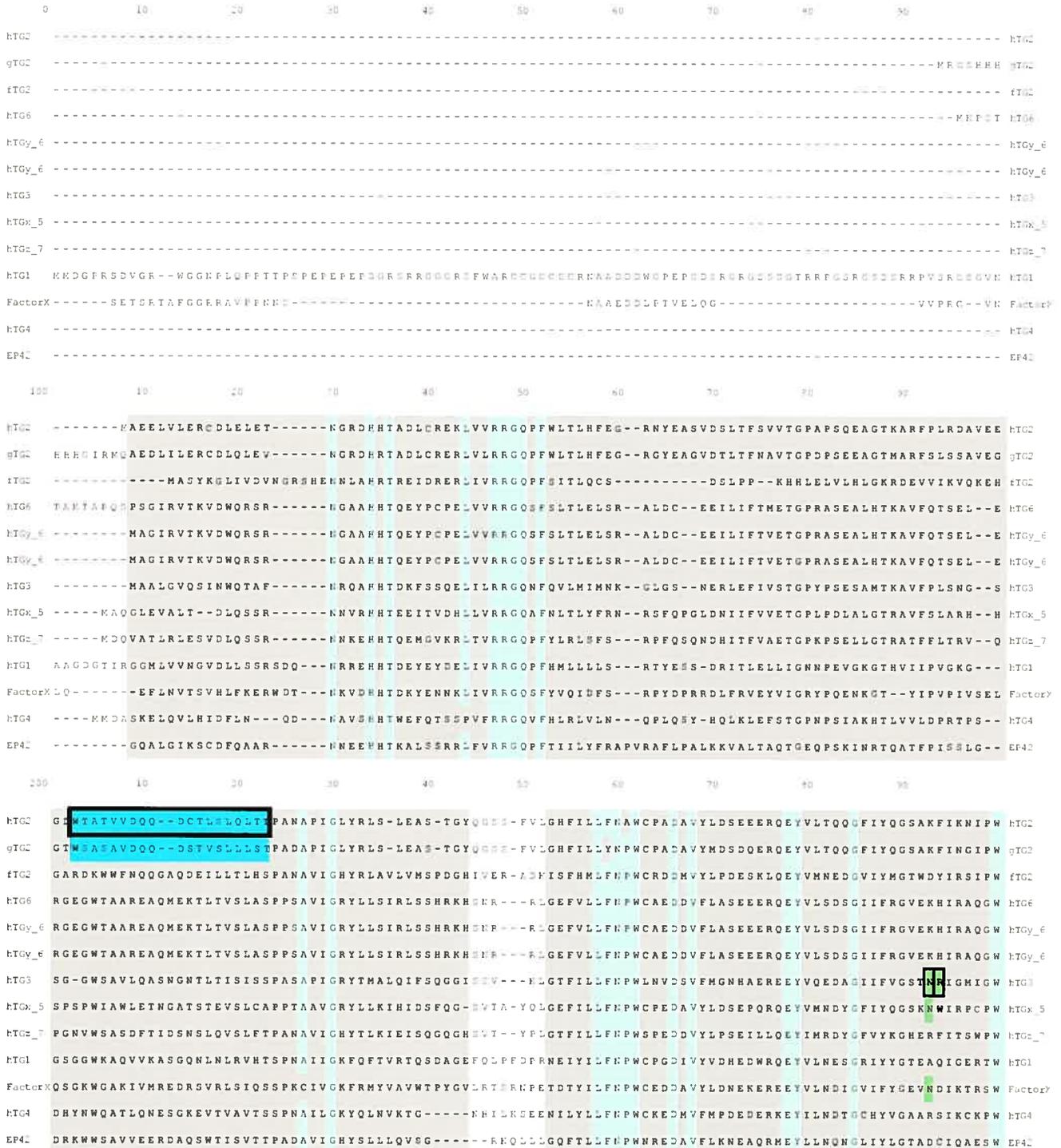
Abréviations	Noms complets	Sources (Accession code)
hTG2	TGase tissulaire (Type II) humaine	Swiss-Prot P21980
gTG2	TGase tissulaire (Type II) de cochon d'Inde	Swiss-Prot P08587
ftTG2	TGase tissulaire (Type II) de poisson	Swiss-Prot P52181
hTG6	TGase (Type VI) humaine, version longue	Swiss-Prot O95932
hTGy_6l	TGase Y (Type VI) humaine, version longue	TrEMBL-Q719M2
hTGy_6s	TGase Y (Type VI) humaine, version courte	TrEMBL-Q719M3
hTG3	TGase kératinocyte (Type III) humaine	Swiss-prot Q08188
hTGx_5	TGase X (Type V), Peau humaine	Swiss-Prot O43548
hTGx_7	TGase Z (Type VII) humaine	Swiss-Prot Q96PF1
hTG1	TGase épidermale (Type I) humaine	Swiss-Prot P22735
Factor XIIIa	TGase plasmatique (Facteur XIIIa) humain	Swiss-Prot P00488
hTG4	TGase prostatique (Type IV) humaine	Swiss-Prot P49221
EP42	Bande protéique 4,2 des érythrocytes humains (protéine inactive)	Swiss-Prot P16452

Tableau 7.1: Légende des séquences utilisées pour l'alignement de séquences.

	Domaine (Sandwich- β , Cœur- α/β , baril- β 1, baril- β 2)
	Triade catalytique
	Site de liaison de GTP (ou GDP ou GMP)
	Parois du tunnel menant au site actif
	Site de liaison à la fibronectine
	Site de liaison possible du calcium
	Zone de haute homologie. Site de liaison possible du substrat accepteur
	Résidus conservés dans 90%+ des séquences comparées
	Encadré. Provient d'une des références citées dans ce chapitre.

Tableau 7.2: Légende du code de couleur utilisé dans l'alignement de séquences

Figure 7.1: Alignement de séquence



300 10 20 30 40 50 60 70 80 90

HTG2 NFGQFEDGILDICLILLDVNPKEFLKNAQRDCSRRSPVYVGRVVS MVNCDIQGVLLGRMDNNYDGGVSPMSWIGSVDIRRWKHNHGCRVKYGOVWF HTG2

gTG2 NFGQFEDGILDICLMLLDTNPKFLKNAQDCSRRSPVYVGRVVS MVNCDIQGVLLGRMDNNYDGGVSPMSWIGSVDIRRWKDYGCORVKYGOVWF gTG2

tTG2 NYGQFEDYVMDICFEVLDNSPAALKNSEMDIEHRSDPVYVGRITIT MVNSGIRGVLTGRWEEPYTDGVAPYRNWIGSVPILOQWSKAGVAPVKYGOVWF tTG2

HTG6 NYGQFEEDILNICALSILDRSPGHQNNPATDVSCRHNPIYVTRVIS MVNSKIRGVVVOGQWQGYGGTSPLHWKGSVAILOKWLKGRYKPVKYGOVWF HTG6

HTGy_6 NYGQFEEDILNICALSILDRSPGHQNNPATDVSCRHNPIYVTRVIS MVNSKIRGVVVOGQWQGYGGTSPLHWKGSVAILOKWLKGRYKPVKYGOVWF HTGy_6

HTG3 NFGQFEEDILSICALSILDRSLNFRDAATDVASRNDPKYVGRVLS MVNSDINGVLAGNWSGTYTGGDRPDRWNGSVEILKNWKSIGFSVPRYGOVWF HTG3

HTGx_5 NYGQFEDKIIDIICLKLKSLHFQTDPCALRGSPVYVSRVVC MVNSDINGVLVNGWSENITDGANPAEWIGSVAILQKWNATGCGPVRYGOVWF HTGx_5

HTGz_7 NYGQFEEDIIDIICFEILNKSLSYHLKNPAKDCSORNDVVYVCRVVS MVNSDINGVLOGKMGEDYSKGVSPLEWKGSVAILOQWSARGGQPVRYGOVWF HTGz_7

HTG1 NYGOVDEHGVLDACLYILDRRG-----MPYGGRGDPVNVSRVIS MVNSLDINGVLIGKMGSDYSRGTNPANWIGSVEILLSYLRTG-YSVPYGOVWF HTG1

FactorX NYGQFEDGILDICLVYMDRAQ-----MDLSGRGNPKYVSRVGS MVNAKDEEGVLVGSMDNIYAYGVPASWIGSVDIRLEYSSE-NPVRYGOVWF FactorX

HTG4 NFGQFEKNVLDCCISLLTESS-----LKPTDRRDPVLVCRAMC MMSFKGGQGVLVIGKMTGDYEGGTAPYKWTGSAPILQOYYNTK-QAVCFGOVWF HTG4

EP42 DFCQFEGDVIDLSLRLLSKDK-----QVEKWSQPVHVARVLG LLFLKIKQRVLPPTQQTATQEGALLNKRKRSVPILRQWLTRGRPVDGQAVWL EP42

420 10 20 30 40 50 60 70 80 90

HTG2 AAVACTVLRCLGIPTRVVTNYSAHQDQNSNLLIEYFRNEFGEIQGDK--SEMIWFFHCWVESWMTFRPDLQPGYEGWQALDPTFOEKDEETICCGPVPVRA HTG2

gTG2 AAVACTVLRCLGIPTRVVTNFSAHQDQNSNLLIEYFRNESGEIEGK--SEMIWFFHCWVESWMTFRPDLQPGYEGWQALDPTFOEKDEETICCGPVPVRA gTG2

tTG2 AAVACTVLRCLGIPTRFITNFASAHVDVGNLSVDFLLNERLESLSRQRSDSMEFFHCWVESWMSREDFEGNDGWOVLDPPTFOELSDEGFCGCPVAA tTG2

HTG6 AGVLCVLRCLGIATRVSNFNSAHDTQNLSDVKYVDSFGRTLEDLT-EDSMWFFHVWNESWFAHQDLGPSYNGWOVLDPATFOEESGEGFRCPASVTA HTG6

HTGy_6 AGVLCVLRCLGIATRVSNFNSAHDTQNLSDVKYVDSFGRTLEDLT-EDSMWFFHVWNESWFAHQDLGPSYNGWOVLDPATFOEESGEGFRCPASVTA HTGy_6

HTGy_6 AGVLCVLRCLGIATRVSNFNSAHDTQNLSDVKYVDSFGRTLEDLT-EDSMWFFHVWNESWFAHQDLGPSYNGWOVLDPATFOEESGEGFRCPASVTA HTGy_6

HTG3 AGTLNIALRSLGIPSRVITNFNSAHDTDRNLSVDYVDYDPHG-NPLDKG-SDSVWFFHVWNEGWFRSDGLGPSYGGWOVLDPATFOERSQGVFCGCPASVIG HTG3

HTGx_5 AAVMCTVMRCLGIPTRVITNFDSCGHDTDGNLIIDEYYDNTGRILGNKK-KDTIWMFFHVWNECWMAKDLPPAYGGWOVLDPATFOEMONGVYCCGCPASVRA HTGx_5

HTGz_7 ASVMCTVMRCLGVPTRVVSNFNSAHNVDRNLTIDTYDRAEMLSTQK-RDKIWMFFHVWNECWMIKDLPPQYNGWOVLDPPTFOETSGELFCGCPASVKA HTGz_7

HTG1 AGVTTIGLRCLGLATRVTNFSAHDTDTSLTMDIYFDENMKPLEHLN-HDSVWFFHVWNCWMAKDPDLPSGFDGWOVLDPATFOETSGEIFCCGCPASVES HTG1

FactorX AGVNTFLRCLGIPARIVTYNFSAHNDANLQMDIFLEEDGNVNSKLT-KDSVWFFHVWNEAWMTFRPDLVQFEGGQAVLDPATFOENSNGHYRCGCPASVQA FactorX

HTG4 AGILTTVLRALGIPARSVTGFDSAHDTERNLTVDTYVNEGEKITMT-HDSVWFFHVWTDAMWKRPLPKGYDGOAVLDPATFOERSQGVFCGCPASPLTA HTG4

EP42 AAVACTVLRCLGIPARVVTTFASAQGTGGRLLIDEYYNEEGLQNGEQ-RGRIIFQTSSTECWMTFRPALPQGYDGOVLDLPSAPNGGGVGLGSCDLVPVRA EP42

500 10 20 30 40 50 60 70 80 90

HTG2 IREGDLSTKYDAPFVFAEVNAAVVVDWIQQDDGSV---HKSINRSLIVGLKISTKSVGRDEREDITHYKYFEGSSEIREAFTRAN----- HTG2

gTG2 IREGHLNVKYDAPFVFAEVNAAVVNWRQKDGSL---RKSIN-HLVVGLKISTKSVGRDEQEDITHYKYFEGSEIREAFVRAN----- gTG2

tTG2 IREGNLGVKYDAPFVFAEVNAAITYMWIVQKDGQR---RKITEDHASVGNKISTKSVYGNHRESVTLHYKYFEGQKREVKYKAG----- tTG2

HTG6 IREGDVHLAHDGPFVFAEVNAAIYITWLWHEDE---SRERVSNTKKIGRCISTKAVGSDSRVDITDLYKYFGSRKRRQVYSKAV----KRLFGVEASG HTG6

HTGy_6 IREGDVHLAHDGPFVFAEVNAAIYITWLWHEDE---SRERVSNTKKIGRCISTKAVGSDSRVDITDLYKYFGSRKRRQVYSKAV----KRLFGVEASG HTGy_6

HTGy_6 IREGDVHLAHDGPFVFAEVNAAIYITWLWHEDE---SRERVSNTKKIGRCISTKAVGSDSRVDITDLYKYFGSRKRRQVYSKAV----KRLFGVEASG HTGy_6

HTG3 VREGDVQLNFDMPFFFAEVNAAIRITWLYDNTTGKQWKNVNSHT--IGRYISTKAVGSNARMVTDKYKYFEGSDREKRVQFKALGKLPKNTFFAATSSK HTG3

HTGx_5 IREGVDLNYDTPFVFSMVAACMSWLVQGGK---EQ-KLHQDTSVGNFISTKSIQSDERDITENYKYFEGSLQRQVFLKALQKPKARSFHGCGRGA HTGx_5

HTGz_7 IREGDVHLAYDTPFVFAEVNAAEVIWLLGGDQ---AQEILAHNTSSIGKEISTKMGVSDQRQSTISSYKYFEGSPEKRAVFMKAS----RKLGFQR-- HTGz_7

HTG1 IKNGLVYMKYDTPFFFAEVNAAKVVYWRQDDGS--FKIVYVEEKAIGTLIVTKAISSNHRESITHYKYFEGSDAKRAVETAAAHG----- HTG1

FactorX IKHGHVQFQDAPFVFAEVNAAIYITWLYDNTTGKQWKNVNSHT--IGRYISTKAVGSNARMVTDKYKYFEGSDREKRVQFKALGKLPKNTFFAATSSK FactorX

HTG4 IRKQDIFIVYDTRFVSEVNAARLIWLVKMWNGQEEHLVISMETTSIGKNIISTKAVGQDRRRITIEYKYFEGSSEIRQVMDHAFLL----- HTG4

EP42 VKEQTVQLTPAVSDFAAIASCVVWKKCEDG---TLELTDSTNKYVGNISTKVGSDRCEITQNYKYFEGSLQKEVLERVEKEK----- EP42

100 20 30 40 50 60 70 80
HTG2 -----HLNHLAEKEE---TGMAMIRVQSPHMMSDFDFVAHITNNTAE-----EYVCRLLLCARTVSYNGILGPECCKYLLNLE HTG2
gTG2 -----HLNHLATNEEAQEETGVAMRIRVQNMHTGSDFDIFAYITNGTAE-----SHECQLLLCARIVSYNGVLGFPVCSTNDLLNLTLD gTG2
tTG2 -----RRVTEPEHEIAE--QGRQLQSIKHAUVFGTDFDVIVVEKNEGGR-----DAHAQLTMLAMAVTYNSLRGECQKRTIS-VTVP tTG2
HTG6 RRIWIRRAAGRCCLWRDLELEPATFPE-----IACKFVLEPFMLGHDRLRALCLANLTS-----RAQRVRVNLSGATILYTRKPPVAEI-LHESHAVRLG HTG6
HTGy_6 RRIWIRRAAGRCCLWRDLELEPATFPE-----IACKFVLEPFMLGHDRLRALCLANLTS-----RAQRVRVNLSGATILYTRKPPVAEI-LHESHAVRLG HTGy_6
HTGy_6 RRIWIRRAAGRCCLWRDLELEPATFPE-----IACKFVLEPFMLGHDRLRALCLANLTS-----RAQRVRVNLSGATILYTRKPPVAEI-LHESHAVRLG HTGy_6
HTG3 C-----LETEEPEP-----IIGKLIKVAGMLAVGKEVNLVLLKKNLSR-----DTKTIVNMTAWTIINYGTLVHEV-WKDSATMSLD HTG3
HTGx_5 ELDVFERPITSLQDSPRELETPDLRPSV-VQVSLKFKLLDPPNMGQDICFVLLALNMSS-----QFKDLKVNLSAOSLLHDGSPSPF-WQDTAFITLS HTGx_5
HTGz_7 -----ADLPFLDLESGGER--D--QPAQLQLHLARIEMGQDLQLLLRIQRWPDSTHPRGPICLVVRFCAOALLHGGGTQKPF-WRHTVRRMLD HTGz_7
HTG1 -----EFP--RVYARAGSA-----EDVAMQVEAQDAVMGQDLMSVMLINHSS-----RRTVKLHLYLSVTFYTGVSQTFI-KETKKEVELA HTG1
FactorX -----AKEPLNTEGVKESR-----SNVDHDFEVENAVLGRDFKLSITFRNNSHN-----RYTITAYLSANITFYTGVPKAEF-KKETFDVLE FactorX
HTG4 -----SSEREHRRPVEN-----FLHMSVQSDVLLQNSVNFVILKRRKTA-----LQNVNILGSFELQLYTG-----KKMAKLCDLN HTG4
EP42 -----MEREKDKIRFPPEETASFLYLLKAPSSPLRGDAQISVTLVNHSEQ-----EKAVQLAIGVQAVHYNGVLAACL-WRKKLHLLTS EP42

100 20 30 40 50 60 70 80
HTG2 PFSEKS-----VFLCILYEKYRDCLTESNLIKVRALLVEPVINSYLLAEKQHYLENPEIKIRILGEPKQKRLVAEVS LQNPLPVALEGCTFTVEGA HTG2
gTG2 PFSENS-----IPLHILYEKYGDYLTESNLIKVRGLLIEPAANSYVLAERDIYLENPEIKIRVLGEPKQKRLIAEVSLKNPLPVPLLGCI FTVEGA gTG2
tTG2 AHKAHK-----EVMRLHYDQYVRCVSEHHLIRVKALLDAPGENGPIMTVANIPLETPPELLVQVPGKAVVWEPLTAYVSTNPLPVPLKGGV FTLEGA tTG2
HTG6 PQEEKR-----IPITISYSKYKEDLTEDKKILLAAACLVTK-GEKLLVEKDIITLED-FITIKVLPAMVGVAVTVEVTVNPLIERVKDCALMVEGS HTG6
HTGy_6 PQEEKR-----IPITISYSKYKEDLTEDKKILLAAACLVTK-GEKLLVEKDIITLED-FITIKVLPAMVGVAVTVEVTVNPLIERVKDCALMVEGS HTGy_6
HTGy_6 PQEEKR-----IPITISYSKYKEDLTEDKKILLAAACLVTK-GEKLLVEKDIITLED-FITIKRAYP-----HTGy_6
HTG3 PEEEA-----HPIMISYAQYKYLKSDNMIRITAVCKVPD-ESEVVVPHLHNTLTLEVLNEARVRKPVNVQMLFSNPLDEPVRDCVLMVEGS HTG3
HTGx_5 PKEAKT-----YFCEISYSQYSQYLSTDKLIRISALGEEKSSPEKILVNKIITLSYPSITINVLGAAVNVNPLSIQVIFSNPLSEQVEDCVLTVES HTGx_5
HTGz_7 FGKETQ-----WPLELDPYSNRNKLTDKELIRVSGIAEVEETGRSMLVKDICLEPPLHSIEVSERAEVGKALRVHVTNTLTMVALSSCTHVLEGS HTGz_7
HTG1 PGANDR-----VIMPVAYKEYRF--HLVDQGAMLLNVSGHVKESGOVLAKQHTFRLRTPDLSLTVLGAAVVGOEVEQIVKKNPLPVILTNNVFRLEGS HTG1
FactorX PLSFKK-----EAVLIQAGEYKQ--QLLEQASLHFFVTARINETRDVLAKQKSTVLTIPETIIKVRGTQVVGSDMTVTVOFTNPLKETLRNVVHLDGP FactorX
HTG4 KTSQIQGVSEVITLDDRETYIRGLAILDDEPVIRGFIAAIEVESKEIMAEVFTSFOYPEFSIELPNTGRIGQLLVNCNIFKNTLAIPLTDVRFSLSL HTG4
EP42 ANLEKIITIG-----LFFRHFERNPPENTFLRLTAMATHESNLSQFAQEDIAICRPHLAIKHPEKAEQYQPLTASVSLQNSLDAPMEDCVISILGR EP42

100 20 30 40 50 60 70 80
HTG2 GLTEE-OKTVEIPDPVEAGEEVKVRMOLLPLHMGLHKLNVNFESDKLKAQVKG-----FRNVIIQPA-----HTG2
gTG2 GLTKD-OKSVEVPDPVEAGEQAKVRVDLLPTEVGLHKLNVNFECDKLKAQVKG-----YRNVIIQPA-----gTG2
tTG2 GLLSATQIHVNQ--AVAPSGKVSVKLSFSPMRTGVRKLLVDFSDRLKQVQVTVVVEKYSRLITGLDHTD-----tTG2
HTG6 GLLQEQLSIDVP--TLEPQERASVQFDITPSKSGPRQLQVDLVSPHFDPDKQFVIVVATAK-----HTG6
HTGy_6 GLLQEQLSIDVP--TLEPQERASVQFDITPSKSGPRQLQVDLVSPHFDPDKQFVIVVATAK-----HTGy_6
HTGy_6 GASGEGLSPV-----HTGy_6
HTG3 GLLGNLKIIVP--ILGPKGGRVREDILPERSGKQLLADPFCNKFPAINAMLSIDVAE-----HTG3
HTGx_5 GLFKKQKQVFLG--VLKPOHOASIILETVPFKSGGROIQANMRSNKFKDINGYRNVVDFAL-----HTGx_5
HTGz_7 GLINGQIAKDLG--TLVAGHTLQIQLDLYPTKAGPROLQVLISENEVKEIKGYKDFIVTVAGAP-----HTGz_7
HTG1 GLQRPK-ILNVG--DIGNETVTLROSFVVRPGRQQLIASLSDSPQSOVHGVIQVDVAFAPGQGGFFSAGGQTHQRETIIPMAFRGGA HTG1
FactorX GVTRPM-KKHFR--EIRPNSTVQWEEVCRPNVSGHAKLIASMSDLSRBYVYGELEDVQIQRRPSM-----FactorX
HTG4 GISSLO-TSDHG--IVQPGETIQSQIKCTPIKTPKPKFIVKLSKQVKEINAQRIVLITK-----HTG4
EP42 GLIHRERSYFR--SVMPEMTCARFQFTPTHVGLQRLTVEVDCNHFFQLTNYKSVTVVAPELSA-----EP42

Résultats

Peu de structures cristallines ont été déterminées pour les transglutaminases et c'est d'abord à partir des informations structurales tirées de ces quelques structures cristallines^{5,6,7} que diverses observations peuvent être faites face à l'alignement de séquences.



Figure 7.2: Aperçu global des séquences. Les accolades délimitent les quatre domaines de la protéine. Les démarcations sur la ligne au bas de l'image correspondent à cent acides aminés.

D'abord, quatre domaines où la séquence est plutôt homologue sont visibles, séparées par des zones beaucoup moins conservées et comportant plus de délétions et insertions (voir figure 7.1). Ces zones homologues sont indiquées par une coloration grise sur l'alignement de séquence et correspondent aux quatre domaines structuraux observés dans les structures cristallines : sandwich- β (109–144), cœur- α/β (152-589), barril- β 1 (628-710) et barril- β 2 (725-848). Le taux d'identité au sein de ces quatre domaines diffère beaucoup. En effet, le sandwich- β a 7,9% d'identité, le cœur- α/β a 23,0% et les deux barils- β n'ont que 1% et 1,3% d'identité. On entend par identité la présence du même acide aminé, à la même position dans la séquence. Cela concorde bien avec un site actif dont les résidus catalytiquement importants seraient situés dans le cœur- α/β . Une mutation près du site actif ayant une plus grande probabilité de perturber l'efficacité catalytique, et donc la survie de l'individu, celle-ci est moins souvent transmise à la génération suivante. Les zones hautement conservées sont donc probablement celles qui jouent un rôle important dans l'activité, la stabilité ou la régulation de l'enzyme. Suivant la même logique, il est normal de constater que la protéine EP42, une forme inactive de l'enzyme, est celle qui comporte le moins de résidus communs aux autres membres de la famille. Son rôle étant principalement

structurel, la conservation des résidus d'une grande importance catalytique n'est pas requise.

Les résidus associés à la triade catalytique seraient, dans l'alignement, les résidus C397, H457 et D480. Ceux-ci sont entièrement conservés et sont indiqués en jaune dans l'alignement. Il est intéressant de constater que pour la protéine inactive EP42, on a plutôt A397 et Q457. La zone où se situent ces résidus est hautement homologue. En fait, on retrouve 50,0% d'identité des résidus chez toutes les formes actives, entre les résidus W454 et V497, zone entourant l'histidine et l'acide aspartique de la triade. Le même phénomène est observé, avec une identité de 86% pour les résidus Y394 à A400, zone incluant la cystéine catalytique.

Le premier site de liaison proposé dans la littérature⁶ pour le calcium est indiqué en rouge et est constitué des résidus A346, N349, N351 et D353. Il est à noter que les acides aminés de cette région sont hautement homologues. Ce site de liaison est supporté par notre groupe⁸.

Un deuxième site de liaison du calcium a également été proposé dans deux articles^{5,6}, et est constitué des résidus N520, D522, S539, A544, E572 et E577. Ce site est indiqué en orange dans l'alignement de séquence. Encore une fois, les zones entourant ces résidus sont hautement homologues et les deux acides glutamiques de même que l'asparagine sont complètement conservés. Ces trois acides aminés sont, selon les études cristallographiques sur la TGase (Type III) humaine⁶, les principales fonctions responsables de la complexation du métal.

Il est ici important de mentionner dans un premier temps que l'identification de la liaison du métal sur ce site résulte d'expériences de trempage des cristaux d'enzyme libre dans une solution riche en calcium. Cette méthode a pour principal défaut la liaison trop souvent non spécifique des métaux en plusieurs endroits. De plus, l'enzyme étant contrainte à demeurer dans une conformation fixe, au sein du cristal, elle ne peut pas

toujours lier le métal selon le même mode qu'en solution. Pour ces raisons, il est permis d'envisager une deuxième utilité potentielle au site de liaison en question.

En effet, des études de modélisation entreprises par notre groupe de recherche¹¹ indiquent que le site de liaison du substrat accepteur ne peut en fait être situé qu'à quelques endroits précis. En effet, le rôle de ligation de la transglutaminase implique obligatoirement un positionnement des deux substrats permettant la dissociation finale de complexe enzyme-produit. La forme des domaines et boucles de la transglutaminase laisse donc croire que le site de haute homologie dont il est ici question serait plutôt bien situé. En effet, une lysine liée à cet endroit serait suffisamment rapprochée des résidus catalytiques et la disposition des deux acides aminés ainsi liés serait telle que la dissociation du complexe enzyme-produit serait possible.

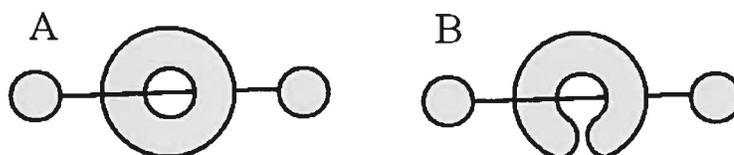


Figure 7.3: Nécessité du positionnement adéquat du site de liaison du deuxième substrat pour permettre la dissociation du complexe produit-enzyme. A) Situation de dissociation impossible du produit formé (deux sphères reliées) et de l'enzyme. B) Situation acceptable.

Deux structures cristallines^{6,9} des TGase de Type III et Type II, liées respectivement au GMP et GDP identifient toutes deux un même site de liaison, indiqué en vert, constitué des résidus des zones 635-644 du premier baril- β et 753-758 du deuxième baril- β . Il est à noter que ces deux domaines n'ont vraiment pas autant d'homologie que le sandwich- β et le cœur- α/β et que les zones mentionnées précédemment n'ont pas non plus une très grande homologie. Il n'est peut-être pas bon de généraliser les observations faites à partir de la structure cristalline de ces TGases à toute la famille en ce qui a trait à une activité GTPase. En effet, jusqu'à présent, une activité GTPase n'a été observée que pour ces deux transglutaminases et aucune autre.

Selon certaines données cristallographiques⁷, la cavité donnant accès au site actif semble avoir la forme d'un tunnel dont les parois sont constituées de W361, H425 et W454, en mauve. Ces résidus sont complètement conservés, sauf pour EP42 qui a Q361 et Q425. Des expériences de mutagenèse ont montrées qu'une modification du tryptophane W361 affecte dramatiquement l'efficacité catalytique de l'enzyme alors qu'une modification du tryptophane W454 nuit plutôt à l'affinité de la TGase pour le GTP¹⁰. Ces résidus hydrophobes peuvent aussi être responsables de la sélectivité qu'a la TGase pour la glutamine plutôt que pour l'asparagine en assurant une certaine profondeur au tunnel menant à la cystéine catalytique. Des études de mutagenèse à ce sujet sont actuellement en cours dans notre groupe de recherche¹¹.

Une tyrosine présente au site actif mais située dans le baril- β 1 est conservée chez presque toutes les TGases. Il s'agit de la Y681, en turquoise. Celle-ci semble bien positionnée pour stabiliser l'intermédiaire tétraédrique formé lors de la réaction catalytique. Des études de mutagenèse dirigée sont également en cours à ce sujet¹¹.

Finalement, bien qu'aucun résidu d'importance n'ait été identifié dans le premier domaine, le sandwich- β , ce dernier semble posséder une zone de très haute homologie et contenant plusieurs résidus parfaitement conservés : N130, H134, T136, R147, R148, G149, Q150, F152, A227, G230. Il est à noter que certaines zones et résidus du cœur- α/β sont parfaitement conservées : L258-W262, D266, V268, E278, Y279, G285.

Lorsque la structure cristalline de la transglutaminase tissulaire de poisson est utilisée comme modèle, il peut être constaté que ces deux zones hautement conservées sont situées à l'interface entre le sandwich- β et le cœur- α/β . Une image obtenue à partir de ce modèle est présentée à la figure 7.4. Il est à noter que le site de liaison de GDP/GTP n'est pas représenté sur cette figure et que la couleur verte est plutôt utilisée pour mettre en évidence la zone de haute identité décrite au paragraphe précédent. Il est possible de poser quelques hypothèses justifiant la nécessité évolutive de conserver intactes ces zones et résidus, bien qu'ils ne soient pas près du site actif. D'abord, ceux-ci peuvent être importants au niveau des changements conformationnels induits allostériquement

par la liaison des divers substrats et cofacteurs. Une mutation à l'interface entre deux domaines pourrait nuire à la dynamique moléculaire de l'enzyme et/ou restreindre la liberté conformationnelle de la protéine.

Il est aussi possible que les zones hautement conservées soient responsables d'une apposition protéique encore inconnue, possiblement avec une protéine permettant une régulation de l'activité de l'enzyme.

Des chercheurs ont récemment montré que le bout d'une des boucles du sandwich- β était responsable de la liaison de la transglutaminase tissulaire avec les domaines I₆II_{1,2}I₇₋₉ de la protéine de fibronectine¹². La fibronectine est une grosse protéine impliquée dans divers phénomènes tels que l'apposition cellulaire, la migration cellulaire, l'adhésion cellulaire, la réparation des tissus et, plus hypothétiquement, la récupération de la transglutaminase libérée suite à la rupture de la membrane cellulaire. En effet, la fibronectine se lie fortement ($K_D = 50$ nM) à la transglutaminase.

Dans leur étude, L. Lorand *et al.* ont exprimé, dans des cellules de mammifère, plusieurs mutants et chimères de la transglutaminase tissulaire et du facteur de coagulation humain XIIIa. Ce dernier est connu pour ne pas se lier à la fibronectine et a donc servi de contrôle négatif. Par la construction d'une série de protéines chimériques dans lesquelles les divers domaines des protéines étaient interchangeés, les chercheurs sont parvenus à clairement identifier quel domaine de la transglutaminase était responsable de l'interaction avec la fibronectine. Ils ont ensuite fait la synthèse d'oligopeptides reprenant la séquence de quelques fragments du domaine en question pour effectuer des expériences de liaison. Il a finalement été conclu que les résidus 203-225 de l'alignement présenté aux pages 170 à 172 (couleur bleu) étaient responsables de cette interaction. Il peut être remarqué que seuls la transglutaminase tissulaire humaine et de cochon d'inde présentent une similitude de séquence dans cette zone, ce qui est concordant avec le fait que ces deux protéines sont les seules des treize protéines comparées à avoir été identifiées comme pouvant se lier à la fibronectine.

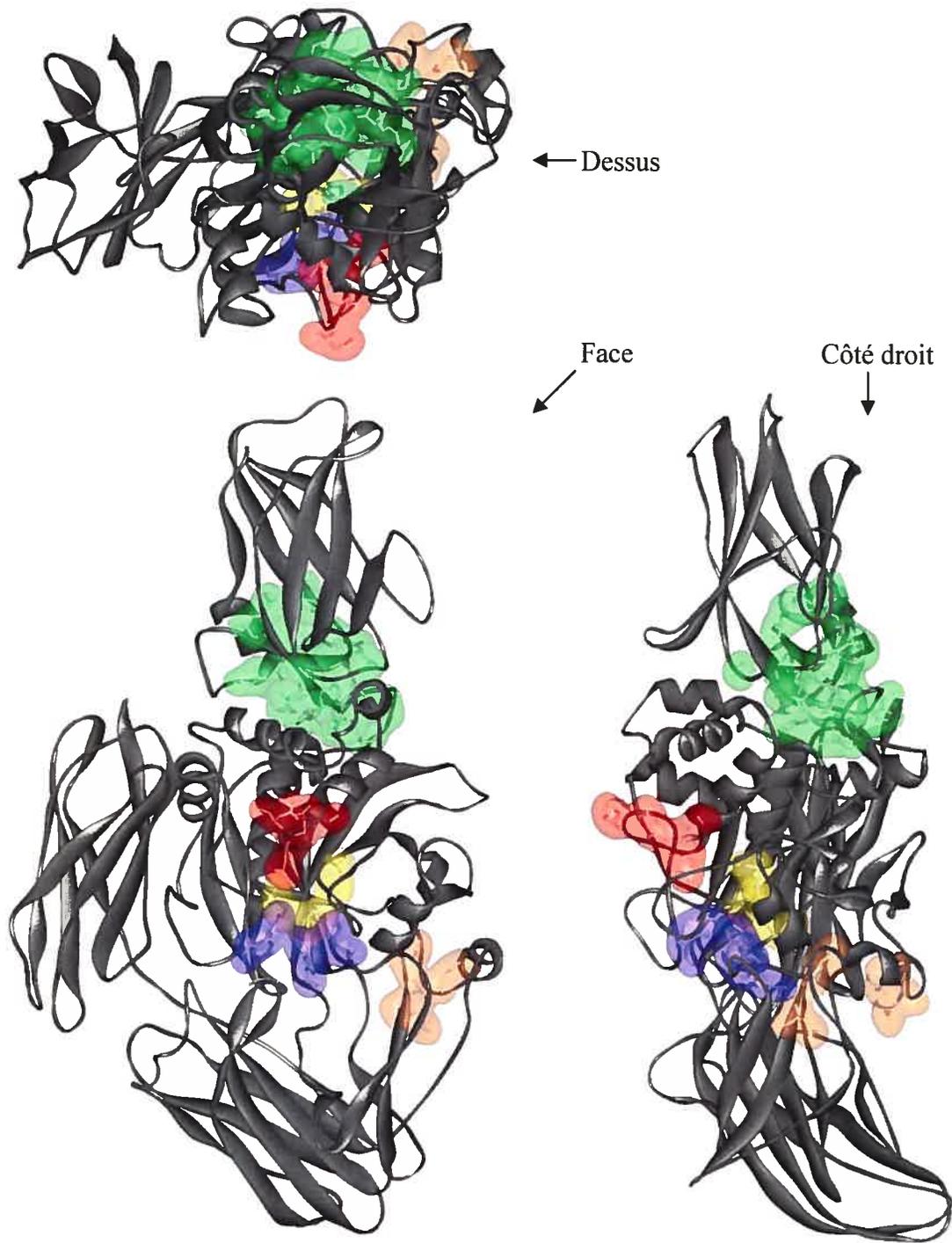


Figure 7.4: Représentation tridimensionnelle de la transglutaminase tissulaire de poisson. Site actif = jaune; tunnel menant au site actif = mauve; site potentiel de liaison du calcium = rouge; site potentiel de liaison du deuxième substrat = orange; zone de haute identité au rôle inconnu = vert.

Finalement, notons que le site de liaison du deuxième substrat n'est toujours pas véritablement connu et qu'aucune cavité flagrante n'est située à proximité du site actif, mise à part la cavité associée au site de liaison du premier substrat et la cavité associée par certains auteurs à la liaison du calcium. Bien sûr, le modèle tridimensionnel utilisé étant celui de l'enzyme sous sa forme inactive et sans calcium, sa conformation n'est probablement pas parfaitement représentative de la réalité en ce qui a trait au site de liaison des substrats donneur et accepteur.

Bibliographie

¹ <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalX/>

² Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. et Higgins, D.G., *Nuc. Acids Res.*, **1997**, *25*, 4876-4882.

³ <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

⁴ <http://www.ebi.ac.uk/trembl/>

⁵ Fox, B.A.; Yee, V.C.; Pedersen, L.C.; Le Trong, I.; Bishop, P.D.; Stenkamp, R.E. et Teller, D.C. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274* (8), 4917-4923.

⁶ Ahvazi, B.; Boeshans, K.M. et Steinert, P.M. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(25), 26716-26725

⁷ Noguchi, K.; Ishikawa, K.; Yokoyama, K.-I.; Ohtsuka, T.; Nio, N. et Suzuki, E.-I. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276* (15), 12055-12059

⁸ Chica, R.A.; Gagnon, P.; Keillor, J.W. et Pelletier, J.N., *Prot. Science.*, **2004**, *13*, 979-991.

⁹ Liu, S.; Cerione, R.A. et Clardy, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2002**, *99*, 2743-2747

¹⁰ Murthy, S.N.P.; Lismaa, S.; Begg, G.; Freymann, D.M.; Graham, R.M. et Lorand, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2002**, *99*, 2738-2742.

¹¹ Chica, R.A et Keillor, J.W., *Travaux en cours, Université de Montréal*

¹² Hang, J.; Zemskov, E.A.; Lorand, L. et Belkin, A.M., *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 23675-23683.



Chapitre 8 : Conclusions générales

En terminant, puisque cette thèse peut paraître disparate et touche à beaucoup de sujets différents, un petit résumé de la contribution de ce candidat aux divers projets semble nécessaire.

Procédons d'abord de façon chronologique. Le premier projet sur lequel ce candidat a participé était un projet d'été portant sur la synthèse d'une librairie d'inhibiteurs de type thiadiazoles. Un article dans lequel il est cinquième auteur a été publié à ce sujet.

Le premier projet qui fut ensuite complété aux études graduées par ce candidat fut la synthèse du composé ester **1** (voir chapitre 3) et l'étude de la désacylation de la TGase (chapitre 3). Ce projet fut initié par Anouk Leblanc (M. Sc. 1999) et complété avec l'aide de Judith Labelle, (M. Sc. 2002). Ces résultats ont été publiés dans un article où ce candidat était deuxième auteur.

Suite à la synthèse du composé ester **1**, l'idée est venue d'effectuer la synthèse des dérivés carbonate **2** et thiocarbonate **3** (voir chapitre 2). Les études de cinétique non enzymatique des composés modèles (**4**, **5** et **6**) ainsi que la synthèse du carbonate **2** fut accomplie par Danielle Lapierre (M. Sc. 2003) alors que la synthèse du thiocarbonate ainsi que les études d'acylation enzymatiques détaillées par « stopped-flow » des trois composés (ester **1**, carbonate **2** et thiocarbonate **3**) ont été effectuées par ce candidat (voir chapitre 2). Une publication dans laquelle ce candidat sera premier auteur est en cours de rédaction.

En parallèle à la synthèse des divers composés, la méthode d'analyse par ITC a été évaluée par ce candidat et une étudiante d'été mais n'a malheureusement pas généré de résultats satisfaisant pour l'étude de la transglutaminase (chapitre 5). Ce candidat a

donc tenté, en fin de doctorat, d'utiliser la méthode d'ITC pour suivre la réaction de la GGT (γ -glutamyltranspeptidase), autre enzyme étudiée dans le groupe de recherche du professeur Keillor.

C'est au cours de la deuxième année du programme de doctorat de ce candidat que la transglutaminase a commencé à être facilement obtenue par expression bactérienne. Ceci a permis à ce candidat de monter le projet de cristallisation (chapitre 6), avec l'aide de quelques étudiants d'été et collègues, incluant Dany Halim (M. Sc. en cours) et Nicolas Chabot (Étudiant Post-Doctoral). Ce projet est toujours en cours.

En parallèle à tous ces projets, la synthèse et l'évaluation des dérivés sulfoxyde et sulfone (chapitre 4) ont été effectuées entièrement par ce candidat. Une publication à cet effet est d'ailleurs en préparation. L'application de la fonction sulfoxyde comme pharmacophore a également été testée avec la GGT (γ -glutamyltranspeptidase) par un autre membre du groupe, Christian Lherbet (Ph. D. 2004). Ce candidat a été deuxième auteur dans une publication des Dr. Lherbet et Keillor, ayant participé à la détermination cristallographique de la configuration absolue d'un énantiomère actif y étant rapporté.

Maintenant, d'un point de vue plus pratique, une liste sommaire des projets encore incomplets et des projets qu'il serait bon d'initier peut être faite. Tout d'abord, l'obtention de l'enzyme humaine recombinante et à sa cristallisation, avec et sans inhibiteur irréversible (tel que le carbonate **2** ou le thiocarbonate **3**) de même qu'avec et sans inhibiteur réversible semblent être des projets évidents. Ceci donnerait pour la première fois une image réelle de l'acyle enzyme et de la liaison du substrat donneur.

On peut aussi penser à quelques expériences par spectrométrie de masse pouvant aider à mieux définir le mode d'inhibition utilisé par les dérivés sulfoxydes. Certains de ces inhibiteurs pourraient aussi être testés *in vivo*, sur des cellules modèles, ou co-cristallisés avec l'enzyme pour obtenir un premier modèle de l'intermédiaire tétraédrique. Il est bon de noter que l'utilisation de sulfoxydes de cette façon serait tout à fait nouvelle.

Il serait également intéressant d'utiliser l'ITC pour mesurer les chaleurs de liaison des inhibiteurs réversibles de haute affinité sur lesquels travaille actuellement Christophe Pardin (Ph. D. en cours).

Finalement, grâce à la comparaison des séquences de diverses transglutaminases effectuée par ce candidat, plusieurs nouvelles questions surgissent lorsqu'on en vient à tenter d'associer structure protéique et fonction protéique. Certaines zones de la protéine sont parfaitement conservées chez toutes les transglutaminases mais n'ont toujours pas de fonction claire. Même le site de liaison du substrat accepteur n'est pas connu. Des travaux de modélisations et l'obtention d'une structure cristalline sauront sans doute répondre à ces interrogations.

Il reste donc plusieurs histoires pour lesquelles les fins ne sont pas connues. Heureusement, les projets n'ayant pas abouti sont entre bonnes mains et ce candidat a hâte au jour où ses successeurs trouveront réponses aux questions soulevées dans cet ouvrage.

Annexe 1: Conditions de cristallisation

Note: Le code numérique utilisé est décrit dans le Chapitre 6: Cristallisation de la TGase

Criblages commerciaux: 12 mg/mL transglutaminase, 0,3 mM CaCl₂, MOPS 10 mM pH 7,0

#Condition	CSI	CSII	WI	WII	
1	x	x	3	5	10% PEG 3000, 0,1M Acétate pH4.5, 0,2M Zn(OAc) ₂
2	x	x	1	1	
3	x	1	1	3	
4	x	2	3	3	
5	1	x	1	1	
6	x	1	x	3	
7	3	1	3	x	
8	x	1	3	x	
9	x	x	1	x	
10	x	x	x	x	
11	x	x	1	x	
12	x	x	x	x	
13	1	x	3	3	
14	x	x		x	
15	x	3	3	3	
16	3	3	3	3	
17	3	1	x	3	
18	x	x	3	x	
19	3	1	3	3	
20	x	1	3	x	
21	x	1	1	x	
22	x	x	1	1	
23	x	x	3	x	
24	x	1	3	x	
25	1	x	5	2	30% PEG 400, 0.1M Tris pH8.5, 0.2 M MgCl ₂
26	1	x	x	1	
27	2	x	3	x	
28	x	x	2	x	
29	1		3	3	
30	x	1		x	
31	x	1	x	3	
32	3	3	1	1	
33	3	1	3	3	
34	3	x	3		
35	x	x	x	x	
36	x	3	x	2	
37	x	1	1	1	
38	3	1	3	x	
39	3	4	x	3	3,4M 1,6-Hexanediol, 0,1 M Tris pH8.5, 0,2M MgCl ₂
40	3	1		3	
41	3	3	1	x	
42	x	3	1	3	
43	1	5	1	x	50% MPD, 0,1 M Tris pH8.5, 0.2 M Ammonium phosphate
44	2	1	x	x	
45	5	x	x	1	18% PEG 8000, 0,1 M Cacodylate pH6.5, 0,2M Zn(OAc) ₂
46	x	1	x	3	
47	3	1	3	x	
48	x	3	x	3	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M HEPES pH6,5

08-juin-04		PEG 400 (%)					
MgCl ₂ (M)	10	15	20	25	30	35	
0	1	1	1	1	1	1	
0,1	x	x	x	x	x	x	
0,2	x	x	x	x	x	x	
0,3	3	x	x	x	x	x	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 3,91M 1,6Hxdiol

16-juin-04		MgCl ₂ (mM)					
PEG400%	75	100	125	150	175	200	
0	5	3	3	5	3	5	
2,5	3	5	3	5	3	-	
5	3	3	1	3	-	-	
7,5	5	5	3	-	-	-	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M HEPES pH7,0

08-juin-04		PEG 400 (%)					
MgCl ₂ (M)	10	15	20	25	30	35	
0	1	1	1	1	1	1	
0,1	3	x	x	x	x	x	
0,2	3	x	x	x	x	x	
0,3	3	3	3	x	x	x	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 5%PEG400

16-juin-04		1,6-Hxdiol (M)					
MgCl ₂ (M)	1,35	1,49	1,62	1,76	1,89	2,03	
0,088	5	5	5	5	5	5	
0,132	5	5	5	5	5	5	
0,178	5	5	5	5	5	5	
0,22	5	5	5	5	5	5	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M HEPES pH7,5

08-juin-04		PEG 400 (%)					
MgCl ₂ (M)	10	15	20	25	30	35	
0	1	1	1	1	1	1	
0,1	3	3	3	x	x	x	
0,2	3	3	3	3	x	x	
0,3	3	3	3	3	3	3	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5

16-juin-04		1,6-Hxdiol (M)					
MgCl ₂ (M)	0	0,5	1	1,5	2	2,55	
0,1	3	3	3	3	3	3	
0,15	3	3	3	3	3	3	
0,2	3	3	3	3	3	3	
0,25	3	3	3	3	3	3	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M HEPES pH8,0

08-juin-04		PEG 400 (%)					
MgCl ₂ (M)	10	15	20	25	30	35	
0	1	1	1	1	1	1	
0,1	3	3	3	x	x	x	
0,2	3	3	3	3	x	x	
0,3	3	3	3	3	3	x	

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5

16-juin-04		1,6-Hxdiol (M)					
MgCl ₂ (M)	0	0,5	1	1,5	2	2,55	
0,1	3	3	3	3	3	3	
0,15	3	3	3	3	3	3	
0,2	3	3	3	3	3	3	
0,25	3	3	3	3	3	3	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M CHES pH8,5

08-juin-04		PEG 400 (%)					
MgCl ₂ (M)	10	15	20	25	30	35	
0	1	1	1	1	1	1	
0,1	3	3	x	x	x	x	
0,2	3	3	3	x	x	x	
0,3	3	3	3	3	x	5	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 150mM MgCl₂, 3,4M 1,6Hxdiol

23-juin-04		PEG400(%)		
	0	3	5	
0	5	3	3	
2	3	5	5	
4	3	3	3	
6	3	3	5	
8	3	3	3	
10	3	5	3	
12	6	5	6	
14	5	6	6	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M CHES pH9,0

08-juin-04		PEG 400 (%)					
MgCl ₂ (M)	10	15	20	25	30	35	
0	1	1	1	1	1	1	
0,1	3	5	5	5	5	x	
0,2	3	3	5	3	x	x	
0,3	3	5	3	3	3	3	

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5, 3,4 M 1,6Hxdiol

29-juin-04

PEG1000(%)	MgCl ₂ (mM)													
	200	200	180	180	160	160	150	150	140	140	120	120	100	100
0	1	1	1	1	5	5	5	5	5	1	5	5	1	5
0,15	1	5	5	5	5	5	5	5	5	1	5	5	5	6
0,3	3	3	5	1	1	5	5	5	5	5	1	1	5	1
0,6	3	5	1	5	1	5	5	5	5	5	5	5	5	1
0,9	3	5	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,2	5	5	1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,5	3	5	1	5	5	1	5	5	1	5	1	1	5	1
1,8	3	3	1	5	1	1	5	5	5	1	3	5	5	3
2,1	3	5	1	1	1	1	5	3	1	5	3	5	3	5
2,4	3	3	5	3	1	1	5	3	1	5	5	1	1	3
2,7	3	3	1	1	1	1	3	3	5	1	5	5	3	5
3	3	5	1	1	1	1	3	3	5	5	1	1	3	1

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M 1,6Hxdiol

06-juil-04

Ensemencement gauche à droite

MgCl ₂ (mM)	7	5	7	7	1	1
150	7	5	7	7	1	1
155	7	7	1	6	7	1
160	7	7	7	7	5	5
165	7	7	7	7	7	7

15 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M Hxdiol

13-juil-04

Ensemencement gauche à droite

MgCl ₂ (mM)	6	8	6	1	6	1
150	6	8	6	1	6	1
155	7	6	6	6	6	6
160	7	7	7	7	7	7
165	6	6	7	7	7	6

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5

06-juil-04

1,6Hxdiol(M)

MgCl ₂ (mM)	3	3,3	3,6	3,9	4,2	4,35
150	5	5	1	5	1	1
155	5	5	1	1	1	1
160	1	5	5	1	1	1
165	1	1	5	5	1	1

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M Hxdiol

13-juil-04

Ensemencement gauche à droite

MgCl ₂ (mM)	6	6	6	6	6	6
150	6	6	6	6	6	6
155	6	6	6	6	6	6
160	6	6	6	1	6	6
165	6	6	6	6	6	6

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M Hxdiol, 10% Ethyleneglycol

13-juil-04

Ensemencement gauche à droite

MgCl ₂ (mM)	7	9	7	7	7	7
150	7	9	7	7	7	7
155	7	7	7	7	7	7
160	9	7	9	7	7	7
165	7	7	7	7	7	7

9 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M Hxdiol

13-juil-04

Ensemencement gauche à droite

MgCl ₂ (mM)	6	6	6	6	6	6
150	6	6	6	6	6	6
155	6	6	6	7	6	6
160	6	6	6	6	6	6
165	6	6	6	6	6	6

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M Hxdiol, 10% Ethyleneglycol

13-juil-04

Ensemencement gauche à droite

MgCl ₂ (mM)	7	7	7	7	7	7
150	7	7	7	7	7	7
155	7	7	7	7	7	7
160	7	7	7	7	7	7
165	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0

0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M Hxdiol

13-juil-04

Ensemencement gauche à droite

MgCl ₂ (mM)	7	7	5	6	6	6
150	7	7	5	6	6	6
155	6	6	6	6	6	6
160	7	6	6	6	6	6
165	6	6	6	6	7	6

15 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 3M 1,6Hxdiol, 150M MgCl₂

20-juil-04 Ensemencement gauche à droite

Ethylenglycol(%)

10	7	6	7	7	7	7
15	7	7	7	7	7	7
20	7	7	3	3	3	3
25	6	6	1	1	1	7

15 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 3M 1,6Hxdiol, 100M MgCl₂

20-juil-04 Ensemencement gauche à droite

Ethylenglycol(%)

10	6	3	3	3	3	3
15	7	3	3	3	3	7
20	7	7	7	7	7	7
25	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 3M 1,6Hxdiol, 150M MgCl₂

20-juil-04 Ensemencement gauche à droite

Glycerol(%)

10	6	6	6	6	6	6
15	6	6	6	6	6	6
20	6	7	7	7	1	7
25	7	1	1	1	1	1

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 3M 1,6Hxdiol, 100M MgCl₂

20-juil-04 Ensemencement gauche à droite

Glycerol(%)

10	6	6	6	6	6	6
15	6	6	6	6	6	6
20	6	6	6	6	6	6
25	1	1	1	1	1	1

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M 1,6Hxdiol, 150M MgCl₂

20-juil-04 Ensemencement gauche à droite

Huile sur puit

200uL Silicon	6	6	6	6	6	6
200uL Al's oil	6	6	6	6	6	6
200uL Paraffin	6	6	6	6	6	6
500uL Al's oil	6	6	6	6	6	6

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M 1,6Hxdiol

04-août-04

Ensemencement gauche à droite

NaCl(mM)

40	6	3	3	3	3	3
80	6	1	1	1	1	1
120	1	1	1	1	1	1
160	7	1	1	1	1	1
200	3	1	1	1	1	1
240	7	1	1	1	1	1
280	1	1	1	1	1	1
320	9	1	9	1	1	1

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 3,6M 1,6Hxdiol, 50 mM MgCl₂

04-août-04

Ensemencement gauche à droite

NaCl(mM)

80	7	7	7	7	7	7
160	6	7	7	7	7	7
240	7	7	7	7	7	7
320	7	7	7	7	7	7

12 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 150 mM MgCl₂, 100 mM KCl

04-août-04

Ensemencement gauche à droite

1,6Hxdiol(M)

1,2	7	7	7	7	7	7
1,8	7	7	7	7	7	7
2,4	7	7	7	7	7	7
3	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5

10-août-04

3,5M MPD

Salt(mM)

MgCl₂ NaCl KCl

0	x	3	1
25	7	8	1
50	7	1	1
75	6	7	1
100	6	5	1
125	6	5	1
150	6	1	1
175	6	1	1

0,1 M MOPS pH8,5

10-août-04

3,5M MPD

3,6M 1,6Hxdiol

Salt(mM)

MgCl₂ NaCl KCl MgCl₂ NaCl KCl

0	3	1	1	1	1	1
25	8	1	5	7	1	1
50	8	8	5	7	1	1
75	1	8	1	7	1	1
100	8	3	8	7	1	1
125	5	3	7	6	5	1
150	8	1	5	7	1	5
175	8	1	5	7	1	1

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MOPS pH8,5

17-août-04

Ensemencement gauche a droite

50% MPD	25mM MgCl ₂	7	7	7	7	7	8
		7	8	8	8	8	8
50% MPD	175mM MgCl ₂	8	8	8	8	8	8
		8	8	8	8	8	8
50% MPD	75mM NaCl	7	7	7	7	7	7
		7	7	7	7	7	7
50% MPD	3,6M 1,6Hxdiol	7	7	7	7	7	7
		7	7	7	7	7	7
50% MPD	25mM MgCl ₂	8	1	7	8	7	1
		6	5	1	1	1	7
3,6M 1,6Hxdiol	100mM MgCl ₂	1	5	1	1	1	1
		1	1	1	1	7	1
3,6M 1,6Hxdiol	320mM NaCl	7	5	8	8	7	7
		7	7	7	7	7	7
3,6M 1,6Hxdiol	25mM MgCl ₂	7	7	7	7	7	7
		7	7	7	7	7	7
3,6M 1,6Hxdiol	100mM MgCl ₂	7	7	7	7	7	7
		7	7	7	6	6	7
3,6M 1,6Hxdiol	320mM NaCl	7	7	7	1	1	7
		1	5	8	1	x	1
3,6M 1,6Hxdiol	25mM MgCl ₂	1	1	1	7	6	1
		5	x	1	5	8	1
3,6M 1,6Hxdiol	100mM MgCl ₂	1	1	1	1	1	1
		1	1	1	1	1	1

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5

15-sept-04

MgCl₂(mM)

	0	25	50	100	150	200
50% MPD	1	6	6	6	6	6
50% MPD	1	6	6	6	6	6
50% MPD	1	6	6	6	6	6
50% MPD	1	6	6	6	6	6
9% Sucrose	1	7	7	7	7	7
13,5% Sucrose	1	7	7	7	7	7
18% Sucrose	1	7	7	7	7	7
22,5% Sucrose	1	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MOPS pH8,5, 25mM MgCl₂, 50% MPD

15-sept-04

1,5% Sucrose	6	6	6	6	6	6
3% Sucrose	6	6	6	6	6	6
4,5% Sucrose	6	6	6	6	6	6
6% Sucrose	6	6	6	6	6	6

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5

21-sept-04

MgCl₂(mM)

Sucrose (%)	4	8	12	16	20	24
0	1	1	1	7	1	7
18	1	1	1	1	1	1
30	1	1	6	9	1	1
48	1	1	1	1	1	1

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 25mM MgCl₂

21-sept-04

MPD (%)

	20	30	40	50	60	70
	9	9	8	7	7	7
	9	9	8	7	7	6
	9	9	8	7	7	6
	9	9	8	7	7	6

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5, 120mM MgCl₂, 40% MPD

21-sept-04

	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M TRIS pH8,5

23-sept-04

MPD(%)

MgCl ₂ (mM)	0	5	10	15	20	25
10	7	7	7	7	7	7
20	7	7	7	7	7	7
30	7	7	7	7	7	7
40	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MES pH6,0

28-sept-04		PEG6000(%)					
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	0	1	2	3	4	5	
0	3	3	3	3	3	3	
0,35	1	1	1	1	3	3	
0,7	1	3	3	3	3	3	
1,05	3	3	3	3	3	3	

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH8,5

30-sept-04		PEG8000(%)					
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	
0	6	1	7	5	1	6	
0,35	6	1	1	6	3	3	
0,7	6	3	3	3	3	3	
1,05	3	3	3	3	3	3	

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH8,5

28-sept-04		PEG20000(%)					
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	
0	3	3	3	3	3	3	
0,35	1	1	3	3	3	3	
0,7	1	1	1	1	3	3	
1,05	1	1	1	1	3	3	

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH7,0

30-sept-04		PEG4000(%)					
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	
0	1	3	3	3	3	3	
0,35	1	1	1	3	3	3	
0,7	3	3	3	3	3	3	
1,05	3	3	3	3	3	3	

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M HEPES pH7,0

28-sept-04		PEG6000(%)										
(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	0	1	2	3	4	5	6,25	7,5	8,75	10	11,3	12,5
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3
0,7	1	1	1	6	1	3	1	1	3	3	3	3
1,05	3	1	3	3	3	3	1	3	1	3	3	3

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M HEPES pH7,0

30-sept-04		PEG6000(%)					
NH ₄ OAc(M)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	
0	1	1	1	1	1	1	
0,35	1	1	3	3	3	3	
0,7	3	3	3	3	3	3	
1,05	3	3	3	3	x	x	

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MES pH6,0

30-sept-04		PEG20000(%)					
NH ₄ OAc(M)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	
0	3	3	3	1	1	1	
0,35	3	3	3	3	3	3	
0,7	3	3	3	3	3	3	
1,05	3	3	3	3	3	3	

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH8,5

30-sept-04		PEG8000(%)					
NH ₄ OAc(M)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	
0	6	1	1	1	1	1	
0,35	1	6	3	3	3	3	
0,7	6	3	3	3	3	3	
1,05	3	3	3	x	x	x	

6 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH7,0

30-sept-04		PEG4000(%)					
NH ₄ OAc(M)	0	2,5	5	7,5	10	12,5	
0	1	1	1	1	1	1	
0,35	1	6	3	3	3	3	
0,7	7	3	3	3	3	3	
1,05	3	3	3	3	3	3	

3 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH8,5

07-oct-04		MPD(%)					
MgCl ₂ (mM)	0	4	8	12	16	20	
15	5	1	1	1	1	3	
20	1	1	1	1	3	3	
25	1	1	1	1	3	3	
30	1	1	1	1	3	3	

3 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH8,5

07-oct-04		MPD(%)					
NaCl(mM)	0	4	8	12	16	20	
65	1	1	3	3	3	3	
70	1	1	3	3	3	3	
75	1	1	3	3	3	3	
80	1	7	7	1	3	3	

5 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH8,5

31-oct-04

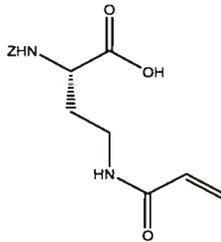
MgCl ₂ (mM)	MPD(%)											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
10	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3
20	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
30	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
40	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
50	3	3	3	3	3	3						
100	3	3	3	3	3	3						
150	3	3	3	3	3	3						
200	3	3	3	3	3	3						
250	3	3	3	3	3	3						
300	3	3	3	3	3	3						
350	3	3	3	3	3	3						
400	3	3	3	3	3	3						

5 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH8,5, 25 mM MgCl₂

06-nov-04

RatioProt/prec	MPD(%)					
	5	10	15	20	25	30
1:1	1	1	1	3	3	3
1:2	1	1	1	3	3	3
1:3	1	1	3	3	3	3
1:4	1	1	3	3	3	3

Début de l'utilisation de l'inhibiteur comme co-cristallisant, toujours à une concentration de 2mg/mL, dans la goutte protéique.



5 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M Tris pH8,5, 25 mM MgCl₂, 7mg/mL Inhibiteur

06-nov-04

RatioProt/prec	MPD(%)					
	5	10	15	20	25	30
1:1	x	x	x	x	x	x
1:2	x	x	x	x	x	x
1:3	x	x	x	x	x	x
1:4	x	x	x	x	x	x

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
0,2 M Ca(OAc)₂, 30%PEG400

25-janv-05

Réplicats	pH(Acétate)		pH (Cacodylate)			
	3,9	4,5	5	5,5	6	6,5
	7	x	x	x	x	x
	7	7	x	x	x	x
	x	x	x	x	x	x
	7	7	x	x	x	x

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
0,2 M Ca(OAc)₂, 0,1 M Acétate pH4,5

25-janv-05

Réplicats	PEG400(%)					
	5	10	15	20	25	30
	x	5	5	5	7	7
	x	5	5	5	x	7
	x	5	6	5	6	7
	x	5	5	5	6	7

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
0,1M Acétate pH3,9, 25%PEG400

01-févr-05

Réplicats	Zn(OAc) ₂ (mM)					
	50	100	150	200	250	300
	9	9	5	5	5	5
	9	9	5	5	5	5
	9	9	5	5	5	5
	9	9	5	5	5	5

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
0,2 M Zn(OAc)₂, 25%PEG400

25-janv-05

Réplicats	Citrate 0,1M (pH)					
	2,55	3,1	3,6	4,13	4,35	3,92
	x	x	x	x	x	x
	x	x	x	x	x	x
	x	x	x	x	8	x
	x	x	x	x	x	x

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
0,1M Acétate pH3,9, 25%PEG400

01-févr-05

Réplicats	Ca(OAc) ₂ (mM)					
	50	100	150	200	250	300
	x	x	x	5	5	5
	x	x	x	x	x	5
	x	x	x	x	x	5
	x	x	x	x	5	5

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
0,2 M Zn(OAc)₂, 25%PEG400

08-févr-05

Réplicats	Acétate 0,1M (pH)					
	3,38	3,77	3,96	4,13	4,5	4,69
	5	5	5	5	5	8
	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5
	5	5	5	5	5	5

Criblages commerciaux: 10 mg/mL transglutaminase, 0,3 mM CaCl₂, MOPS 10 mM pH 7,0, 2mg/mL inhibiteur irréversible

#Condition	CSI	CSII	WI	WII	
1	x	x	1	x	
2	3	x	3	x	
3	5	1	1	x	0,4M Ammonium Phosphate
4	x	1	x	x	
5	3	x	1	3	
6	x	3	x	x	
7	x	x	2	x	
8	x	x	x	x	
9	x	3	3	x	
10	x	x	3	3	
11	x	x	x	5	10%2propanol, 0,1M Cacodylate pH6,5, 0,2M Zn(OAc) ₂
12	x	x	x	x	
13	3	x	x	3	
14	x	x	x	3	
15	x	x	3	x	
16	x	x	x	x	
17	x	x	2	x	
18	x	1	3	x	
19	x	1	x	x	
20	x	x	x	x	
21	x	3	1	x	
22	x	x	1	1	
23	x	x	x	x	
24	x	3	3	x	
25	x	3	x	3	
26	x	x	1	1	
27	3	x	x	x	
28	x	x	3	x	
29	x	3	3	x	
30	x	x	x	x	
31	x	1	x	x	
32	x	x	1	1	
33	x	x	x	3	
34	x	x	3	1	
35	x	x	x	x	
36	1	x	x	x	
37	x	3	3	x	
38	x	1	3	x	
39	x	x	x	3	
40	x	1	5	3	10%2propanol, 0,1M MES pH6,0, 0,2M Ca(OAc) ₂
41	3	x	1	x	
42	x	x	3	3	
43	x	x	3	x	
44	x	1	7	x	30%PEG400, 0,1M Acétate pH4,5, 0,2M Ca(OAc) ₂
45	5	x	x	x	18%PEG8000, 0,1M NaCacodylate pH6,5, 0,2M Zn(OAc) ₂
46	x	3	x	x	
47	x	x	x	x	
48	x	x	5	x	30%PEG1000, 0,1M Acétate pH4,5, 0,2M Zn(OAc) ₂

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
 0,1M Acétate pH4,13, Ca(OAc)₂ 50 mM

08-févr-05 PEG400(%)

	25	30	35	40	45	50
Réplicats	x	x	8	8	7	x
	x	x	8	x	7	x
	x	x	8	8	7	7
	x	x	8	7	7	7

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
 0,1M Acétate pH3,9, 25%PEG400

08-févr-05 Zn(OAc)₂(mM)

	0	10	20	30	40	50
Réplicats	x	x	x	x	8	8
	x	x	x	x	8	8
	x	x	x	x	8	8
	x	x	x	5	9	8

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
 0,1M Acétate pH3,9, 25%PEG400

08-févr-05 Ca(OAc)₂(mM)

	0	10	20	30	40	50
Réplicats	x	x	x	x	x	x
	x	x	x	x	x	x
	x	x	x	x	x	x
	x	x	x	x	x	x

10 mg/mL TGase, 0,3 mM CaCl₂, 10 mM MOPS pH7,0, 2mg/mL Inh
 0,1M Acétate pH4,0, 35%PEG400

15-févr-05 Zn(OAc)₂(mM)

	40	42	44	46	48	50
Réplicats	7	7	x	7	7	7
	7	7	x	x	7	7
	x	7	7	7	7	x
	x	5	7	5	7	5

Criblages commerciaux: 12 mg/mL transglutaminase, 0,3 mM CaCl₂, MOPS 10 mM pH 7,0, 2 mg/ml inhibiteur

#Condition	SM	CS	MPD	PEG
1	1	X	X	
2	1	1	X	
3	X	3	7	0,2M Ammonium fluoride, 40% MPD
4	X	3	6	0,2M Lithium chloride, 40% MPD
5	3	3	X	
6	3	3	X	
7	3	X	X	
8	X	3	X	
9	3	3	X	
10	3	X	X	
11	3	X	X	
12	3	3	X	
13	3	1	X	
14	3	1	X	
15	3	X	X	
16	X	X	X	
17	1	3	3	
18	3	X	X	
19	X	1	3	
20	X	1	2	
21	3	3	3	
22	3	X	3	
23	3	2	6	0,2M Ammonium formate, 40% MPD
24	3	X	3	
25	3	X	X	
26	3	X	X	
27	3	X	X	
28	X	1	6	0,2M Calcium Acétate, 40% MPD
29	1	X	X	
30	3	3	X	
31	3	3	1	
32	3	3	X	
33	1	X	X	
34	1	3	2	
35	3	1	X	
36	1	1	1	
37	3	3	1	
38	X	3	3	
39	3	X	X	
40	3	3	X	
41	X	X	X	
42	1	1	1	
43	1	3	X	
44	X	X	1	
45	X	X	1	
46	3	X	1	
47	3	X	1	
48	1	X	X	

Criblages commerciaux: 12 mg/mL transglutaminase, 0,3 mM CaCl₂, MOPS 10 mM pH 7,0, 2 mg/ml inhibiteur

#Condition	SM	CS	MPD	PEG	
49	X	3	6	X	0,1M Citric acid pH4
50	3	3	3	X	
51	5	1	6	X	0,1M MES pH6, 10% MPD
52	X	1	1	X	
53	X	3	1	X	
54	3	3	1	X	
55	1	1	3	X	
56	X	1	3	X	
57	3	3	3	X	
58	X	3	1	X	
59	X	3	5	X	0,1M Tris pH8 20% MPD
60	3	1	1	X	
61	X	3	3	X	
62	X	3	3	X	
63	3	3	3	1	
64	3	3	6	X	0,1M HEPES pH 7 40% MPD
65	X	X	3	X	
66	X	5	6	1	0,1M Bicine pH9 40% MPD
67	5	X	3	X	
68	X	X	3	X	
69	1	3	3	X	
70	3	X	3	X	
71	1	X	3	X	
72	X	X	3	X	
73	X	3	1	X	
74	X	X	1	X	
75	1	X	X	1	
76	X	X	3	X	
77	3	1	3	X	
78	3	3	X	X	
79	X	X	1	X	
80	3	1	1	X	
81	X	1	3	X	
82	3	X	1	X	
83	3	X	X	X	
84	X	X	6	X	0,2 M Ammonium Acétate, 0,1 M tri-Sodium citrate pH 5,6, 30% MPD
85	3	X	6	X	0,2 M Magnesium Acétate, 0,1 M MES sodium salt pH 6,5, 30% MPD
86	1	1	1	X	
87	1	X	1	X	
88	3	X-8	3	3	0,2 M MgCl ₂ hexahydrate Tris HCl pH 8,5 30% m/v PEG 4000
89	X	3	X	X	
90	3	X	5	3	30 % MDP, 20% Ethanol
91	3	X	1	X	
92	3	X	3	3	
93	3	3	1	X	
94	3	3	X	X	
95	3	1	6	3	0,1M Hepes sodium salt pH 7,5 47% (m/v) MPD, 2% (m/v) tert-Butanol
96	3	X	1	X	

Criblage comercial: 6mg/ml de Transglutaminase Tris Acétate 25 mM pH7, 2mg/ml inhibiteur

#Condition	MbClass	#Condition	MbClass	
1	1	49	3	
2	3	50	1	
3	8	51	1	0,2M CaCl2, 0,1M Sodium Acétate pH 4,6, 30% Isopropanol, 20% Glycérol
4	1	52	3	
5	1	53	3	
6	1	54	3	
7	1	55	1	
8	1	56	1	
9	3	57	2	
10	X	58	1	
11	1	59	1	
12	1	60	1	
13	1	61	1	
14	1	62	1	
15	1	63	3	
16	1	64	1	
17	1	65	1	
18	1	66	1	
19	3	67	1	
20	3	68	1	
21	1	69	1	
22	1	70	3	
23	1	71	1	
24	1	72	3	
25	3	73	3	
26	1	74	5	0,15M ZnOAc, 0,05M ZnCl2, 0,05M Tris.HCl pH7,5, 20% PEG 4000
27	1	75	1	
28	1	76	3	
29	1	77	3	
30	1	78	3	
31	X	79	3	
32	3	80	5	0,15M Zinc Acétate, 0,05M Zinc Chloride, 0,05M Tris.HCl pH7,5, 10% PEG 6000
33	1	81	1	
34	3	82	1	
35	1	83	1	
36	3	84	1	
37	1	85	3	
38	X	86	1	
39	3	87	1	
40	7	88	1	0,1M Magnesium chloride, 0,05M Tris HCl pH8,5, 30% PEG 550 MME
41	3	89	1	
42	1	90	1	
43	3	91	1	
44	1	92	X	
45	1	93	1	
46	1	94	1	
47	3	95	3	
48	3	96	3	

12 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl2 1 mM, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MES pH6, 10% PEG-8000

07-juin-05 Zn(OAc)2 (mM)

	50	100	150	200	250	300
E	x	5	5	5	5	5
E + Ca2+	x	5	5	5	5	5
E + Ca2+ + I	5	x	5	5	5	5
Ca2+ + I	1	1	1	1	1	1

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl2 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M HEPES pH7, 25% MPD

29-juin-05 Ammonium formate 2M (µl)

	0	50	100	200	400	650
E	3	3	3	3	3	3
E + Ca2+	3	3	3	3	3	1
E + Ca2+ + I	3	3	3	3	3	1
Ca2+ + I	3	3	3	3	3	1

12 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl2 1 mM, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MES pH6, 0,2M Zn(OAc)2

07-juin-05 PEG-8000 (%)

	2,5	5	7,5	10	12,5	15
E	5	5	5	5	5	5
E + Ca2+	5	5	5	5	5	5
E + Ca2+ + I	5	5	5	5	5	5
Ca2+ + I	1	1	1	1	1	1

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl2 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M HEPES pH7, 25% MPD

29-juin-05 Ammonium sulfate 2M (µl)

	0	50	100	200	400	650
E	3	3	3	3	3	2
E + Ca2+	3	3	3	3	3	X
E + Ca2+ + I	3	3	3	3	3	X
Ca2+ + I	3	3	3	1	1	X

12 mg/mL TGase, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MES pH6

07-juin-05 CaCl2 (mM)

	0	5	10	15	20	25
E	4	x	x	x	x	4
E + Ca2+	x	x	x	x	x	4
E + Ca2+ + I	x	x	x	x	x	4
Ca2+ + I	4	x	x	x	x	4

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl2 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M HEPES pH7, 25% MPD

29-juin-05 Ammonium Acétate 2M (µl)

	0	50	100	200	400	650
E	3	3	3	3	3	3
E + Ca2+	3	3	7	3	3	6
E + Ca2+ + I	3	3	3	3	3	3
Ca2+ + I	1	3	3	3	3	3

12 mg/mL TGase, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MES pH6, 20% PEG-8000

07-juin-05 CaCl2 (mM)

	0	5	10	15	20	25
E	x	x	x	x	x	x
E + Ca2+	x	x	x	x	x	x
E + Ca2+ + I	x	x	x	x	x	x
Ca2+ + I	x	x	x	x	x	x

12 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl2 1 mM, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MES pH6

07-juin-05 CaCl2 (mM)

	0	5	10	15	20	25
E	4	3	x	x	x	x
E + Ca2+	4	3	3	3	x	x
E + Ca2+ + I	4	3	x	x	x	x
Ca2+ + I	4	3	x	x	x	x

12 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl2 1 mM, 10 mM MOPS pH7,0
0,1 M MES pH6, 20% PEG-8000

07-juin-05 CaCl2 (mM)

	0	5	10	15	20	25
E	x	x	x	x	x	x
E + Ca2+	x	x	x	x	x	x
E + Ca2+ + I	x	x	x	x	x	x
Ca2+ + I	x	x	x	x	x	x

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl₂ 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M HEPES pH7, 10% MPD

		04-juil-05 Ammonium Acétate 2M (µl)					
		100	150	250	300	350	400
E		3	3	3	3	3	3
E		3	3	6	3	3	3
E/2		3	3	3	6	3	3
E/2		3	3	3	6	3	3

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl₂ 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M Tris HCl pH8,5, 30% PEG 4000

		07-juil-05 MgCl ₂ 1M (µl)					
		50	100	150	200	250	300
E		X	X	5	X	X	X
E		X	X	X	X	X	X
E		X	X	X	X	X	X
Pas d'E		1	6	1	1	7	1

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl₂ 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M HEPES pH7, 20% MPD

		04-juil-05 Ammonium Acétate 2M (µl)					
		100	150	250	300	350	400
E		3	3	3	3	3	3
E		3	3	3	3	3	3
E/2		3	3	3	3	3	3
E/2		3	6	6	6	3	3

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl₂ 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M Tris HCl pH8,5, 0,2M MgCl₂

		07-juil-05 PEG-4000 50% (µl)					
		50	100	150	200	250	300
E		X	X	X	X	X	X
E		X	X	X	X	X	X
E		X	X	X	X	X	X
Pas d'E		1	7	1	1	1	5

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl₂ 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M HEPES pH7, 30% MPD

		04-juil-05 Ammonium Acétate 2M (µl)					
		100	150	250	300	350	400
E		3	3	3	3	3	3
E		3	3	3	3	3	3
E/2		3	3	3	3	3	3
E/2		3	3	3	3	3	3

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl₂ 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M Tris HCl pH8,5, 0,2M MgCl₂, 30% PEG-4000

		07-juil-05 TGase (mg/ml)					
		0	2	4	6	8	10
		6	3	3	3	X	X
		6	3	3	3	X	X
		3	3	3	3	X	X
		1	3	3	3	3	X

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl₂ 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M HEPES pH7, 40% MPD

		04-juil-05 Ammonium Acétate 2M (µl)					
		100	150	250	300	350	400
E		3	3	3	3	3	3
E		3	3	3	3	3	3
E/2		3	3	3	3	3	3
E/2		3	3	3	3	3	3

10 mg/mL TGase, 0,128 mM Inhibiteur, CaCl₂ 1 mM, 25 mM Tris Acétate pH7,0
0,1 M HEPES pH7, 50% MPD

		04-juil-05 Ammonium Acétate 2M (µl)					
		100	150	250	300	350	400
E		3	3	3	3	3	3
E		3	3	3	3	3	3
E/2		3	3	3	3	3	3
E/2		X	X	3	3	3	1

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4, 20% Glycérol

22-juil-05		CaCl2 (mM)					
2-Propanol(%)	50	100	150	200	250	300	
10	3	3	3	3	5	3	
20	5	5	5	7	7	3	
30	8	7	3	3	8	7	
40	3	7	7	7	3	3	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH5, 20% Glycérol

29-juil-05		Glycérol(%)					
CaCl2 (mM)	10	12	14	16	18	20	
25	5	7	7	7	7	7	
50	7	7	7	7	7	7	
100	7	7	7	7	7	7	
150	7	7	7	7	7	7	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7,5
0,1 M NaOAc pH4,5, 20% Glycérol

22-juil-05		CaCl2 (mM)					
2-Propanol(%)	50	100	150	200	250	300	
10	3	5	5	5	5	5	
20	8	8	8	3	8	5	
30	8	8	5	3	5	3	
40	3	3	5	5	5	5	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7,5
0,1 M NaOAc pH5,5, 20% Glycérol

29-juil-05		Glycérol(%)					
CaCl2 (mM)	10	12	14	16	18	20	
25	7	7	7	7	4	7	
50	3	3	3	3	3	3	
100	3	3	7	3	3	7	
150	7	7	7	7	7	7	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH5, 20% Glycérol

22-juil-05		CaCl2 (mM)					
2-Propanol(%)	50	100	150	200	250	300	
10	3	5	5	3	5	5	
20	3	3	3	3	3	8	
30	9	8	8	3	7	3	
40	3	3	3	3	3	3	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH6, 20% Glycérol

29-juil-05		Glycérol(%)					
CaCl2 (mM)	10	12	14	16	18	20	
25	7	7	7	7	7	7	
50	3	3	3	3	3	3	
100	5	3	3	3	3	3	
150	7	3	3	3	3	3	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc Ph7
0,1 M NaOAc pH4, 30% 2-Propanol

22-juil-05		CaCl2 (mM)					
Glycerol(%)	50	100	150	200	250	300	
5	3	7	7	3	3	7	
10	7	7	7	7	7	3	
20	8	7	7	7	7	3	
30	7	8	7	8	3	5	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc Ph7
0,1 M NaOAc Ph6,5, 30% 2-Propanol

29-juil-05		Glycerol(%)					
CaCl2 (mM)	10	12	14	16	18	20	
25	3	3	3	3	3	3	
50	3	3	3	3	3	3	
100	3	3	3	3	3	3	
150	3	3	3	3	3	3	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc Ph7
0,1 M NaOAc pH4,5, 30% 2-Propanol

22-juil-05		CaCl2 (mM)					
Glycerol(%)	50	100	150	200	250	300	
5	7	7	3	8	7	7	
10	7	7	7	3	7	7	
20	7	5	5	7	3	7	
30	8	5	7	3	3	3	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc Ph7
0,1 M NaOAc pH7, 30% 2-Propanol

29-juil-05		Glycerol(%)					
CaCl2 (mM)	10	12	14	16	18	20	
25	3	3	3	3	3	7	
50	3	3	3	3	3	3	
100	3	3	3	3	3	3	
150	3	3	3	3	3	3	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc Ph7
0,1 M NaOAc pH5, 30% 2-Propanol

22-juil-05		CaCl2 (mM)					
Glycerol(%)	50	100	150	200	250	300	
5	2	2	2	2	2	2	
10	7	7	3	3	3	8	
20	5	5	5	7	3	3	
30	5	3	3	3	5	5	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc Ph7
0,1 M NaOAc pH5, 30% 2-Propanol

29-juil-05		Glycerol(%)					
CaCl2 (mM)	10	12	14	16	18	20	
25	2	2	2	2	2	2	
50	7	7	3	3	3	8	
100	5	5	5	7	3	3	
150	5	3	3	3	5	5	

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7
 0,1 M NaOAc pH5, 16% Glycérol

05-août-05 Methanol(%)

CaCl2 (mM)	5	10	15	20	25	30
50	1	3	3	7	7	7
75	1	3	3	7	7	7
100	1	3	3	7	7	7
150	1	3	3	7	7	7

25 mM TrisOAc pH7

0,1 M NaOAc pH5, CaCl2 50mM, 16% Glycérol, 30% Isopropanol

08-août-05

E	7	7	7	7	7	7
E	7	7	7	7	7	7
E/2	7	7	7	7	7	7
E/2	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7,5
 0,1 M NaOAc pH5, 16% Glycérol

05-août-05 Ethanol(%)

CaCl2 (mM)	5	10	15	20	25	30
50	7	7	7	7	7	7
75	1	7	7	7	7	7
100	1	7	7	7	7	8
150	1	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7

0,1 M NaOAc pH5, CaCl2 50mM, 16% Glycérol, 30% Isopropanol

08-août-05

Ca2+	1	1	1	1	1	1
I + Ca2+	1	1	1	1	1	1
E (6mg/ml)	7	7	7	7	7	7
E (3mg/ml)	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7
 0,1 M NaOAc pH5, 16% Glycérol

05-août-05 1-Propanol(%)

CaCl2 (mM)	5	10	15	20	25	30
50	1	1	7	7	7	8
75	3	7	7	7	7	7
100	3	7	7	7	7	7
150	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc Ph7
 0,1 M NaOAc pH5, 16% Glycérol

05-août-05 2-ethoxy-ethanol(%)

CaCl2 (mM)	10	12	14	16	18	20
50	3	3	3	7	7	7
75	3	3	3	7	7	7
100	3	3	7	7	7	7
150	3	3	7	7	7	7

6 mg/mL TGase, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Propanol (%)					
	25	30	35	40	45	50
5	5	5	5	5	5	5
25	7	7	7	7	7	7
50	7	7	7	7	7	7
75	7	7	7	7	7	7

25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4,5, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Propanol (%)					
	20	22	24	26	28	30
15	5	5	5	7	7	5
25	7	7	7	7	7	7
35	7	7	7	7	7	7
45	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4,5, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Propanol (%)					
	25	30	35	40	45	50
5	1	1	1	1	1	1
25	7	7	7	7	7	5
50	7	7	7	7	7	5
75	7	7	7	7	7	5

25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4,5, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Butanol (%)					
	20	22	24	26	28	30
15						
25	PROBLEME DE SOLUBILITE					
35						
45						

6 mg/mL TGase, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH5, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Propanol (%)					
	25	30	35	40	45	50
5	1	5	5	5	5	5
25	7	7	7	7	7	7
50	7	7	7	7	7	7
75	7	7	7	7	7	7

25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4,5, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Octanol (%)					
	20	22	24	26	28	30
15						
25	PROBLEME DE SOLUBILITE					
35						
45						

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4,5, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Propanol (%)					
	20	22	24	26	28	30
15	7	7	7	7	7	7
25	7	7	7	7	7	7
35	7	7	7	7	7	7
45	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Propanol (%)					
	20	21	22	23	24	25
15	7	7	7	7	7	7
25	7	7	7	7	7	7
35	7	7	7	7	7	7
45	7	7	7	7	7	7

6 mg/mL TGase + Inhibiteur, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH4,5, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Butanol (%)					
	20	22	24	26	28	30
15						
25	PROBLEME DE SOLUBILITE					
35						
45						

6 mg/mL TGase, 25 mM TrisOAc pH7
0,1 M NaOAc pH5, 16% Glycérol

CaCl2 (mM)	12-août-05 Propanol (%)					
	20	21	22	23	24	25
15	7	7	7	7	7	7
25	7	7	7	7	7	7
35	7	7	7	7	7	7
45	7	7	7	7	7	7

10 mg/mL TGase, 25 mM TrisOAc pH7 + EI (goutte du bas)

Ammonium formate (%)	13-sept-05 MPD (%)					
	10	20	30	40	50	60
0.1	1	1	1	3	X	X
0.2	1	1	1	3	X	X
0.3	1	1	1	3	X	X
0.4	1	1	1	3	X	X

10 mg/mL TGase, 25 mM TrisOAc pH7 + EI (goutte du bas)

Ca-Acétate (mM)	13-sept-05 MPD (%)					
	10	20	30	40	50	60
0.1	3	3	3	3	3	3
0.2	3	3	3	3	3	3
0.3	3	3	3	3	3	3
0.4	3	3	3	3	3	3

